

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 122 912**

21 Número de solicitud: **9601986**

51 Int. Cl.⁶: **C07K 14/81**

A61K 38/56

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **20.09.96**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.98**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.98

71 Solicitante/s:
**Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra, Barcelona, ES
Universitat de Girona**

72 Inventor/es: **Llorens, Rafael de;
Avilés, Francesc X.;
Querol Murillo, Enrique;
Frazier, Marsha L.;
Blanco Aparicio, Carmen;
Molina Vila, Miguel Angel y
Fernández Salas, Esther**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

54 Título: **Inhibidores de metalocarboxipeptidasas y moléculas derivadas como agentes antitumorales.**

57 Resumen:
Inhibidores de metalocarboxipeptidasas y moléculas derivadas como agentes antitumorales.
La presente invención trata de la utilización de inhibidores de carboxipeptidasas y de variantes de ellos para controlar el crecimiento tumoral.

ES 2 122 912 A1

DESCRIPCION

Inhibidores de metalocarboxipeptidasas y moléculas derivadas como agentes antitumorales.

5 **Campo de la invención.**

La presente invención se refiere en general a la utilización de inhibidores proteicos de carboxipeptidasas y de sus variantes naturales o de formas rediseñadas por ingeniería de proteínas así como de moléculas peptidomiméticas derivadas de las anteriores como medicamento anticanceroso y específicamente para controlar la invasión y el crecimiento metastásico en tumores y a su utilización con propósitos terapéuticos.

10 **1. Antecedentes de la invención.**

Los inhibidores de proteasas han sido extensamente relacionados con procesos de interés biomédico, tales como procesado de precursores de hormonas y neuropéptidos, procesos inflamatorios, procesos tumorales, etc,

(Avilés, F.X. editor "Innovations in proteases and their inhibitors", Walter de Gruyter, 1993; Troll, W. & Kennedy, A.R. eds "Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents" Plenum Publishing Corp., 1993; Kennedy, A.R. (1994) *Cancer Res.*, 54, 1995s-2005s). Entre los inhibidores de proteasas están los de metalocarboxipeptidasas. Uno de ellos, el inhibidor procedente de la patata (a partir de ahora "PCI") ha sido extensamente estudiado desde el punto de vista estructural y funcional como inhibidor por nuestro grupo de investigación (Molina M.A. et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138; Oliva B., et al. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 176, 616-621 and 627-632; Tapia et al. (1991) *J. Mol. Engineer.* 1, 249-266; Querol E., et al. (1993) en "Innovations in Proteases and their Inhibitors" (F.X. Avilés ed.) pp. 477-494. Walter de Gruyter, Berlin, 1993; Molina M. A., et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 21467- 21472; Chang J-Y., et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 22087-22094; Marino-Busjle C., et al. (1994) *Applied Microb. & Biotech.*, 41, 632-637; Oliva B., et al. (1995) *Eur. Biophys. J.*, 24, 1-12; Oliva B. et al. (1995) *J. Mol. Model.*, 5, 1-15).

Una característica estructural relevante del PCI es ser una pequeña proteína dotada de un núcleo globular estabilizado mediante tres puentes disulfuro que forman un nudo de cisteínas. Se trata de un patrón topológico compartido por otras proteínas funcionalmente relacionadas o no, que hace uso de varias cisteínas concentradas en una zona central para crear un nudo estabilizante de puentes disulfuro. Este conjunto de proteínas forman el llamado grupo de "knotins", en inglés, a partir de ahora notinas en español, debido al nudo topológico que forman. Es de resaltar que entre las proteínas que comparten este patrón estructural con el PCI están diversos factores de crecimiento celular, como por ejemplo los TGF- α y β , NGF, PDGF, EGF, y los de la familia de la insulina (Isaacs N. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 391-395; Lin S. et al. (1995) *Nature Struct. Biol.*, 2, 835-837; Sun P. & Davies D. (1995) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24, 269-291). En el caso concreto del PCI, el núcleo globular tiene 27 residuos aminoácidos, y se encuentra flanqueado por dos colas de 7 residuos (la cola N-terminal) y de 5 residuos (la cola C-terminal). Los puentes disulfuro se establecen entre las cisteínas 8-24, 12-27 y 18-34. Esta es la forma natural más abundante, la denominada forma IIa, aunque existen otras isoformas (Hass G. M. & Ryan C. A. (1981) *Methods Enzymol.*, 80, 778-791).

Numerosos trabajos han descrito la expresión de proteasas y peptidasas en diferentes tipos de células tumorales, (Chen, W.T. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1992, 4, 802-809; Birkedal-Hansen, H. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995, 7, 728-735). Algunas de dichas proteasas están relacionadas con el procesamiento de hormonas peptídicas, factores de crecimiento, etc. Por ejemplo, se ha comprobado la existencia de proteasas responsables de la movilización del β FGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) de la matriz extracelular, factor que ha sido implicado en la angiogénesis tumoral (Liotta, L.A. et al. (1991) *Cell*, 327-336; Folkman J. (1995) *New England J. Med.*, 333, 1757-1763). A la vez también se moviliza el factor TGF- β 1 que presenta efectos contrarios, regulándose así el proceso de angiogénesis (Mignati, P. & Rifkin, D.B. 1993, *Physiol. Rev.*, 73, 161-195). El proceso más estudiado ha sido el papel de las proteasas en la invasividad y metástasis. Una característica de los procesos invasivos, tanto los que ocurren en el tumor primario como los que dan lugar al establecimiento de metástasis, es la degradación de la matriz extracelular gracias a la cual las células tumorales pueden penetrar en los tejidos adyacentes (los componentes principales de la matriz extracelular son proteínas y proteoglicanos) (Hynes, R.O., 1994 *Bioessays*, 16, 663-669). De hecho, existe una relación positiva entre el nivel de expresión de proteasas y la agresividad y malignidad del tumor, debido a la mayor invasividad de los tejidos por parte de la célula tumoral. Estas proteasas no son específicas de las células tumorales, sino que también son producidas por células normales durante los procesos de recomposición normal del tejido (cicatrización, morfogénesis, etc). La diferencia es que las células tumorales acoplan esta proteólisis con la motilidad resultando una invasión

en lugares y momentos inapropiados.

Debido al importante papel que juegan las proteasas en los procesos tumorales, y en prácticamente todas sus etapas (concretamente en la transformación, invasividad, adhesión y metástasis), se han publicado diversos trabajos en los que se estudia el posible papel de los inhibidores de proteasas como agentes antitumorales (Troll, W. & Kenedy, A.R. editors "Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents", 1993). Los inhibidores de proteasas ejercerían sus propiedades antitumorales a diferentes niveles, entre los que cabe citar:

1.- Bloqueando la transformación de células normales en tumorales, proceso en el cual parecen estar implicadas proteasas (Billings P.C., et al. (1989) *Carcinogenesis*, 10, 687-691).

2.- Bloqueando la cascada proteolítica implicada en el proceso de invasividad y metástasis (Kohn, E.C. & Liotta, L.A., 1995, *Cancer Res.*, 55, 1856-1862).

3.- Alterando el procesamiento de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo del tumor.

Entre los trabajos relevantes en relación con la presente invención están los siguientes. Billings P.C., et al. (1989) *Carcinogenesis*, 10, 687-691, donde se describe que la adición de PCI a bajas concentraciones (5µg/mL) inhibe *in vitro* la transformación tumoral inducida por irradiación en células embrionarias de ratón. Sin embargo, hasta el presente no se ha descrito en la literatura científica ningún efecto del PCI en el crecimiento y supervivencia de células ya transformadas o en células tumorales, tal como se describe en la presente invención. Por otra parte Billings P.C., et al. (1991) *Carcinogenesis*, 12, 653-657 describe que el inhibidor de quimi tripsina 1 de la patata suprime la transformación provocada por irradiación en células CH₃/10T1/2, *in vitro*. Billings P.C., et al. (1991) *Eur. J. Cancer*, 27, 903-908, describen otro inhibidor procedente de la soja, el denominado Bowman-Birk (desde ahora BBI) que, en ratones, reduciría el cancer de colon inducido por dimetilhidracina y en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3120-3124(1992), caracteriza el enzima diana del BBI como una gelatinasa. También se ha descrito que el BBI suprime la carcinogénesis en intestinos (Kennedy A. R. et al (1996) *Cancer Res.*, 56, 679-682).

Otro aspecto relevante para la presente invención es el papel que juegan los factores de crecimiento en el proceso tumoral. Las células normales son dependientes de diversos factores de crecimiento para completar su ciclo celular o salir de la fase G₀ (quiescencia). En las células tumorales suele encontrarse alterado el sistema de transducción de señales de alguno de estos factores. Por ejemplo, la célula tumoral puede presentar un bucle autocrino, o un receptor alterado que sea activo aún en ausencia del factor de crecimiento. Con todo, las células tumorales nunca dejan de necesitar algún factor de crecimiento (tipo IGF-I) para su proliferación y desarrollo del tumor de manera que su ausencia puede provocar apoptosis (Aronson, S.A. (1991) *Science*, 254, 1146-1153; Baserga, 1994, Thompson, C.B. (1995) *Science*, 267, 1456-1462). La migración de la célula tumoral puede estar regulada por factores autocrinos (producidos y/o secretados por la propia célula) paracrinós (factores de crecimiento como los de las familias PDGF, FGF, EGF y IGF, instados a ser secretados por el estroma), células normales del tejido invadido, y componentes de la matriz extracelular. A su vez ésta actúa también de reservorio de algunos de estos factores.

Es también relevante para la presente invención la relación existente entre proteasas y el mecanismo de la apoptosis celular. Existen cada vez más evidencias que indican que la apoptosis involucra la activación de una cascada de proteasas, lo cual no es de extrañar dado que el desmantelamiento de una célula requiere procesos de proteólisis (para una revisión reciente ver Kumar S. & Harvey N. (1995) *FEBS Letters*, 375, 169-173; Takahashi A. & Earnshaw W. (1996) *Curr. Opin. Genet. & Develop.*, 6, 50-55; Patel T. et al. (1996) *FASEB J.*, 10, 587-597). El punto de control más importante para iniciar el proceso de apoptosis está en la proteína, factor de transcripción, p53. Este factor controla cuatro importantes mecanismos celulares: (a) la parada del ciclo celular en G₁, para permitir (b) la reparación del DNA en el caso de que no esté excesivamente dañado, si el daño es excesivo promueve (c) la apoptosis, así como inhibe (d) la angiogénesis (Bates S. & Vousden K. (1996) *Curr. Opin. Genet. & Develop.*, 6, 12-19).

Debido al efecto supresor que ejerce el IGF-IR (receptor del factor 1 de crecimiento tipo insulina, a partir de ahora IGF-IR) sobre la apoptosis celular presenta un potencial efecto terapéutico para el cáncer. La disminución en el nivel celular de IGF-IR es causa de apoptosis masiva de las células tumorales *in vivo* (Resnikoff M. et al (1995) *Cancer Res.*, 55, 2463-2469 y 3739-3741). Más aún, las células supervivientes son eliminadas por el huésped, al parecer por el sistema inmune, y tiene lugar una regresión del tumor (Baserga R. (1996) *TIBTECH* 14, 150-152). En resumen, el IGF-IR presenta unas características únicas que hacen del mismo un candidato idóneo para ser diana de la terapia antitumoral, en otras palabras,

una molécula que interfiriera con el IGF-IR daría lugar a: (a) apoptosis masiva de células tumorales, (b) inhibiría tumorigénesis, (c) despertaría la respuesta inmune del huésped, y (d) tendría un efecto limitado sobre las células normales (Baserga R. (1996) *TIBTECH*, 14, 150-152). Además el IGF-IR sería una diana más general que otros receptores de factores de crecimiento (Baserga R. (1995) *Cancer Res.*, 55, 249-252).

El IGF-IR, junto con otros receptores de factores de crecimiento, jugaría un papel clave en el mecanismo de transducción de señal. Aparentemente, muchas células tumorales han perdido la redundancia en vías de transducción de señal que tienen las células normales. Esta sería la causa más probable de la vulnerabilidad que presentan las células tumorales a moléculas interceptoras de transducción de señal (Levitzi A. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 239-244). Por ello es muy interesante encontrar moléculas que puedan interceptar transducción de señal para ser utilizadas, solas o en combinación con otras, como agentes antitumorales. Algunos o todos los receptores de factores de crecimiento representarían una diana idónea para la acción interceptadora de transducción de señal.

Por último, es también relevante para la presente invención la analogía estructural, topológica, entre el PCI y diferentes factores de crecimiento celular del grupo de las notinas antes descrita (Isaacs N. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 5, 391-395; Lin S. et al. (1995) *Nature Struct. Biol.*, 2, 835-837; Sun P. & Davies D. (1995) *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24, 269-291). Esta analogía ha permitido establecer la hipótesis de que la actividad antitumoral del PCI pueda estar total o parcialmente relacionada con esta topología de notina y no tan sólo con la capacidad inhibidora de proteasas. De esta forma, el PCI podría actuar de antagonista de factores de crecimiento y bloquearía el crecimiento tumoral. En este sentido cabe mencionar que se ha descrito que anticuerpos monoclonales contra el EGF interaccionante con heparina bloquean el crecimiento *in vitro* de algunos tumores y por lo tanto que podrían ser utilizados como agentes terapéuticos (Modjtahedi H. & Dean C. (1995) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 207, 389-397). Asimismo anticuerpos monoclonales o RNA antisentido o ablación genética o creación de mutantes dominante-negativos del IGF-IR inhiben diversos tipos de tumores (revisión en Baserga R. (1996) *TIBTECH*, 14, 150-152).

Patentes relevantes para la presente invención

Un rastreo exhaustivo de los bancos de información sobre patentes no ha detectado ninguna basada en el inhibidor de la carboxipeptidasa (PCI) como medicamento antitumoral, al menos en la forma y por los mecanismos establecidos en la presente invención. Tan sólo existe una mención a la utilización de diversos inhibidores comerciales, entre ellos el de carboxipeptidasas, en cremas de protección contra la radiación solar (US Patente 4,906,457). Por otra parte, una búsqueda de patentes en que se haga uso de otros inhibidores de proteasas no ha dado lugar, en ningún caso, a relacionarlos con otro efecto que no sea el de inhibir proteasas. Nunca se describen que tengan efectos basados en la topología de la molécula (notina) y/o su interacción con diversos receptores de factores de crecimiento celular.

2.- Compendio de la invención

Es un importante objeto de la presente invención el uso del inhibidor de la carboxipeptidasa (PCI) procedente de la patata, cuya secuencia aminoacídica de la isoforma más estudiada, la IIa, es:

SEQ. ID. NO. 1

La invención se hace extensiva a otras isoformas naturales del PCI procedentes de otras plantas solanáceas como agentes antitumorales.

Es un objeto de la presente invención la obtención de la isoforma IIa del inhibidor de metalocarboxipeptidasas (esta forma se denominará a partir de ahora PCI, rPCI o PCIwt indistintamente) mediante técnicas de DNA recombinante y de expresión heteróloga. También son objeto de esta invención otras variantes naturales o rediseñadas por ingeniería de proteínas o sintetizadas químicamente.

Es también objeto de la presente invención la utilización de las anteriores variantes naturales o artificiales del PCI como agentes antitumorales.

Es asimismo objeto de la presente invención la determinación, a nivel celular y molecular, de la forma en que el inhibidor de metalocarboxipeptidasas realiza la actividad antitumoral.

Es, por último, objeto de la invención establecer la base estructural responsable de la actividad antitu-

moral del PCI que permita el rediseño del mismo, así como el diseño de otras moléculas peptidomiméticas u organomiméticas con mejores características de formulación, farmacocinética y farmacodinámica para su utilización terapéutica como agentes antitumorales.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de la presencia de PCI en el medio de cultivo sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano MDAPanc-3. Las células se cultivaron en medio DMEM+10%BMS hasta que los controles llegaron a confluencia. Los resultados son la media de cuatro experimentos. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCI). Las barras indican el error estándar.

Figura 2: Efecto de la presencia de PCI en el medio de cultivo sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano IBF-CP3. Las células se cultivaron en medio DMEM+10%BMS hasta que los controles llegaron a confluencia. Los resultados son la media de cuatro experimentos. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCI). Las barras indican el error estándar.

Figura 3: Efecto de la presencia de PCI en el medio de cultivo sobre la línea de insulinoma de hámster HIT. Las células se cultivaron en medio MEM+10%FBS durante 4 días. Los resultados expresan la media de tres experimentos. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCI). Las barras indican el error estándar.

Figura 4: Efecto de la presencia de PCI en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Las células se cultivaron en medio MEM+10%FBS durante 23 días, con cambios de medio cada cinco días. Para cada concentración de PCI se realizaron ocho réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCI). Las barras indican el error estándar.

Figura 5: Efecto de la presencia de PCI tipo silvestre (de ahora en adelante PCIwt) y “cola” (pentapéptido mimetizando los residuos 35-39 del PCI) en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Las células se cultivaron en medio DMEM sin FBS ni selenito sódico, ni transferrina durante 16 días, con cambios de medio cada 4 días. Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCIwt o “cola”). Las barras indican el error estándar. * $p < 0,1$, ** $p < 0,025$.

Figura 6: Efecto de la presencia de factores de crecimiento solos o combinados con PCIwt, PCIdelYVG o “cola” en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Las células se cultivaron en medio DMEM más FBS durante 72h, después de un lavado con PBS las células se cultivaron durante 24h más en DMEM sin FBS. Posteriormente se realizaron los tratamientos en DMEM sin FBS más selenito sódico, transferrina y BSA más los factores de crecimiento y el PCI o variantes durante 72h. a) Tratamiento con EGF sólo o combinado con PCI, PCIdel YVG y “cola”; b) Tratamiento con insulina sola o combinada con PCI, PCIdel YVG y “cola” y c) Tratamiento con IGF-1 sólo o combinado con PCI, PCIdel YVG y “cola”. Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de los factores a estudiar). Las barras indican el error estándar. * $p < 0,005$ y ** $p < 0,001$.

Figura 7: Efecto de la presencia de PCI en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Panc-1. Las células se cultivaron en medio RPMI+10%FBS durante 10 días, con cambios de medio cada 3 días. Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCIwt). Las barras indican el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

Figura 8: Efecto de la presencia de PCIdelYVG en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Panc-1. Las células se cultivaron en medio RPMI+10 con cambios de medio cada 3 días. Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de PCIdelYVG). Las barras indican el error estándar. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$.

Figura 9: Efecto de la presencia de factores de crecimiento solos o combinados con PCIwt, PCIdelYVG o “cola” en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático

humano Panc-1. Las células se cultivaron en medio DMEM más FBS durante 48h, después de un lavado con PBS las células se cultivaron durante 48h más en DMEM sin FBS. Posteriormente se realizaron los tratamientos en DMEM sin FBS más selenito sódico, transferrina y BSA más los factores de crecimiento y el PCI o variantes durante 72h. a) Tratamiento con EGF sólo o combinado con PCI, PCIdel YVG y "cola"; b) Tratamiento con insulina sola o combinada con PCI, PCIdel YVG y "cola" y c) Tratamiento con IGF-1 sólo o combinado con PCI, PCIdel YVG y "cola". Para cada tratamiento se realizaron 6 réplicas. Los datos se indican como porcentaje de crecimiento relativo a la media de los controles (células cultivadas en ausencia de los factores a estudiar). Las barras indican el error estándar. * $p < 0,005$ y ** $p < 0,001$.

Figura 10: Curvas de crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 creciendo en DMEM suplementado con 10% FBS: control (círculos), tratadas con $1\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI (cuadrados) y $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI (triángulos) añadido al medio de cultivo. El medio se cambió cada 4 días añadiendo PCI fresco en cada cambio de medio. Inicialmente, se sembraron 1×10^5 células en pocillos de 10 cm^2 , en placas de 6 pocillos. Cada punto es la media de tres determinaciones. Las barras muestran el error estándar.

Figura 11: Proliferación de la línea celular Capan-1 pretratada con PCI. El número de células se expresa en relación al de células no pretratadas control (cultivadas sin PCI en el pretratamiento). El pretratamiento en todos los casos es de $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI. Se presenta el resultado de tres experimentos: (a) Pretratamiento 28 días, tratamiento 11 días; (b) pretratamiento 30 días, tratamiento 5 días y (c) pretratamiento 34 días, tratamiento 14 días. Las barras indican la media del número de células en 8 pocillos, la línea vertical el error estándar.

Figura 12: Curva de crecimiento de células Capan-1 pretratadas y no pretratadas con PCI. El número de células se expresa en relación al número final de células no pretratadas control (cultivadas sin PCI en el pretratamiento). El pretratamiento en todos los casos es de $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI. Las barras indican la media del número de células en 8 pocillos, la línea vertical el error estándar.

Figura 13: Proliferación de la línea celular Int-2 pretratada con PCI. El número de células se expresa en relación al de células no pretratadas control (cultivadas sin PCI en el pretratamiento). El pretratamiento en todos los casos es de $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI. Se presenta el resultado de tres experimentos: (a) Pretratamiento 13 días, tratamiento 7 días; (b) pretratamiento 20 días, tratamiento 8 días y (c) pretratamiento 30 días, tratamiento 5 días. Las barras indican la media del número de células en 8 pocillos, la línea vertical el error estándar.

Figura 14: Efecto del PCI en el crecimiento tumoral en ratón. Los tumores se inducen en ratones desnudos por inyección subcutánea de 10^7 células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Después de 12 días de la inyección de las células, se inicia el tratamiento diario con tampón fosfato (PBS) o PCI por inyección directa en el tumor. Se determina el tamaño del tumor cada 2 días, mediante la utilización de un calibrador vernier. En la gráfica se representa el volumen relativo en diferentes momentos del tratamiento para el control (primera columna, empezando por la izquierda), y para los grupos tratados con diferentes dosis de PCI: $0,11\text{mg}/\text{mL}$, $0,6\text{mg}/\text{mL}$ y $1,2\text{mg}/\text{mL}$ que están representadas en las columnas sucesivas a la control respectivamente. Los datos representan la media de los ratones. Las barras indican el error estándar. Y la significación estadística está representada como: # $P < 0,1$, * $P < 0,025$, + $P < 0,01$ y ¥ $P < 0,001$ versus el control para una t de Student.

Figura 15: Efecto del PCI en el crecimiento tumoral en ratón, de acuerdo con el experimento descrito en la figura anterior. Los tiempos de duplicación se calcularon a partir de los volúmenes de los tumores. Los datos representan la media \pm SEM, $n=5$. * $P < 0,1$ y # $P > 0,005$ respecto al control en un test de t de Student.

Figura 16: Ensayo de citotoxicidad del PCI sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Se sembraron 160.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Después de 24 horas de cultivo se les añadió el fluoróforo de viabilidad, BCECF-AM, y las dosis de PCI a ensayar: $0\mu\text{g}/\text{mL}$, $10\mu\text{g}/\text{mL}$, $30\mu\text{g}/\text{mL}$, $45\mu\text{g}/\text{mL}$, $60\mu\text{g}/\text{mL}$ y $75\mu\text{g}/\text{mL}$. Se determinó la intensidad de fluorescencia durante 24h. Los valores se determinaron por cuadruplicado.

Figura 17: Ensayo de citotoxicidad del PCI sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Se sembraron 160.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Después de 24 horas de cultivo se les añadió el fluoróforo para ácidos nucleicos, ioduro de propidio, y las dosis de PCI a ensayar: $0\mu\text{g}/\text{mL}$, $10\mu\text{g}/\text{mL}$, $30\mu\text{g}/\text{mL}$, $45\mu\text{g}/\text{mL}$, $60\mu\text{g}/\text{mL}$ y $75\mu\text{g}/\text{mL}$. Se determinó la intensidad de fluorescencia durante 24h. Los valores se determinaron por cuadruplicado. El

ES 2 122 912 A1

descenso de intensidad que se observó durante las dos primeras horas fue debido a que el medio de cultivo acabado de añadir, sin tamponar por efecto del CO₂ del incubador, interfiere en el valor de fluorescencia del yoduro de propidio.

5 Figura 18: Seguimiento de la presencia de PCI añadido al medio de cultivo de la línea Capan-1. Se sembraron 5×10^5 células en un frasco de 25cm², cuando las células estuvieron casi en confluencia se retiró el medio y se le añadió medio fresco más 50µg/mL de PCI. Se siguió la presencia de PCI en el medio durante 24h, cada punto corresponde a medidas cada media hora. La concentración de 10 PCI se determinó por actividad inhibidora de la carboxipeptidasa A (cuadrados y por ELISA con anticuerpos contra el PCI (rombos).

15 Figura 19: Seguimiento de la presencia de PCI añadido al medio de cultivo de la línea Capan-1. Se sembraron 5×10^5 células en un frasco de 25cm², cuando las células estuvieron casi en confluencia se retiró el medio y se le añadió medio fresco más 200µg/mL de PCI. Se siguió la presencia de PCI en el medio durante 24h, cada punto corresponde a medidas cada media hora. La concentración de PCI se determinó por actividad inhibidora de la carboxipeptidasa A (rombos) y por ELISA con anticuerpos contra el PCI (cuadrados y círculos).

20 Figura 20: Microfotografía de la incorporación de RITC-PCI por células de la línea Capan-1 creciendo exponencialmente en medio completo suplementado con BMS al 10%. (A) Imagen realizada con microscopio invertido de contraste de fases, células incubadas con [RITC-PCI]= 20 µg/mL durante 4 horas. (B) Imagen realizada con microscopio de fluorescencia de las células de la fotografía (A).

25 Figura 21: Microfotografía del marcaje con DAPI de células de la línea Capan-1. Se trataron células que estaban creciendo exponencialmente, en medio completo suplementado con BMS al 10%, con 50µg/mL de PCI durante 24 horas. Imagen realizada con microscopio de fluorescencia, donde se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI.

30 Figura 22: Análisis electroforético en geles de actividad ribonucleasa (teñidos con toluidina) de los medios de cultivo de la línea Capan-1 cargando 2.5µg de proteína total de cada muestra. 1: patrones de bajo peso molecular preteñidos; 2 y 3: muestras control; 4, 5, 6 y 7: muestras dónde el PCI se añadió post-adhesión; 8 y 9: muestras dónde el PCI se añadió pre-adhesión; 10: ribonucleasa A.

35 Figura 23: Competencia del EGF frío frente a ¹²⁵I-EGF. Se representa el logaritmo de la concentración de inhibidor frente al porcentaje de unión específica. Células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 fueron incubadas con concentraciones crecientes de EGF en presencia de 350 pM de ¹²⁵I EGF durante 5 horas a 4° C.

40 Figura 24: Representación de Logit-log (pseudo-Hill) de unión competitiva EGF/¹²⁵I-EGF. El porcentaje de unión específica P del competidor, EGF, se usa para calcular el $\log(P/[100-P])$, el cual se representa contra el logaritmo de las concentraciones de competidor. Valores obtenidos a partir de los datos de la Tabla 21.

45 Figura 25: Representación de Logit-log de curvas de competencia del EGF frío frente al ¹²⁵I-EGF para la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Los puntos se han ajustado con el programa "Graphpad Inplot4" a un tipo de competencia a dos lugares de unión diferentes. Cada valor se ha determinado por triplicado y en la gráfica se representa el valor medio. (B es igual al porcentaje de unión específica).

50 Figura 26: Competencia del PCI frente a ¹²⁵I-EGF. Se representa el logaritmo de la concentración de inhibidor frente al porcentaje de unión específica. Células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 son incubadas con concentraciones crecientes de PCI en presencia de 350 pM de ¹²⁵I EGF durante 5 horas a 4° C.

55 Figura 27: Representación de Logit-log (pseudo-Hill) de unión competitiva ¹²⁵I-EGF/PCI. El porcentaje de unión específica P del competidor, PCI, se usa para calcular el $\log(P/[100-P])$, el cual se representa contra el logaritmo de las concentraciones de competidor. Valores obtenidos a partir de los datos de la Tabla 24.

60 Figura 28: Representación de Logit-log de curvas de competencia del PCI frente al ¹²⁵I-EGF para la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Los puntos se han ajustado con el programa "Graphpad Inplot4" a un tipo de competencia a dos lugares de unión diferentes. Cada valor se ha determinado por triplicado y en la gráfica se representa el valor medio. (B es igual al porcentaje de unión específica).

3.- Descripción detallada de la invención

El objetivo general de la presente invención es la utilización de un inhibidor proteico de carboxipeptidasa y variantes naturales o rediseñadas por ingeniería de proteínas, así como moléculas peptidomiméticas u organomiméticas derivadas de las anteriores, como agentes antitumorales y su potencial uso biomédico.

En la forma de realización preferida de la presente invención, los objetivos anteriores se han alcanzado mediante un proceso que comprende los objetivos parciales que se describen a continuación.

En primer lugar se ha establecido un protocolo detallado para la expresión del gen del PCI, obtención y purificación de la isoforma IIa del inhibidor de metalocarboxipeptidasa o PCI, así como de otras formas mutantes artificiales. Este método es aplicable a otras variantes.

Para determinar la efectividad antitumoral del PCI se han realizado diversos ensayos de proliferación celular con varias líneas celulares tumorales (Capan-1, Panc-1, IBFCP3, MDAPanc-3, HIT, Melanoma B-16, Int-2 y H661), en ausencia y en presencia de PCI y utilizando diversas concentraciones del mismo. Tanto en los ensayos de recuento directo del número de células viables como por determinación indirecta de la proliferación con sales de tetrazolio se observa un efecto inhibidor del crecimiento en las líneas celulares tumorales ensayadas. La curva de crecimiento de la línea celular Capan-1, en presencia y ausencia de PCI, muestra que las células tratadas con PCI presentan un crecimiento significativamente más lento. Curvas de crecimiento de células sometidas a tratamientos prolongados con PCI muestran que el daño producido por el PCI no es reversible dado que tras retirar el PCI estas células siguen creciendo más lentamente que las células control.

Se ha determinado la capacidad inhibitoria de invasividad celular "*in vitro*", analizando la migración de las células a través de membranas en presencia o ausencia de PCI, encontrándose un aumento significativo de la mencionada capacidad en presencia de PCI. Asimismo, se ha determinado la capacidad inhibitoria de metástasis "*in vivo*" en hígado de ratones por inyección de la línea de melanoma murino B16. También en este caso se ha encontrado una significativa disminución de la capacidad metastática de las células que habían sido pretratadas con PCI. Con el fin de evaluar la sensibilidad al PCI de tumores humanos inducidos se realizaron ensayos con ratones atímicos a los que se les inoculó subcutáneamente células de la línea de adenocarcinoma páncreatico humano Capan-1. El correspondiente análisis indica que el PCI posee una actividad significativa en la reducción del crecimiento de dichos tumores, mostrando éstos pérdida de consistencia y menor nivel de vascularización (lo que indica que el PCI presentaría efecto anti-angiogénico).

Para determinar si el efecto inhibidor del crecimiento del PCI era debido a que induce citotoxicidad de forma inespecífica, o bien si contrariamente el efecto es específico, se realizó un ensayo de citotoxicidad "*in vitro*" del PCI sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Los resultados indicaron que el PCI no inducía una tasa anormal de muerte celular. Para determinar si el tratamiento con PCI tiene un efecto inhibidor del ciclo celular se analizó el contenido de DNA, mediante citometría de flujo, a lo largo del ciclo celular. Se observa que el PCI produce una variación en la distribución de las fases del ciclo, concretamente un aumento del número de células en G₁, parando la división celular.

Para establecer si la disminución del crecimiento celular, de la que el PCI es responsable, está relacionada con una inducción de apoptosis celular se determinaron aquellos cambios que se relacionan con el fenómeno apoptótico: (a) morfológicos por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo y (b) la presencia de escalera de DNA digerido, no observándose cambios significativos.

Los ensayos anteriores indican que el inhibidor de carboxipeptidasa, isoforma IIa de la patata, presenta un significativo efecto inhibidor sobre el crecimiento de líneas tumorales en cultivo, sobre el desarrollo de tumores inducidos en ratones atímicos por inyección de células de adenocarcinoma pancreático humano y sobre la aparición de metástasis en hígado de ratones por inyección de células de melanoma.

Con objeto de profundizar en el mecanismo celular y molecular de acción del PCI se realizaron diversos ensayos. En primer lugar se determinó el proceso de internalización y desaparición del PCI en cultivos de células tumorales mediante el seguimiento de su concentración a lo largo del tiempo, pudiéndose observar que el PCI cursa un ciclo de incorporación/ liberación al medio y reincorporación a las células. Dado que el PCI sufre un proceso de rápida y masiva internalización en las células Capan-1, con objeto de determinar si el PCI se une a receptores de factores de crecimiento se han realizado ensayos de unión competitiva al correspondiente receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los resultados demuestran la existencia en Capan-1 de receptores para el EGF, uno de baja y otro de alta afinidad. si bien la unión se

produce mayoritariamente en el receptor de alta afinidad. También se realizaron ensayos de proliferación añadiendo al mismo tiempo un factor de crecimiento, EGF, insulina o IGF-1, que estimulan la proliferación de las líneas de adenocarcinoma pancreático humano Panc-1, Capan-1 y de PCI observándose una clara disminución del efecto estimulador del EGF, insulina y IGF-1 en presencia de PCI.

5 Una vez determinado que el PCI se unía al receptor de EGF se comprobó que el PCI actúa como antagonista del EGF por análisis de la inhibición de la fosforilación del receptor de EGF.

10 Con objeto de determinar si el efecto que el PCI tiene sobre el crecimiento celular da lugar a cambios metabólicos importantes se analizó el proceso de secreción del enzima ribonucleasa así como su patrón de glicosilación. No se observaron diferencias significativas respecto a la secreción del enzima y si un mayor nivel de glicosilación de la misma.

15 Con objeto de comprobar el posible papel que el PCI tiene en el proceso de transducción de señal se realizaron análisis de expresión génica en células Capan-1 mediante transferencia Northern, utilizando como sondas diversos genes de proteínas significativas. Se determinó que el PCI inducía un fuerte aumento de la expresión de la proteína p53 y una disminución en la expresión de la tripsina. La aparente contradicción con el no incremento de apoptosis mencionado no es tal dado que se sabe que la p53 de células Capan-1 está mutada. En cambio, resulta coherente el que las células resulten paradas en la fase G₁. La disminución en la expresión de tripsina indicaría que la línea celular ha perdido poder invasivo. 20 En conjunto, los resultados son indicativos de que el PCI altera alguna vía de transducción de señal, sin que se pueda precisar cual de ellas.

25 Para determinar si el efecto inhibitor del crecimiento celular del PCI está relacionado con su actividad inhibitor de carboxipeptidasa o con la 5 particular topología de su núcleo globular tipo notina se realizaron ensayos de inhibición celular con una forma mutante diseñada al efecto. Se deleccionaron los tres aminoácidos C-terminales dando lugar a la forma PCI del Y37V38G39. Esta forma fue diseñada y construida debido a que mantiene la estructura y topología del núcleo globular del PCI silvestre, a la vez que da lugar a un PCI prácticamente sin actividad inhibitor de carboxipeptidasa. Se realizaron 30 ensayos de inhibición celular e internalización en células Panc-1 y se observó que se mantenía el efecto de internalización y de inhibición celular. Se realizaron también ensayos de proliferación añadiendo al mismo tiempo un factor de crecimiento, EGF, IGF-1 o insulina, que estimulan la proliferación de las líneas de adenocarcinoma pancreático humano Panc-1, Capan-1 y la forma delectiva del PCI. Se observó una clara disminución del efecto estimulador, tanto del EGF, IGF-1 como de la insulina, en presencia de 35 la forma mutante del PCI. Por otra parte, se realizaron ensayos de inhibición celular en células Capan-1 con un 5 péptido sintético correspondiente a la cola C-terminal del PCI, péptido que carece de actividad inhibitor de carboxipeptidasa. Se encontró una ligera actividad inhibitor del crecimiento celular.

40 En una forma adicional de realización de la presente invención se realizó análisis computacional gráfico para determinar con mayor precisión la base estructural de la actividad inhibitor de crecimiento celular del PCI. El análisis muestra un buen encaje entre la estructura del PCI y otras notinas, entre las que cabe destacar el EGF y el TGF- α , (Tumor Necrosis Factor α), identificando a su vez los potenciales residuos clave de su interacción con los receptores. Estos aminoácidos están situados no tan sólo en el núcleo, sino también en el lazo definido por los residuos cisteínas 27 y 34 y alguno de la cola C-terminal del PCI. 45 Todo ello sugiere que la forma de acción del PCI sería a través de receptores de factores de crecimiento celular en los que actuaría como antagonista.

50 Las hipótesis apuntadas en la presente invención acerca de la base estructural involucrada en el efecto inhibitor del crecimiento celular, y por ello de la actividad antitumoral del PCI, y que no corresponde a su actividad inhibitor de carboxipeptidasa, permite establecer los criterios fisicoquímicos que determinarán el diseño de nuevas variantes de la isoforma IIa del PCI y de moléculas peptidomiméticas con mejores características de formulación, farmacocinética y farmacodinámica, para su utilización terapéutica como agentes antitumorales.

55 4.- Ejemplo del modo preferido de realización de la invención

4.A. Expresión, obtención y purificación del PCI, variantes naturales del PCI y mutantes artificiales.

60 La isoforma IIa del inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) se obtiene en forma recombinante a partir de un gen sintético para el mismo, construido con optimización de codón para *Escherichia coli*, insertado en un vector de secreción y clonado en la cepa MC1061 de la mencionada bacteria. Esta se hace crecer en un fermentador discontinuo alimentado, y el PCI recombinante es secretado al medio de cultivo,

ES 2 122 912 A1

se purifica mediante un protocolo que consta de varios pasos cromatográficos tal y como se describe más adelante. A partir del gen sintético es posible, mediante técnicas de mutagénesis dirigida por oligonucleótido por PCR, obtener variantes del inhibidor con la secuencia de aminoácidos modificada. El gen sintético fue construido y clonado en *Escherichia coli* en la forma descrita en Molina et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138. La expresión y producción a gran escala del PCI recombinante ha sido puesta a punto y descrita en Molina M. A. et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138. y Marino C. et al. (1994) *Appl Microbiol Biotechnol* 41, 632-637. El protocolo de purificación del PCI recombinante se realiza como se describe en Molina M. A. et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138 y Marino C. et al. (1994) *Appl Microbiol Biotechnol* 41, 632-637.

La expresión del PCI recombinante tipo silvestre y de las diferentes formas mutantes se realiza en *E. coli*, utilizando construcciones obtenidas a partir de los vectores pIN-III-*ompA* 3, como se describe en Molina M. A. et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138. El vector recombinante pIMAM3 contiene la construcción que expresa el PCI tipo silvestre. En esta construcción el primer codón de la secuencia codificante del PCI nativo sigue directamente al último codón del péptido señal *OmpA*. Las diferentes formas mutantes del PCI utilizadas en la presente invención se obtienen por mutagénesis dirigida por oligonucleótido a partir del vector pIMAM3.

4.A.1. Condiciones de cultivo de las células *E. coli* productoras de PCI recombinante

Las células de *E. coli* portadoras de los plásmidos recombinantes se hacen crecer de la forma siguiente:

1. Inocular un cultivo de noche de *E. coli* MC1061 portador del plásmido deseado (pIMAM3 o uno de sus derivados) en 10 mL de M9CAS + 0,5% glicerol + 50 µg/mL de Ap. Incubar a 37°C y 300 rpm.

2. Al día siguiente inocular el cultivo de noche en 1 L del mismo medio. Distribuir en erlenmeyers de 250 mL (unos 125 mL por enlermeyer) e incubar a 37°C y 300 rpm.

3. A las 2 horas inducir añadiendo isopropyl-b-D-thiogalactotyranside (IPTG) a una concentración final 0,2 mM a partir de una disolución estéril 200 mM.

4. A las 24-30 h distribuir el cultivo en tubos de centrifuga y centrifugar a 10.000 xg durante 20 min. Recoger el sobrenadante y dividirlo en alícuotas de 150 mL. Guardarlas en la nevera si no se sigue inmediatamente la purificación.

Para producir PCI recombinante a mayor escala, 200 mg/L o más, se utilizan las condiciones de fermentación siguientes (Marino C. et al. (1994) *Appl Microbiol Biotechnol*, 41, 632-637):

- Medio M9CAS con glicerol al 0,5% como fuente de carbono.

- Mezcla de oligoelementos siguiente: FeSO₄·7H₂O, 40 mg/L; MnSO₄·H₂O, 10 mg/L; CaCl₂·6H₂O, 4 mg/L; ZnSO₄·7H₂O, 2mg/L; Na₂MoO₄, 2 mg/L; CuCl₂·2H₂O, 1 mg/L; AlCl₃, 1 mg/L; H₃BO₃, 0,5 mg/L).

- Temperatura de cultivo 37°C.

- Simultáneamente a la inoculación inducción de la expresión del gen del PCI con IPTG 0.2 mM.

- Mantener la PO₂ (presión de oxígeno) por encima del 50% de saturación durante todo el proceso de fermentación.

- Agitación constante de 900 rpm.

- Añadir componentes concentrados de M9CAS (glicerol, casaminoácidos, sales y tiamina) cuando se observe una subida de PO₂.

- Finalizar el proceso a las 24 horas (A₅₅₀ en el rango de 40-50 unidades).

4.A.2. Purificación de los PCI recombinantes

La purificación de los PCI recombinantes, tanto del tipo silvestre como de los mutantes, a partir de medio extracelular de cultivos se realiza de acuerdo con el procedimiento siguiente:

ES 2 122 912 A1

Todos los tampones empleados en HPLC y FPLC se preparan usando agua Mono-Q, y se filtran a través de membranas de 0,22 μm y desgasifican inmediatamente antes de usarlos. Tanto la HPLC como la FPLC se llevan a cabo a temperatura ambiente. El proceso de purificación se sigue valorando la concentración global de proteínas después de cada paso mediante el método de Bradford y la concentración de PCI recombinante por determinación de la actividad inhibidora de CPA usando blancos adecuados; o, en el caso de mutantes del PCI con poca o nula actividad carboxipeptidasa, por ELISA con anticuerpos de conejo inoculado con PCI.

El medio extracelular se filtra mediante filtrados sucesivos a través de filtros de 0,8, 0,4 y 0,22 μm respectivamente. Los filtros utilizados son los Millex-GV (millipore, EE.UU.), dado que tienen una baja retención de proteínas. A continuación se concentra hasta 200 mL mediante ultracentrifugación tangencial utilizando una membrana de 1000-Da (Millipore). Seguidamente se concentra usando columnas "Sep-Pak C₁₈ environmental" (Millipore) de 35 mL. Las minicolumnas Sep-Pak C₁₈ son columnas de fase reversa ya empaquetadas que retienen al PCI. Las muestras se pasan a través de las mismas mediante una jeringa. Para cada una de las alícuotas de medio extracelular obtenidas en el paso anterior realizar el proceso siguiente:

1. Pretratar una minicolumna pasándole primero 50 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y luego 100 mL de agua Mono-Q.

2. Pasar la alícuota por un filtro de 0,22 μm y a continuación por la columna.

3. Lavar la columna una vez con 50mL de acetonitrilo al 10% y seguidamente con acetonitrilo al 15% para eliminar impurezas de la muestra.

4. Lavar la columna una o dos veces con 100 mL de agua.

5. Eluir el retenido con 50 mL de isopropanol al 30%. Recogerlo en un tubo de 50mL.

6. Evaporar el retenido en el rotovapor hasta un volumen aproximadamente 1/10 del inicial. Esta disolución es el material de la etapa siguiente.

Cromatografía FPLC de intercambio aniónico

La columna de intercambio aniónico utilizada en una primera purificación de PCI recombinante es una TSK-DEAE 5PW Ultropac 7,5 x 75 mm (LKB). En el resto de purificaciones se emplea una columna del mismo tipo pero de 21,5 x 150 mm. El protocolo aquí descrito utiliza esta última. Como equipo de FPLC se utiliza el FPLC System[®] (LKB Pharmacia) al que se hallaba acoplado un ordenador Tandon PAC 3865x. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Preparar los tampones de FPLC, que en este caso son:

- Tampón A: Tris-acético 20 mM pH 8,5. Se obtiene disolviendo Tris a una concentración 20mM y ajustando su pH a 8,5 con acético glacial.

- Tampón B: Tris-acético 20 mM pH8,5 más Acetato amónico 0,8 M. Se obtiene disolviendo el Tris y el acetato amónico a las concentraciones citadas y ajustando el pH con amoníaco. Filtrar y desgasificar ambos tampones. Medir la conductividad del tampón A, que no suele rebasar los 400 μS .

2. Equilibrar la columna pasándole tampón A a un flujo de 4 mL/min durante al menos media hora. Al final del equilibrado el pH y la conductividad a la salida de la columna deben ser muy similares a los del tampón A.

3. Mientras la columna se está equilibrando, centrifugar el material de la etapa 1 a 10000 $\times g$ durante 5-10 min. A continuación añadirle tampón A hasta 30 mL y medir su conductividad y pH. Esta no debe ser de más de 1500 μS , si ello sucede debe diluirse más el material en tampón A. En cuanto al pH, si es de menos de 8.25 elevarlo hasta ese valor (o preferiblemente hasta 8,5) añadiendo NaOH 1 M. Finalmente pasar el material por un filtro de 0,22 μm .

4. Cargar el material en la columna y realizar la cromatografía según el gradiente siguiente:

ES 2 122 912 A1

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
30	100	0
90	80	20
100	0	100
125	0	100
130	100	0

A: Tris-AcOH 20 mM (pH 8,5)
B: Tris-AcOH 20 mM; AcONH₄ 0,8 M (pH 8,5)
El flujo empleado es de 4 mL/min

5 10 5. Seguir el curso de la cromatografía detectando la A₂₈₀ a la salida de la columna. Recoger los picos que salen de la columna entre los minutos 75 y 90, pues es entonces cuando eluye el PCI recombinante.

15 6. Localizar las fracciones recogidas que contienen PCI recombinante mediante determinación de la actividad inhibidora de CPA (usando como blancos fracciones sin PCI, por ejemplo correspondientes a los minutos 60-70) o, en el caso de mutantes no activos, por ELISA. Reunir las fracciones con PCI, que constituyen el material de la etapa 2.

20 *Segunda concentración por cromatografía de fase reversa usando minicolumnas sep-pak C₁₈*

Este paso no es siempre necesario. El material de la etapa anterior se concentra de nuevo mediante una minicolumna Sep-Pak C₁₈ con el fin de reducir su volumen y eliminar las sales. El procedimiento a seguir es el siguiente:

25 1. Pretratar una columna pasándole 50 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y luego 100 mL de agua Mono-Q.

2. Pasar el material de la etapa 2 por un filtro de 0,22 μ m y a continuación por la columna.

30 3. Lavar la columna una vez con 100 mL de agua.

4. Eluir el retenido con 30 mL de isopropanol al 30%. Recogerlo en un tubo de 50mL.

35 5. Evaporar el retenido en el rotovapor hasta un volumen aproximadamente 1/10 del inicial. Esta disolución es el material de la etapa 3.

Cromatografía HPLC de fase reversa

40 El último paso de la purificación del PCI recombinante es una cromatografía HPLC de fase reversa. La columna utilizada fue una C₄ semipreparativa, la Vydac 214TP1010 (1,0 x 25 cm), que tiene un tamaño de partícula de 10 μ m y un diámetro de poro de 30 nm. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Preparar los tampones A y B, que son los siguientes:

45 -Tampón A: Agua Mono-Q con un 0,1% de TFA.

-Tampón B: Acetonitrilo con un 0,1% de TFA.

50 Filtrar y desgasificar ambos tampones.

2. Equilibrar la columna con una mezcla 80% A + 20% B a un flujo de 1,4 mL/min al menos durante 20 min.

55 3. Mientras la columna se está equilibrando centrifugar el material de la etapa 3 a 10000 xg durante 5 a 10 min.

4. Cargar la muestra en la columna y realizar la cromatografía según el gradiente siguiente:

60

ES 2 122 912 A1

Tiempo (min)	%A	%B
0	80	20
5	80	20
45	60	40
50	20	80
55	20	80
57	80	20

A: H₂O + 0,1%TFA
 B: CH₃CN + 0,1%TFA
 El flujo es de 1,4 mL/min

5. Recoger en una fracción el pico del PCI, que aparece hacia los 35 a 40 min y que es ampliamente mayoritario respecto al resto de picos. Si se desea, comprobar la presencia de PCI mediante determinación de la actividad inhibitoria de CPA usando otras fracciones como blanco.

6. Liofilizar la fracción anterior, obteniéndose así el PCI purificado.

4.A.3. *Obtención de una variante mutante mediante mutagénesis por PCR con objeto de determinar el dominio estructural del PCI responsable del efecto inhibitorio del crecimiento celular.*

Para determinar si el efecto inhibitorio del crecimiento celular del PCI está relacionado con su actividad inhibitoria de carboxipeptidasa o con su particular topología de notina se realizaron ensayos de inhibición celular con una forma mutante. Concretamente se ha diseñado la delección de los tres aminoácidos C-terminales dando lugar a la forma PCIdeY37V38G39 (o PCIdeYVG). Esta forma fue diseñada y construida debido a que mantiene la estructura y topología del PCI silvestre. Esto se infiere de que presenta similar comportamiento cromatográfico que la forma silvestre y que es detectable por anticuerpos antiPCIwt. También mediante simulación por computador (por dinámica molecular mediante el programa GROMOS) presentó un comportamiento similar a la forma silvestre tras 300 ps, de dinámica. Por otra parte esta delección daba lugar a un PCI con su actividad inhibitoria de carboxipeptidasa fuertemente disminuida (K_i a nivel micromolar, lo que representa una disminución de la capacidad inhibitoria de 3 órdenes de magnitud).

El mutante fue construido mediante mutagénesis por PCR siguiendo en general un procedimiento diseñado en nuestro grupo de investigación (Juncosa M. et al. (1994) *BioTechniques*, 16, 820-821). La construcción se realiza sobre el DNA del gen sintético del PCI (Molina M.A. et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138) de la siguiente forma:

- Se toman 4 μ L de una disolución de DNA molde de 1,25 μ g/mL de concentración.

- Se añaden 2mL de dNTPs (Boehringer Mannheim), de una disolución 200 mM de los mismos, 17 mL de polimerasa Taq (Ecogen) y 10 mL del tampón (x10) de Taq y 5 mL del oligonucleótido cebador universal. El oligonucleótido utilizado para obtener la delección del PCI objeto de la presente invención es:

5'-CGA ATT CCG GTC GAC CTA TTA CGG GCC GCA GGT ACG AGC-3'

- Se añade agua hasta 100 μ L.

- El proceso de termociclado (Minicycler PTC-150, MJ Research) sigue la pauta siguiente: tras precalentar a 94 °C, se mantiene la muestra 1,5 min a 94 °C, 1 min a 55°C, 1 min a 72 °C y finalmente la extensión final de 5 min a 72°C. Se realizan 30 ciclos.

- Se determina la presencia del DNA amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa (Sambrook. J. et al., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.).

- Se purifica el DNA del gel de agarosa mediante el kit Mermaid (Amersham).

- Se digiere el DNA mediante los enzimas de restricción XbaI y EcoRI (1 unidad de cada uno por μ g de DNA).

- se purifica el DNA del gel de agarosa mediante el kit Mermaid (Amersham).

- Se liga el DNA digerido al vector M13mp18 previamente digerido con los mismos enzimas de restricción XbaI y EcoRI y en las mismas condiciones.

- Se transforman 10 μ L de la mezcla de ligación en 100 μ L de células de *E. coli* hechas competentes de acuerdo con el procedimiento estándar (Sambrook, J. et al., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.). Se utiliza como cepa de *E. coli* la TG1 (*supE hsd.5 thi.-(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ_M15]*).

5 - Como controles se usan alícuotas de células competentes transformadas con TE y con una disolución de RF DNA de M13mp18. Una vez obtenidas las calvas resultado de la transformación, se analizan por secuenciación de DNA (Sanger F. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467) y se seleccionan las que han incorporado la mutación deseada.

10 - Finalmente se recupera el gen mutado por digestión con los enzimas de restricción y se procede a su introducción en el vector de expresión pIN-III-*ompA*-3 (Molina M.A. et al. (1992) *Gene*, 116, 129-138; Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.). La obtención, purificación y caracterización del PCI mutante se realiza igual que lo descrito en los apartados 4.A.1 y 4.A.2.

15 *4.A.4. Preparación de la cola C-terminal del PCI con objeto de determinar el dominio estructural del PCI responsable del efecto inhibitor del crecimiento celular.*

20 La obtención del pentapéptido H-Gly-Pro-Tyr-Val-Gly-OH, correspondiente a la cola C-terminal del PCI, se realizó mediante síntesis en fase sólida en una resina Wang (NovaBiochem) (Wang S. S. (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 1328) utilizando la estrategia Fmoc/^tBu (Chang C. D. & Meienhoffer J. (1978) *Int. J. Peptide Protein Res.*, 11, 246). La incorporación de los Fmoc-aminoácidos (Sigma) se realizó mediante preactivación con 3 eq. De diisopropilcarbodiimida (DCI) (Sigma) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Sigma), siendo los acoplamientos de 1 h. Finalmente, se liberó el péptido de la resina con un tratamiento con 95% de ácido trifluoroacético (TFA) durante 90 min. Se determinó la pureza por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Beckman) y se identificó el péptido por MALDI-TOF (Kratos).

4.B. Ensayos de proliferación celular

30 Se han realizado diversos ensayos de proliferación con varias líneas celulares tumorales, en ausencia y en presencia de diversas concentraciones de PCI recombinante. De esta forma se ha podido establecer que dicha proteína inhibe, en mayor o menor medida, el crecimiento de la mayoría de líneas celulares ensayadas.

35 Los ensayos de proliferación realizados han sido de tres tipos:

4.B.1. Ensayos de proliferación por recuento del número de células (mediante hemocitómetro).

40 El material, medios y disoluciones empleados en esta experiencia, así como en varias de las siguientes fueron:

- Medio básico DMEM (Sebak-Fontlab, Alemania)

45 - Medio completo con un 10% de suero fetal bovino (FBS)(DMEM+10%FBS): Se prepara mezclando 200 mL de DMEM, 1 mL de disolución de piruvato 100 mM (Whitaker, USA), 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL (Gibco, USA) y 20 mL de FBS (Biological Industries, Israel).

50 - Medio completo con un 10% de suero artificial (BMS) (DMEM+10%BMS): Se prepara como el medio completo con 10% de FBS, pero añadiendo 20 mL de BMS en lugar de FBS.

- Disolución salina EBSS (Eagle's Balanced Salt Solution). Su composición es la siguiente: 0,4 g/L de KCl; 6,8 g/L de NaCl; 2,2 g/L de NaHCO₃; 0,14 g/L de NaH₂PO₄.H₂O; 1 g/L de glucosa y 0,2 g/L de EDTA.

55 - Disolución de tripsina: Se prepara disolviendo 0,5 g de tripsina (Difco, Alemania) con 0,2 g de EDTA, 8 g de NaCl, 400 mg de KCl y 350 mg de citrato sódico en 1 L de agua destilada. La mezcla se esteriliza por filtración en un equipo adecuado (Nalgene, USA) con un filtro de 0,22 μ m de baja adsorción de proteínas (Gelman, Alemania).

60 - Disolución de azul de tripano (Merck, Alemania)

ES 2 122 912 A1

- Frascos Roux de cultivo de plástico estériles de 25 cm² (Nunc, Dinamarca)
- Tubos de centrifuga estériles de 15 y 50 mL (Nunc, Dinamarca)

5 En este ensayo, con el fin de determinar si la presencia en el medio de cultivo produce algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares, se calcula el número final de células cuando el control llega a monocapa, en presencia y en ausencia de inhibidor. El cálculo se realiza por recuento directo del número de células mediante tripsinización y posterior recuento en un hemocitómetro. El procedimiento detallado es el siguiente:

10 1. En tres frascos de cultivo de 25 cm² se siembran 5x10⁵ células en cada uno y se añade un volumen total de medio de cultivo (DMEM con un 10% de suero fetal de vaca o suero sintético BMS, según el ensayo) de 5 mL:

15 - Un primer frasco es el control, y no se le añade PCI.

- A un segundo frasco se le añade PCI unas horas después de iniciado el cultivo, una vez que las células se han adherido al fondo del frasco. Este tipo de ensayo se define como de post-adhesión.

20 - A un tercer frasco se le añade PCI en el mismo momento de inicio del cultivo, antes de que las células hayan tenido tiempo de adherirse al fondo de frasco, constituyendo el ensayo de pre-adhesión.

25 2. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO₂. El medio contenido en los frascos se cambia cada 3-4 días. Al frasco control se le añade medio libre de PCI y a los otros dos medio con PCI.

30 3. Cuando el cultivo de uno de los frascos llega a la situación de monocapa (o bien tras un número determinado de días) se procede a contar el número de células en cada uno de ellos. Para ello, en primer lugar se tripsinizan las células, de acuerdo con los pasos siguientes:

3.1. Se retira el medio de cultivo del frasco. Se limpian las células con 1 mL de tampón EBSS durante 1 minuto. Se retira el EBSS.

35 3.2. Se añade al frasco 0,5 mL de una disolución de tripsina 0,5 g/L y se mantiene hasta que se observa en el microscopio invertido que las células se han desenganchado del frasco (adoptan una morfología redonda y refringente). Para acabar de separarlas se da un golpe seco al frasco. La tripsina se inactiva añadiendo 1 mL de medio completo (que lleva inhibidor de tripsina).

40 3.3. Se recoge con una pipeta Pasteur el medio con las células y se centrifuga en un tubo cónico a 1500 rpm durante 10 minutos para recoger las células.

3.4. Se elimina el sobrenadante, se resuspende el sedimento en seco y se añade 1 mL de medio de cultivo.

45 A continuación se procede al recuento del número de células. Para ello se toma una alícuota de 10 µL y se coloca en un tubo eppendorf. Se añaden 10 µL de una disolución del colorante azul tripano, se mezcla bien, y se toman dos alícuotas de 10 µL de la mezcla, que se colocan en las dos zonas de un hemocitómetro, que se sitúa en el microscopio invertido.

50 Las células vivas se observan refringentes y claras, mientras que las muertas se ven opacas y teñidas de azul, ya que el colorante sólo es capaz de penetrar en las células muertas. Se cuenta el número total de células de la zona W del hemocitómetro, diferenciando las vivas de las muertas. A partir de ese recuento se calcula el número total de células en la suspensión inicial (que será el número total de células que había en el cultivo) multiplicando la cifra obtenida por 2x10⁴. La viabilidad (en %) se calcula dividiendo el número de células vivas por el total de células contadas y multiplicando por 100.

El efecto que produce la presencia de PCI en el medio se expresa como % de inhibición del crecimiento celular, que se calcula de acuerdo con la fórmula:

60
$$\%Inh. = 100 - \left(\frac{N^{\circ} \text{ cél. vivas control} - N^{\circ} \text{ cél. vivas frasco con PCI}}{N^{\circ} \text{ cél. vivas control}} \times 100 \right)$$

ES 2 122 912 A1

El efecto de la presencia del PCI también se puede expresar empleando el % de crecimiento celular relativo a los controles (sin PCI), que se calcula:

$$\%Crec. = \frac{N^{\circ} \text{ cél. vivas control} - N^{\circ} \text{ cél. vivas frasco con PCI}}{N^{\circ} \text{ cél. vivas control}} \times 100$$

Se realizaron ensayos de proliferación celular por recuento del número de células con las líneas siguientes:

-MDAPanc-3: Línea de adenocarcinoma pancreático humano establecida por Frazier (Frazier M. et al. (1990) *Pancreas*, 5, 8-16) a partir de una metástasis a hígado de un adenocarcinoma pancreático moderadamente diferenciado.

-IBF-CP3: Línea de adenocarcinoma pancreático humano moderadamente diferenciada establecida por Fernández (Fernández E. et al. (1994) *Cancer*, 73, 2285-2295).

-HIT: Línea transformada de insulinoma de hámster (Robert F. et al (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4339-4343)

Con las líneas de adenocarcinoma pancreático humano MDAPanc-3 e IBF-CP3 se realizaron ensayos de pre y post-adhesión empleando concentraciones de PCI de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. El recuento del número de células se llevó a cabo una vez los cultivos control habían llegado a confluencia. Los resultados de los ensayos se presentan en la Tabla 1 y las Figuras 1-2.

TABLA 1
Porcentaje de Inhibición del crecimiento

Línea	5 $\mu\text{g PCI/mL}$ Preadhesión	5 $\mu\text{g PCI/mL}$ Postadhesión	10 $\mu\text{g PCI/mL}$ Preadhesión	10 $\mu\text{g PCI/mL}$ Postadhesión
MDAPanc-3	20,7 \pm 6,9	19,1 \pm 14,5	14,6 \pm 14,2	14,3 \pm 12,4
IBF-CP3	120,4 \pm 14,2	123,7 \pm 19,3	11,6 \pm 8,5	15,1 \pm 8,3

Como se puede observar, en el caso de las dos primeras líneas se produce una inhibición significativa del crecimiento celular, tanto en los ensayos pre como post-adhesión, a las dos concentraciones de PCI estudiadas. No existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la proliferación celular entre los cuatro tipos de experimentos. En el caso de la línea de insulinoma de hámster HIT, se realizaron ensayos postadhesión a concentraciones de PCI de 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$. EL PCI se añadió un día después de iniciados los cultivos, y el recuento del número de células se llevó a cabo 4 días más tarde.

TABLA 2
Porcentaje de Inhibición del crecimiento

Línea	10 $\mu\text{g PCI/mL}$ Post-adhesión	50 $\mu\text{g PCI/mL}$ Post-adhesión
HIT	43,0 \pm 22,8	60,1 \pm 28,3

El resultado, que se presenta en la Tabla 2 y Figura 3. fue una clara inhibición del crecimiento celular, superior a la observada en el caso de las líneas anteriores. y más marcada a una concentración de PCI de 50 $\mu\text{g/mL}$.

4.B.2. *Ensayo de proliferación por determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio.*

4.B.2.a. *Ensayo de proliferación por determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio en células de la línea de adenocarcinoma pancreático Capan-1 creciendo en medio con suero.*

ES 2 122 912 A1

Además del detallado en el Apartado 4.B.1., el material empleado en esta experiencia fue el siguiente:

-Kit EZ4U (Biomedica, Austria)

5 -Tampón PBS. Su composición es la siguiente: NaCl 140 mM; Na₂HPO₄ 7,5 mM; NaH₂PO₄ 2,5 mM. Su pH se ajusta a 7,5 con NaOH o ácido fosfórico.

-Placas de cultivo de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca).

10 En este ensayo, con el fin de determinar si la presencia de PCI en el medio de cultivo produce algún efecto sobre el crecimiento *in vitro* de las líneas celulares, se evaluó la cantidad final de células tras un número determinado de días, en presencia y en ausencia de inhibidor. El número final de células se determinó mediante sales de tetrazolio (kit EZ4U) que al ser añadidas a los cultivos son reducidas por enzimas mitocondriales de las células, dando derivados de formazán cuyo color es distinto. La cantidad
15 de derivados formados depende del número de células presentes.

El protocolo detallado que se siguió fue:

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo, en 48 de ellos. De
20 estos 48:

- En 8 pocillos (control) se añadieron 200 μ L de medio completo (DMEM+10%FBS) sin PCI.

- En 8 pocillos se añadieron 200 μ L de medio completo con 0,1 μ g PCI/mL

25 - En 8 pocillos, medio completo con 1 μ g PCI/mL

- En 8 pocillos, medio completo con 10 μ g PCI/mL

30 - En 8 pocillos, medio completo con 50 μ g PCI/mL

- En 8 pocillos, medio completo con 200 μ g PCI/mL

2. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO₂. El
35 medio contenido en los pocillos se cambió cada 3-4 días. El medio viejo se aspiró con una pipeta Pasteur. A los pocillos control se les añadió medio libre de PCI y a los otros medio con idéntica concentración de PCI a la que tenían previamente.

3. Tras un determinado número de días, se evaluó el número de células por pocillo mediante el si-
40 guiente procedimiento:

3.1. Se aspiró el medio de cultivo de cada pocillo, y se lavaron todos ellos con 200 μ L de tampón PBS, que se retiró.

45 3.2. Se añadieron a cada pocillo 200 μ L de PBS fresco. Se colocaron también 200 μ L de PBS en tres pocillos que no tuvieran células (que fueron los blancos).

3.3. Se colocó en cada pocillo 20 μ L de disolución de sustrato (sal de tetrazolio). Se incubó de 2 a 5
50 h a 37°C.

3.4. Se agitó ligeramente, y leyó la absorbancia a 450 y a 620 nm de cada pocillo. La A₄₅₀ nos indica la cantidad de derivados de formazán aparecidos, la A₆₂₀ la presencia de desechos celulares.

55 Para calcular el resultado del ensayo, se procedió como sigue: de la A₆₂₀ de cada pocillo se sustrajo la media de las A₆₂₀ de los blancos. A continuación, de la A₄₅₀ de cada pocillo se restó el resultado de la sustracción anterior, así como la media de la A₄₅₀ de los blancos. El resultado así obtenido es directamente proporcional a la cantidad de células presentes en el pocillo. A continuación se obtuvo la media y la desviación típica de los resultados de los pocillos sometidos a idéntico tratamiento

60 El efecto de la presencia del PCI se puede expresar empleando el porcentaje de crecimiento celular relativo a los controles (sin PCI), que se calcula sencillamente:

ES 2 122 912 A1

$$\% \text{ Crec.} = \frac{\text{Media resultados pocillos control} - \text{Media resultados pocillos con PCI}}{\text{Media de resultados control}} \times 100$$

Se llevó a cabo un ensayo de proliferación con determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio utilizando la línea celular Capan-1. Se trata de una línea de adenocarcinoma pancreático humano (ATCC nº HTB-79), establecida por Fogh G. et al. (1977) *J. Natl. Cancer Inst.*, 58, 209-214 y Fogh J. et al. (1977) *J. Natl. Cancer Inst.*, 59, 221-226, a partir de una metástasis en hígado.

Las células se cultivaron como se ha explicado durante 23 días, pasados los cuales se evaluó el crecimiento celular por pocillo mediante sales de tetrazolio. Los resultados que se obtuvieron se recogen en la Tabla 3, donde se expresa la media, desviación estandard y error estandard del crecimiento celular relativo a los controles.

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando la *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que para todos los tratamientos las medias son significativamente diferentes a la media control con un nivel de significación muy elevado (inferior a 0,001; lo que equivale a un nivel de confianza de más del 99,9%). Por tanto, se puede concluir que el PCI tiene efectos inhibitorios muy significativos sobre el crecimiento de la línea Capan-1 en medio DMEM+10%FCS.

TABLA 3

Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Concentración de PCI en el medio ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Media	Desviación estandard	Error estandard
(control)	100	26,1	9,9
0,1	19,4	8,3	2,9
1	17,1	9,6	3,4
10	50,0	16,5	5,8
50	44,8	14,5	5,2
200	43,3	10,1	3,6

Los datos se representan gráficamente en la Figura 4. Como se puede observar, tras 23 días de cultivo, el crecimiento de las células Capan-1 se ve inhibido de forma muy significativa por la presencia de PCI en el medio de cultivo a todas las concentraciones ensayadas. A concentraciones de 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa que el crecimiento celular no llega al 20% del de las células control, es decir, el PCI provoca una inhibición del crecimiento de más del 80%. A concentraciones de 10, 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la inhibición del crecimiento resulta ser similar, de alrededor del 50%.

4.B.2.b. *Ensayo de proliferación por determinación indirecta del número de células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 creciendo en medio sin suero más variantes del PCI.*

Se realizaron ensayos como los del Apartado 4.B.2.a. con la principal diferencia de que las células se hicieron crecer en medio sin suero fetal bovino durante los días del ensayo. Además del material detallado en los Apartados 4.B.1 y 4.B.2, el material empleado fue el siguiente:

-Medio sin suero (DMEM - FBS): se prepara mezclando 200mL de DMEM, 1mL de disolución de piruvato 100mM, 0.2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL, BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final del 1%.

ES 2 122 912 A1

- "Cola": péptido sintético correspondiente a los últimos cinco aminoácidos del extremo C-terminal del PCI, H-Gly-Pro-Try-Val-GlyOH.

5 - Medio libre de suero (SFM): se prepara mezclando 200mL de DMEM, 1mL de disolución de piruvato 100mM, 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL, BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final del 1%, transferrina a una concentración final 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y selenito sódico a una concentración final 5 ng/mL.

10 - Medio completo con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (DMEM+10%FBS): Se prepara mezclando 200 mL de DMEM, 1 mL de disolución de piruvato 100 mM (Whitaker, USA), 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL (Gibco, USA) y 20 mL de FBS (Biological Industries, Israel).

- Mutante delYVG: mutante del PCI obtenido de forma recombinante al cual se le han deleccionado los últimos tres aminoácidos del extremo C-terminal, es decir, Tyr-Val-Gly.

15 - Disolución de EGF: se prepara una disolución 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EGF en 10mM ácido acético-0,2%BSA, que se esteriliza por filtración. Posteriormente se realiza una dilución 1:10 de la disolución madre también en 10mM ácido acético-0,2%BSA.

20 - Disolución de insulina: se prepara una disolución stock de insulina 10 mg/mL en agua milliQ, que se esteriliza por filtración. Las diluciones posteriores se realizan en PBS-0,1%BSA.

25 - Disolución de IGF-1: se prepara una disolución 3.3 μM de IGF-1 en 10mM ácido acético-0,2%BSA, que se esteriliza por filtración. Posteriormente se realiza una dilución 1:10 de la disolución madre también en 10mM ácido acético-0,2%BSA.

Se realizaron dos tipos de ensayo, el primero consistió en el tratamiento de células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 con PCI wt y "cola" añadido al medio de cultivo en ausencia de suero.

30 Se siguió el protocolo que a continuación se detalla:

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo, en 24 de ellos. Las células se sembraron en medio completo (DMEM+ 10%FBS).

35 2. Después de 24h, tras haber permitido la adhesión de las células a la superficie del pocillo, se retiró el medio de los pocillos y se trataron de la siguiente forma:

40 - En 6 pocillos (control): se añadieron 200 μL de medio sin suero (DMEM-FBS) y sin "cola".

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de medio sin suero con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI nativo.

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de medio sin suero con 0,128 μg "de cola" /mL.

45 - En 6 pocillos, medio sin suero con 6.4 μg "de cola" /mL.

50 3. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO₂. El medio contenido en los pocillos se cambió cada 3-4 días. El medio viejo se aspiró con una pipeta Pasteur. A los pocillos control se les añadió medio libre de "cola" y a los otros medio con idéntica concentración de "cola" a la que tenían.

4. Tras 16 días, se evaluó el crecimiento celular por pocillo, según el procedimiento detallado en el protocolo del apartado 4.B.2.a.

55 En la Tabla 4 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación con determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio llevado a cabo con la línea celular Capan-1, creciendo en medio sin suero durante 16 días con los tratamientos ya explicados.

60

TABLA 4

Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	14,62	6,5
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI wt	107,6	10,64	4,7
0,128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	81,95	14,39	6,4
6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	77	10,59	4,7

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando una t de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que cuando hacemos crecer las células en unas condiciones que no son las óptimas, es decir, sin suero y sin selenito sódico ni transferrina, esenciales para estas células (tal como se muestra en Fernández et.al,1994) las células no crecen normalmente y no se observa ningún efecto del PCI wt, posiblemente porque las células ya no están creciendo óptimamente en la situación control. Sin embargo incluso en estas condiciones se observa un efecto inhibitor de la "cola" que es claramente significativo ($\alpha=0,025$) a concentraciones bajas de "cola" y menos significativo ($\alpha=0,1$) a concentraciones altas de "cola".

Los datos se representan gráficamente en la Figura 5. Como se puede observar, tras 16 días de cultivo con medio sin suero, el crecimiento de las células Capan-1 no se ve alterado por la presencia de PCI wt en el medio. Mientras que la presencia de la "cola" a una concentración de 0,128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibe un 19,34% el crecimiento, y a una concentración de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la inhibición es similar, del 18%, aunque menos significativa.

Se realizaron otro tipo de ensayos, creciendo las células también en medio sin suero; fueron estudios a tiempo corto, 72h, y de competencia con un factor de crecimiento más el PCIwt, el PCIdeYVG o la "cola". Los factores de crecimiento estudiados han sido tres, el EGF, la insulina y el IGF-1. El protocolo seguido ha sido el mismo para los tres factores y lo único que ha variado ha sido la concentración utilizada de cada uno de ellos que fue de 10ng/mL, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 20 ng/mL respectivamente para el EGF, la insulina y el IGF-1. El protocolo seguido se detalla a continuación

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo en 42 de ellos. Las células se sembraron en medio completo (DMEM+ 10%FBS).

2. Después de 72h, tras haber permitido la adhesión de las células a la superficie del pocillo así como la división de las mismas, se retiró el medio de los pocillos y para eliminar los restos de suero se añadieron 200 μL de PBS a cada pocillo.

3. Se retiró el PBS y se añadieron 200 μL de DMEM-FBS.

4. Después de 24h se retiró el medio y se aplicaron los siguientes tratamientos:

- En 6 pocillos (control): se añadieron 200 μL de medio libre de suero (SFM).

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM con una concentración final 10 ng/mL de EGF o 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina o 20 ng/mL de IGF-1.

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCIwt a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ES 2 122 912 A1

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCIdel YVG a una concentración final de 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y "cola" a una concentración final de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCIwt a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ combinado con "cola" a una concentración final de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

10 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCIdel YVG a una concentración final de 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ combinado con "cola" a una concentración final de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

15 4. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO₂.

5. Tras 72 horas, se evalúa el crecimiento celular por pocillo, según el procedimiento detallado en el protocolo del apartado 4.B.2.a.

20 En las Tabla 5, 6 y 7 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación con determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio llevado a cabo con la línea celular Capan-1, creciendo en SFM durante 72 horas con los tratamientos ya explicados.

TABLA 5

Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	21,11	8,62
EGP10ng/mL	106,66	20,98	8,85
EGP10ng/mL + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt	30,63	6,65	2,71
EGF10ng/mL + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt + 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	51,25	12,87	5,25
EGF10ng/mL + 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelIVG	40,83	9,98	4,07
EGF10ng/mL + 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelIVG + 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	12,63	4,43	1,8
EGF10ng/mL + 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	28,33	4,65	1,9

TABLA 6

Crecimiento (porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	7,46	3,04
Insulina 5µg/mL	292,86	31,73	12,95
Insulina 5µg/mL + 50µg/mL PCIwt	44,10	4,66	1,90
Insulina 5µg/mL + 50µg/mLPCIwt + 6,4µg/mL "cola"	46,10	5,94	2,42
Insulina 5µg/mL + 46µg/mLPCIdelYVG	44,60	2,80	1,14
Insulina 5µg/mL + 46µg/mLPCIdelYVG + 6,4µ g/mL "cola"	39,94	3,34	1,36
Insulina 5µg/mL + 6,4µg/mL "cola"	52,58	10,95	4,47

TABLA 7

Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	4,69	1,92
IGF-1 20ng/mL	157,87	8,10	3,31
IGF-1 20 ng/mL + 50µg/mL PCIwt	31,11	9,55	3,89
IGF-1 20ng/mL + 50µg/mLPCIwt + 6,4µg/mL "cola"	53,76	10,10	4,12
IGF-1 20ng/mL + 46µg/mLPCIdelYVG	36,81	4,09	1,67
IGF-1 20ng/mL + 46µg/mLPCIdelYVG + 6,4µ g/mL "cola"	58,48	11,62	4,75
IGF-1 20ng/mL + 16,4µg/mL "cola"	73,31	19,13	7,81

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando una *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que en presencia de los factores de crecimiento (insulina y IGF-1) solos se observa una clara estimulación respecto al control, del 193% para el caso de la insulina y del 58% para el IGF-1 ($\alpha=0,001$). Mientras que para el caso del EGF sólo, a la concentración ensayada, no se observan diferencias respecto a la situación control. Para los tratamientos con combinados de PCIwt, PCI del YVG o "cola" junto al EGF se observa una inhibición muy significativa del crecimiento respecto a la situación control ($\alpha=0,001$), que oscila entre el 60 y el 70% de inhibición. Efecto que se mantiene al hacer un tratamiento combinado de PCIwt o PCIdel YVG más cola y EGF. Los tratamientos combinados con insulina resultan igualmente fuertemente inhibitorios ($\alpha=0,001$) para cualquiera de ellos, oscilando en este caso la inhibición entre el 50 y 60% respecto a la situación control. Y finalmente en el caso de tratamientos combinados con el IGF-1 también se observan claros efectos inhibitorios ($\alpha=0,001$) en la mayoría de tratamientos), oscilando la inhibición desde el 30

ES 2 122 912 A1

al 70% respecto a la situación control.

Los datos se representan gráficamente en la Figura 6. Como se puede observar, tras 72 horas de cultivo en SFM, el crecimiento de las células Capan-1 se ve claramente estimulado por la presencia de insulina y IGF-1 en el medio, mientras que el EGF no afecta al crecimiento. La presencia del PCIwt, PCIdeYVG, "cola" o combinaciones con la "cola" en competencia con el EGF, la insulina o el IGF-1 produce una disminución clara del crecimiento celular.

4.B.2.c. *Ensayo de proliferación por determinación indirecta mediante sales de tetrazolio en células de la línea de adenocarcinoma pancreático Panc-1.*

Se procedió a realizar el mismo tipo de ensayo que se había hecho para la línea Capan-1 con otra línea celular, Panc-1, también de adenocarcinoma pancreático humano. Se trata de una línea de adenocarcinoma pancreático humano ATCC n° CRL 1469, establecida por Lieber M. et al. (1975) *In. J. Cancer*, 15, 741-747. De origen ductal, poco diferenciada.

Además del material detallado en los Apartados 4.B.1 y 4.B.2, el material empleado fue el siguiente:

- Medio sin suero (RPMI - FBS): se prepara mezclando 200mL de RPMI, 1mL de disolución de piruvato 100mM, 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL, BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final del 1%, transferrina a una concentración final 5 μ g/mL y selenito sódico a una concentración final 5 ng/mL.

- Medio completo con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (RPMI+10%FBS): Se prepara mezclando 200 mL de RPMI, 1 mL de disolución de piruvato 100 mM (Whitaker, USA), 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL (Gibco, USA) y 20 mL de FBS (Biological Industries, Israel).

- Medio libre de suero (SFM): se prepara mezclando 200mL de RPMI, 1mL de disolución de piruvato 100mM, 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL, BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración final del 1%, transferrina a una concentración final 5 μ g/mL y selenito sódico a una concentración final 5 ng/mL.

- Mutante del YVG: mutante del PCI obtenido de forma recombinante al cual se le han deleccionado los últimos tres aminoácidos del extremo C-terminal, es decir, Tyr-Val-Gly.

- Disolución de EGF: se prepara una disolución 100 μ g/mL de EGF en 10mM ácido acético- 0,2%BSA, que se esteriliza por filtración. Posteriormente se realiza una dilución 1:10 de la disolución madre también en 10mM ácido acético-0,2%BSA.

- Disolución de insulina: se prepara una disolución stock de insulina 10 mg/mL en agua milliQ, que se esteriliza por filtración. Las diluciones posteriores se realizan en PBS-0,1%BSA.

- Disolución de IGF-1: se prepara una disolución 3.3 μ M de IGF-1 en 10mM ácido acético-0,2%BSA, que se esteriliza por filtración. Posteriormente se realiza una dilución 1: 10 de la solución madre también en 10mM ácido acético 0,2%BSA.

Se realizaron dos tipos de experimentos, al igual que para la línea Capan-1 creciendo en suero fetal bovino y sin el mismo. El protocolo seguido para el ensayo creciendo en RPMI más suero fetal bovino fue el mismo que el utilizado para la línea Capan-1 con pequeñas variaciones, dada la diferencia en el tiempo de duplicación entre las dos líneas. Los ensayos se realizaron con el PCI nativo (PCIwt) y con el PCI mutante (PCIdeYVG). El protocolo se detalla a continuación:

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 2000 células por pocillo en 30 de ellos para los ensayos con PCIwt y en 36 para los ensayos con PCIdeYVG. De estos 30 o 36:

- En 6 pocillos (control) se añadieron 200 μ L de medio completo (RPMI+10%FBS) sin PCIwt o PCIdeYVG.

- En 6 pocillos se añadieron 200 μ L de medio completo con 0.1 μ g PCIwt/mL, o 0.092 μ g PCIdeYVG/mL.

- En 6 pocillos, medio completo con 1 μ g PCIwt/mL o 0.92 μ g PCIdeYVG/mL

ES 2 122 912 A1

- En 6 pocillos, medio completo con 10 μg PCIwt/mL o 9.2 μg PCIdelYVG/mL
- En 6 pocillos, medio completo con 50 μg PCIwt/mL o 23 μg PCIdelYVG/mL
- 5 - En 6 pocillos, medio completo con 46 μg PCIdelYVG/mL

2. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO₂. El medio contenido en los pocillos se cambió cada 3-4 días. El medio viejo se aspiró con una pipeta Pasteur.
 10 A los pocillos control se les añadió medio libre de PCIwt o PCIdelYVG y a los otros medio con idéntica concentración de PCIwt o PCIdelYVG a la que tenían.

3. Tras 10 días, se evaluó el crecimiento celular por pocillo, según el procedimiento detallado en el protocolo del apartado 4.B.2.a.

15 En la Tabla 8 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación con determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio llevado a cabo con la línea celular Panc-1, creciendo en medio con suero durante 10 días tratadas con diferentes concentraciones de PCI wt.

TABLA 8

Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	8,14	3,64
0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt	90,85	1,89	0,85
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt	84,55	6,41	2,87
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt	82,22	6,19	2,77
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt	71,14	8,11	3,63

40 A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando una *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que para todos los tratamientos las medias son significativamente diferentes a la media del control con un nivel de significación del 0,05, 0,005, 0,005 y 0,001 para los tratamientos de 0,1, 1,10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente.
 45 Concluyéndose que el PCI tiene efectos inhibitorios significativos sobre el crecimiento de la línea Panc-1 en medio RMI+10%FCS.

50 Los datos se representan gráficamente en la Figura 7. Como se puede observar, tras 10 días de cultivo, el crecimiento de las células Panc-1 se ve inhibido de forma significativa por la presencia de PCIwt en el medio de cultivo a todas las concentraciones ensayadas. La inhibición aumenta a medida que aumenta la concentración de PCI en el medio, siendo el nivel más bajo de inhibición de un 9,15% para la concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el nivel más alto de inhibición es de un 28,86% y corresponde a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

55 A continuación se presentan en la Tabla 9 los resultados obtenidos en el ensayo llevado a cabo con la línea celular Panc-1, creciendo en medio con suero durante 10 días tratadas con diferentes concentraciones de PCI del YVG.

TABLA 9
Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	6,28	2,81
0,092 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelYVG	112,92	6,28	2,81
0,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelYVG	105,43	3,74	1,67
9,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelYVG	105,16	14,24	6,37
23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelYVG	94,85	5,69	2,54
46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIdelYVG	85,51	2,75	1,23

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando una *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que el PCIdelYVG a concentraciones bajas, 0,092 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estimula significativamente el crecimiento de la línea celular Panc-1 ($\alpha=0,005$). Mientras que a concentraciones elevadas, 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibe muy significativamente el crecimiento ($\alpha=0,001$). Concluyéndose que el PCIdelYVG tiene efectos tanto estimuladores como inhibidores (dependiendo de la concentración) sobre el crecimiento de la línea Panc-1 en medio RPMI+10%FCS.

Los datos se representan gráficamente en la Figura 8. Como se puede observar, tras 10 días de cultivo, el crecimiento de las células Panc-1 se ve estimulado de forma muy significativa por la presencia de PCIdelYVG en el medio de cultivo a la concentración de 0,092 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo este estímulo del 13%. Por contra a la concentración de 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se produce una inhibición muy significativa del crecimiento de un 15%.

Los ensayos que se realizaron creciendo en medio sin suero fetal bovino fueron muy similares a los realizados con la línea Capan-1 descritos en el apartado 4.B.2.b. El protocolo seguido se detalla continuación:

1. En una placa de cultivo de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo en 42 de ellos. Las células se sembraron en medio completo (RPMI+ 10%FBS).
2. Después de 48h, tras haber permitido la adhesión de las células a la superficie del pocillo así como la división de las mismas, se retiró el medio de los pocillos y para eliminar los restos de suero se añadieron 200 μL de PBS a cada pocillo.
3. Se retiró el PBS y se añadieron 200 μL de RPMI-FBS.
4. Después de 48h se retiró el medio y se aplicaron los siguientes tratamientos:
 - En 6 pocillos (control): se añadieron 200 μL de medio libre de suero (SFM).
 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM con una concentración final 10 ng/mL de EGF o 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina o 20 ng/mL de IGF-1.
 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCItw a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCIdel YVG a una concentración final de 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ES 2 122 912 A1

- En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y "cola" a una concentración final de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCIwt a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ combinado con "cola" a una concentración final de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

10 - En 6 pocillos se añadieron 200 μL de SFM más la concentración indicada de uno de los factores de crecimiento y PCI del YVG a una concentración final de 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ combinado con "cola" a una concentración final de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4. Las células se mantienen en un incubador a 37°C, 87% de humedad relativa y 10% de CO_2 .

15 5. Tras 72 horas, se evalúa el crecimiento celular por pocillo, según el procedimiento detallado en el protocolo del apartado 4.B.2.a.

20 En las Tabla 10, 11 y 12 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación con determinación indirecta del número de células mediante sales de tetrazolio llevado a cabo con la línea celular Panc-1, creciendo en SFM durante 72 horas con los tratamientos ya explicados.

TABLA 10

Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	7,07	2,87
EGF10ng/mL	63,52	11,99	4,89
EGF10ng/mL + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt	15,81	3,45	1,41
EGF10ng/mL + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCIwt + 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	25,95	5,80	2,37
EGF10ng/mL + 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI del YVG	15,53	4,93	2,01
EGF10ng/mL + 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI del YVG + 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	17,61	6,39	2,61
EGF10ng/mL + 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ "cola"	16,23	6,24	2,55

ES 2 122 912 A1

TABLA 11
Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	7,45	4,62
Insulina 5µg/mL	193,47	31,73	15,55
Insulina 5µg/mL + 50µg/mL PCIwt	26,34	3,42	1,40
Insulina 5µg/mL + 50µg/mL PCIwt + 6,4µg/mL "cola"	14,03	3,18	1,30
Insulina 5µg/mL + 46µg/mL PCI del YVG	21,41	3,46	1,41
Insulina 5µg/mL + 46µg/mL PCI del YVG + 6,4µg/mL "cola"	10,49	4,76	1,96
Insulina 5µg/mL + 6,4µg/mL "cola"	24,84	3,18	1,30

TABLA 12
Crecimiento (Porcentaje relativo a la media de los controles)

Tratamiento	Media	Desviación estándar	Error estándar
Control	100	11,41	4,66
IGF-1 20ng/mL	125,65	12,65	5,16
IGF-1 20 ng/mL + 50µg/mL PCIwt	43,43	9,70	3,96
IGF-1 20ng/mL + 50µg/mL PCIwt + 6,4µg/mL "cola"	15,09	3,51	1,43
IGF-1 20ng/mL + 46µg/mL PCI del YVG	33,30	8,12	3,32
IGF-1 20ng/mL + 46µg/mL PCI del YVG + 6,4µg/mL "cola"	21,23	7,19	2,94
IGF-1 20ng/mL + 6,4µg/mL "cola"	17,35	3,95	1,61

A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando una *t* de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento a cada tratamiento con la media de los controles. El resultado fue que en presencia de los factores de crecimiento (insulina y IGF-1) solos se observa una clara estimulación respecto al control, del 93% para el caso de la insulina y del 26% para el IGF-1 ($\alpha=0.001$). Mientras que para el caso del EGF solo, a la concentración ensayada, se observa una inhibición del 36% ($\alpha=0.001$) respecto a la situación control. Para los tratamientos con combinados de PCIwt, PCI del YVG o "cola" junto al EGF

se observa una inhibición muy significativa del crecimiento respecto a la situación control ($\alpha=0,001$), que oscila entre el 75 y el 85% de inhibición. Efecto que se mantiene al hacer un tratamiento combinado de PCIwt o PCI del YVG más cola y EGF. Los tratamientos combinados con insulina resultan igualmente fuertemente inhibitorios ($\alpha=0,001$) para cualquiera de ellos, oscilando en este caso la inhibición entre el 75 y 90% respecto a la situación control. Y finalmente en el caso de tratamientos combinados con el IGF-1 también se observan claros efectos inhibitorios ($\alpha=0,001$), oscilando la inhibición desde el 56 al 85% respecto a la situación control.

Los datos se representan gráficamente en la Figura 9. Como se puede observar, tras 72 horas de cultivo en SFM, el crecimiento de las células Capan-1 se ve claramente estimulado por la presencia de insulina y IGF-1 en el medio, mientras que el EGF produce una inhibición del crecimiento. La presencia del PCIwt, PCI del YVG, "cola" o combinaciones con la "cola" en competencia con el EGF, la insulina o el IGF-1 produce una disminución clara del crecimiento celular.

4.B.3. *Determinación de la curva de crecimiento de la línea celular Capan-1 en presencia y ausencia de PCI*

La curva de crecimiento de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 se determinó cultivando las células en medio DMEM suplementado con 10% de FBS (ver Apartado 4.B.1). Se emplearon placas de seis pocillos, cada uno con 10 cm² de superficie (Nunc, Dinamarca). El número de células sembrado inicialmente por pocillo fue de 1 x 10⁵, y se realizaron cambios de medio cada cuatro días, añadiendo PCI nuevo en el medio en el caso de las células tratadas con PCI.

Se determinaron tres curvas de crecimiento (Figura 10): en ausencia de PCI, y en presencia de PCI a concentraciones de 1 µg/mL, y de 10 µg/mL. Inicialmente se sembraron 45 pocillos-réplica para cada tratamiento. Durante 15 días, se tomaron diariamente tres de los pocillos-réplica de cada tratamiento y se contaron su número de células mediante tripsinización y recuento empleando hemocitómetro (para una descripción de la técnica, ver Apartado 4.B.1). Los resultados del ensayo se pueden observar en la Tabla 13, que muestra los tiempos de duplicación calculados a partir de los datos.

TABLA 13

Tiempos de duplicación celular en función del tratamiento con PCI

Células	Tiempo de duplicación (h)
Control	85
Tratadas con 1 µg/mL	90
Tratadas con 10 µg/mL	130

Es posible apreciar que las células tratadas con una concentración de 10 µg/mL de PCI presentan un crecimiento significativamente más lento que las control, claramente observable a partir de las 300 h. Además la densidad a la cual alcanzan la fase estacionaria, es decir, dejan de dividirse, es significativamente más baja que en las del control (aproximadamente la mitad). En cuanto a las células tratadas con 1 µg/mL de PCI, parecen crecer de forma algo más rápida que las control, y alcanzar la fase estacionaria a una densidad similar a éstas.

4.B.4. *Estudios del pretratamiento con PCI sobre el crecimiento celular.*

Se han realizado diversos experimentos para estudiar el efecto del tratamiento prolongado con PCI sobre el crecimiento de líneas celulares tumorales. La conclusión general de dichos estudios es que en las líneas analizadas, el tratamiento con PCI durante más de 15 días tiene un marcado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las mismas. Dicho efecto se mantiene incluso si se retira el PCI del medio.

Las líneas celulares analizadas fueron Capan-1, ya descrita, e Int-2. Esta última es una línea celular de insulinoma murino derivada de ratones transgénicos desarrollados en el laboratorio de la Dra. Frazier (Frazier, comunicación personal). El medio utilizado para el crecimiento de ambas líneas fue DMEM+10%FBS, y las técnicas de cultivo que se emplearon son idénticas a las anteriormente descritas.

ES 2 122 912 A1

En el caso de la línea Capan-1 se realizaron 2 tipos de ensayos diferentes que se describen a continuación:

a) *Ensayos de proliferación:*

1. Se sembraron dos pocillos de una placa de 12 con 5000 células. Uno de los pocillos se creció con medio (células no pretratadas), y el otro con medio con 50 g/mL de PCI (células pretratadas). Las células se mantuvieron en dichas condiciones durante el tiempo que se indica en la sección de resultados como tiempo de pretratamiento.

2. Dos veces por semana el medio de los pocillos se reemplazó por medio fresco con o sin PCI, y cada vez que en alguno de los pocillos se alcanzó confluencia, las células se tripsinizaron y 1/10 de las mismas se volvió a sembrar en el pocillo originario, el resto de células se descartó o congeló.

3. Una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento deseado, las células se tripsinizaron y se contaron, usándose para iniciar ensayos de proliferación como los descritos en el apartado 4.B.2.a. El número de células que se sembró por pocillo en la placa de proliferación (de 96 pocillos) fue de 2000, sembrándose 7 réplicas para cada tratamiento. Las células se sometieron entonces a tratamiento con distintas concentraciones de PCI, o bien a la ausencia del mismo.

4. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se estimó el número de células por pocillo como se ha descrito en el apartado 4.B.2.a.

b) *Curva de crecimiento*

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de células Capan-1 pretratadas con PCI, así como de células no pretratadas. El protocolo empleado fue idéntico al descrito para los ensayos de proliferación, con la particularidad de que se sembraron el mismo día y empleando las mismas células cinco placas de 96 pocillos distintas, que se revelaron a los 3, 6, 9, 13 y 17 días.

En el caso de la línea Int-2 sólo se llevaron a cabo ensayos de proliferación. Estos se realizaron de forma idéntica a lo descrito en el caso de Capan-1, con la única diferencia que el número de células que se sembró por pocillo en la placa de 96 fue de 500 en lugar de 2000.

En la Figura 11 se presenta el resultado de los tres ensayos de proliferación realizados con la línea celular Capan-1. En uno de ellos el pretratamiento se prolongó durante 28 días y el tratamiento 11 días, en el otro 34 y 18 días y en el otro 30 y 5 días. Los resultados obtenidos en todos los casos fueron similares. El número final de células en los pocillos donde se sembraron células pretratadas que se cultivaron a continuación en ausencia de PCI es aproximadamente la mitad al observado en los pocillos con células no pretratadas cultivadas en el mismo medio. En los pocillos en los que se mantuvo el PCI en el medio, el crecimiento de las células pretratadas resultó incluso algo inferior al observado en ausencia de PCI.

Estos resultados nos llevaron a realizar una nueva serie de experimentos a fin de obtener una curva de crecimiento de las células Capan-1 pretratadas (durante 43 días) y no pretratadas con PCI, curva que se presenta en la Figura 12. Como se puede observar claramente, el crecimiento de las células pretratadas en ausencia de PCI es mucho más lento que el de las no pretratadas, haciéndose la diferencia claramente significativa a partir de los 13 días de cultivo. Las células pretratadas mantenidas en presencia de PCI presentaron un crecimiento aún más lento.

La conclusión que se deriva de estos ensayos es que las células cultivadas durante al menos 28 días en presencia de PCI (a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$) crecen mucho más lentamente que las células control, aunque se les retire el PCI del medio; En otras palabras, el tratamiento con PCI durante al menos 4 semanas parece tener un efecto inhibitorio a largo plazo sobre el crecimiento de las células, efecto que se mantiene aunque la proteína se retire del medio.

En la Figura 13 se pueden observar los resultados de los ensayos de proliferación realizados con la línea celular Int-2 que son muy similares a los obtenidos en el caso de Capan-1. Se realizaron tres ensayos diferentes con tipos de pretratamiento y tratamiento diferentes. Los pretratamientos fueron de 7, 20 y 30 días y los tratamientos respectivos de 7, 8 y 5 días. Al igual que lo que ocurría con Capan-1, las células de Int-2 pretratadas con PCI y cultivadas a continuación en ausencia de la proteína presentan un crecimiento muy inferior, aproximadamente la mitad, al de las células no pretratadas. Si el PCI se mantiene en el medio de cultivo, la tasa de crecimiento de las células pretratadas se ve aún más reducida.

ES 2 122 912 A1

siendo el efecto más importante como más largo ha sido el pretratamiento. Por tanto, el efecto inhibitorio a largo plazo del tratamiento con PCI observado en el caso de Capan-1 se produce también en la línea celular Int-2, y su magnitud es muy similar.

5 4.C. Inhibición de metástasis

4.C.1. Ensayos "in vitro" de invasividad

Para estudiar la posible influencia del PCI en la capacidad invasiva y metastásica de las células tumorales, se ha trabajado con un modelo bien conocido mediante ensayos "in vitro", estudiando la migración de las células a través de una membrana de Matrigel® en presencia o ausencia de PCI.

El material, medios y disoluciones empleados en esta experiencia fueron:

- 15 - Cámaras de invasión BIOCOAT® , MATRIGEL® (Becton Dickinson Labware, Bedford).
 - Medio básico DMEM (Sebak-Fontlab, Alemania)
 - Medio completo con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (DMEM+10%FBS): Se prepara mezclando 20 200 mL de DMEM, 1 mL de disolución de piruvato 100 mM (Whitaker, USA), 0,2 mL de disolución de gentamicina 50 mg/mL (Gibco, USA) y 20 mL de FBS (Biological Industries, Israel).
 - Placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca).
- 25 - Hematoxilina de Delafield: primeramente se preparan las disoluciones A (4 g Hematoxilina, 25 mL alcohol absoluto) y B (40g sulfato aluminico amónico en 400mL de H₂O destilada). Se mezclan y al cabo de 4 o 5 días se filtran y se añade 100mL glicerina y 100mL alcohol metílico. Pasados 4 o 5 días más se filtra y ya se puede utilizar.
- 30 - Agua clorhídrica: 1mL HCl 1N, 199mL H₂O destilada.
 - Eosina: 1gr eosina en 100mL de H₂O destilada. Una vez preparada se añaden unas gotas de ácido acético.
- 35 - Alcohol 96°
 - Medio de montaje (Merck, Alemania).
 - Campana de cultivo de flujo laminar (Telstar, Alemania)
- 40 - Microscopio invertido de contraste de fases (Zeiss, Alemania)
 - Microscopio óptico.
- 45 - Incubador con camisa de agua (Forma Scientific, USA)

En este ensayo, con el fin de determinar si el PCI produce alguna diferencia en la capacidad invasiva de células tumorales "in vitro", se determinó el número de células que habían migrado a través de una membrana de Matrigel®) en presencia o ausencia de PCI en el medio de cultivo. El protocolo detallado es el siguiente:

- 50 1. Se ponen a temperatura ambiente aquellos pocillos de Matrigel® que se vayan a utilizar sobre una placa de 24 vacía.
- 55 2. Se hidratan los pocillos añadiendo 250µL de medio completo atemperado, manteniendo este durante 1,5-2,0 horas.
3. Después de la hidratación, sacar el medio de los pocillos cuidadosamente, posteriormente se añaden 200.000 células en dos pocillos respectivamente. En uno de ellos le añadimos el medio en el que crecen las células y en el otro medio con PCI.
- 60 4. Después de 17 h en cultivo en un incubador a 37°C, 90% humedad relativa y 5% de CO₂, se

ES 2 122 912 A1

procesan las muestras como sigue:

4.1. Lavar las células sobre el filtro con un bastoncito.

5 4.2. Lavar en H₂O destilada.

4.3. Teñir con la disolución de hematoxilina durante 12 minutos.

4.4. Lavar nuevamente con H₂O destilada.

10 4.5. Sumergir durante 1-2 segundos en agua clorhídrica.

4.6. Lavar con H₂O destilada.

15 4.7. Teñir con la disolución de eosina durante 6 minutos.

4.8. Lavar con H₂O destilada.

4.9. Sumergir en alcohol de 96° durante 10 minutos.

20 4.10. Montar en el porta con el medio de montaje.

4.11. Mirar al microscopio y contar el número de células que han migrado a través del filtro de Matrigel®.

25 Los ensayos de invasividad "in vitro" se realizaron con la línea de melanoma de ratón B16HM seleccionada como está descrita previamente (Barberá-Guillem E., et al. (1988) *Invasion metastasis*, 8, 266-284). Se sembraron pocillos con medio en ausencia de PCI (control) y en presencia de PCI, a una concentración de 50µg/mL. Observándose que en el caso control 29 células atravesaban la membrana; mientras, las células tratadas con PCI eran 110 las que la atravesaban. Por lo tanto, se observa que el PCI a esta concentración estimula la migración unas 3,5 veces respecto al caso control sin PCI.

4.C.2. Ensayos de metástasis in vivo

35 Para estudiar el efecto del PCI sobre la capacidad metástasica de las células tumorales se ha utilizado el modelo de la línea de melanoma de ratón B16 ya que esta línea es singénica con los ratones utilizados. Estas células inoculadas, vía intraesplénica, en ratones singénicos al cabo de 7 días empiezan a desarrollar metástasis en el hígado del ratón. Se utilizaron los siguientes materiales:

40 -Reactivos y materiales necesarios para cultivo celular descritos en el Apartado 4.B.1.

-Material quirúrgico necesario para hacer una incisión y dar unos puntos de sutura.

-Nembutal: anestésico que se administra a una dosis de 50mg/Kg.

45 -Alfa MEM Hepes (Gibco, USA).

-Ratones machos C57BL/6J, de 6 a 8 semanas (IFFA Credo, France).

50 -Tampón PBS. Su composición es la siguiente: NaCl 140 mM; Na₂HPO₄ 7.5 mM; NaH₂PO₄ 2,5 mM. Su pH se ajusta a 7,5 con NaOH o ácido fosfórico.

- Formalina 10%

55 - Disoluciones de hematoxilina-eosina (Apartado 4.C.1.)

- Ultramicrotomo.

- Microscopio óptico.

60 Se estudiaron diferentes tratamientos, que a continuación se detallan:

ES 2 122 912 A1

- Un grupo control: constituido por 5 ratones a los cuales se les inocularon 300.000 células disueltas en 0,1 mL de alfaMEM-Hepes. Los ratones, previamente anestesiados con nembutal, fueron inoculados vía intraesplénica, mediante una pequeña incisión y posterior cierre con puntos. Estos fueron sacrificados al cabo de 11 días de la inyección de las células tumorales por dislocación cervical.

5 - Tratamiento 1: Nuevamente 5 ratones fueron inoculados de la misma forma que los control. Al sexto día de la inyección, se inició un tratamiento diario con 0,1mg/mL de PCI en 0,1 mL de PBS por vía intraperitoneal. Los animales son sacrificados igualmente al onceavo día de la inyección.

10 - Tratamiento 2: en este caso las células con las cuales los ratones en número de 5, también) son inoculados fueron tratadas previamente "in vitro", durante 4 días con una concentración de 0,1mg/mL de PCI. La inoculación de las células y sacrificio posterior de los ratones fue idéntica al grupo control.

15 Una vez sacrificados, se les extrajo el hígado. Este se fija con una disolución de formalina al 10% y se obtienen secciones mediante el ultramicrotomo. Posteriormente se tiñen las secciones con hematoxilina-eosina y se cuenta el número de focos metastásicos.

20 Al realizar el recuento de focos metastásicos en hígado se encontró que para el grupo control había un promedio de 23 ± 7 focos, para los ratones del tratamiento 1 había 27 ± 3 focos, y para los ratones del tratamiento 2 el número de focos fue de 4 ± 1 .

Observándose, por tanto, una clara disminución en la capacidad metastásica de las células pretratadas con PCI.

25 4.D. Ensayos con ratones atímicos

30 Con el fin de evaluar la sensibilidad al PCI de tumores humanos inducidos se hicieron estudios con ratones atímicos. Se les inoculó subcutáneamente células de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, a dichos ratones y una vez el tumor alcanzó un tamaño mínimo de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ se inició un tratamiento diario, también subcutáneo, con diferentes dosis de PCI durante 32 días. Se utilizaron los siguientes materiales:

- Reactivos y materiales necesarios para cultivo celular descritos en el apartado 4.B.1.

35 - Ratones desnudos o atímicos, CD-1 nude/hembras, de seis semanas.

- Jeringas de insulina (Becton Dickinson Labware, Bedford).

- Metaphane (anéstesico).

40 - Tampón PBS. Su composición es la siguiente: NaCl 140 mM; Na_2HPO_4 7,5 mM; NaH_2PO_4 2,5 mM. Su pH se ajusta a 7,5 con NaOH o ácido fosfórico.

- Calibrador Vernier

45 Para determinar si el PCI tiene algún efecto sobre el crecimiento tumoral, se siguió el crecimiento de tumores subcutáneos inducidos en ratones atímicos a lo largo del tiempo tratados o no con PCI. El protocolo detallado fue el siguiente:

50 1. Los ratones fueron inyectados subcutáneamente con 10^7 células de Capan-1 disueltas en $100 \mu\text{L}$ de DMEM. Se inocularon 19 ratones que se distribuyeron en 4 grupos:

- Grupo control: constituido por 5 ratones. Se les realizó un tratamiento con PBS.

55 - Grupo 1: constituido, también, por 5 ratones. Se les trató con 0,11mg/mL de PCI disueltos en PBS.

- Grupo 2: formado por 5 ratones a los que se les aplicó un tratamiento con una dosis de PCI de 0,6mg/mL de PCI.

60 - Grupo 3: formado por 4 ratones a los que, en este caso, la dosis de PCI fue de 1,2 mg/mL de PCI.

2. A los días 12 de inoculación de las células, se inició el tratamiento diario con PBS o PCI por

ES 2 122 912 A1

inyección directa en el tumor de 100 μ L de dichas disoluciones. En este momento los tumores eran palpables y medían como mínimo 2 mm de diámetro.

3. Durante el tratamiento cada dos días se determinó el tamaño del tumor, mediante la utilización de un calibrador vernier, que nos permite medir el tumor en todas sus dimensiones. El volumen del tumor se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$V = \frac{W^2 \times L}{2}$$

donde W es la amplitud del tumor y L la longitud del mismo.

A medida que se conocen los volúmenes de los tumores, cada 7 días se calcula el crecimiento relativo de dichos tumores, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen relativo} = \frac{\text{Volumen del tumor al tiempo } t \text{ de tratamiento}}{\text{Volumen relativo al tiempo 0 de inicio del tratamiento}}$$

Una vez finalizado el tratamiento se calcula el tiempo de duplicación del tumor (t_d) con los diferentes tratamientos, mediante la siguiente fórmula:

$$t_d = \frac{2xd}{V_t - V_o}$$

donde d corresponde a los días de tratamiento, V_t al volumen del tumor al final del tratamiento y V_o el volumen al inicio del tratamiento.

El efecto del PCI sobre el crecimiento tumoral de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, se ha determinado después de 32 días de tratamiento de los tumores inducidos en los ratones atímicos. Este efecto se puede observar si comparamos el crecimiento relativo de los tumores de los ratones control respecto al de los ratones tratados con diferentes dosis de PCI. Los resultados que se obtuvieron se representan gráficamente en la Figura 14. A partir de estos datos se realizó un contraste de hipótesis de igualdad de medias de poblaciones de desviaciones típicas desconocidas y diferentes, empleando una t de Student. Se contrastaron las medias de crecimiento relativo a cada dosis de PCI con los controles.

Según dichos resultados podemos concluir que ya desde el principio del tratamiento se observan diferencias en el crecimiento de los tumores tratados respecto a los controles. Estas son muy claras al finalizar el tratamiento para las tres dosis ensayadas. La dosis con un nivel de significación más elevado para el test realizado es la de 0,6mg/mL, con un nivel de confianza de más del 99.9%, seguida por la dosis de 0,11mg/mL con un nivel de confianza de más del 99% y finalmente la dosis de 1,2 mg/mL con un nivel de confianza de más del 90%.

A partir de los volúmenes de los tumores también, se calcularon los tiempos de duplicación del tumor para los diferentes tratamientos. Los resultados que se obtuvieron se recogen en la Tabla 14, donde se expresa la media y el error estándar del tiempo de duplicación para los cinco ratones de cada grupo.

TABLA 14

Tiempos de duplicación del tumor en función del tratamiento

Tratamiento	Tiempo de duplicación (días)	Error estándar
Control	4,32	0,68
0,11 mg/mL PCI	9,06	1,99
0,6 mg/mL PCI	19,49	3,02
1,2 mg/mL PCI	5,78	0,61

ES 2 122 912 A1

También, a partir de estos datos se realizó el mismo contraste de hipótesis que para los volúmenes relativos. El resultado fue que para las dos dosis en las que había resultado más significativa la variación en volumen relativo, 0,6mg/mL y 0,11mg/mL, las medias del tiempo de duplicación son significativamente diferentes a la media control con un nivel de significación muy elevado (concretamente, inferior al 0,005 para la dosis de 0,6mg/mL y inferior al 0,1 para la dosis de 0,11mg/mL). Por lo tanto se puede concluir que el PCI aumenta, a algunas concentraciones, significativamente el tiempo de duplicación de los tumores.

Los datos se representan gráficamente en la Figura 15. Como se puede observar el tiempo de duplicación del tumor cuando se le trata con una dosis de 0,11mg/mL, de PCI es 2 veces superior al de los tumores control, y para la dosis de 0,6mg/mL el efecto es muy superior siendo el tiempo de duplicación 4,5 veces superior al control.

La Tabla 15 presenta un resumen de todos los resultados obtenidos a partir de los ensayos con los ratones desnudos. De la misma se puede concluir que tumores producidos por la inoculación de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, en ratones desnudos al tratarlos con una dosis de PCI de 0,6mg/mL, éste resulta tener una actividad significativa en la reducción del crecimiento de dichos tumores, así como la dosis de 0,11mg/mL tiene una actividad moderada.

Durante la pauta de tratamiento se observó que en el proceso de inyección los tumores de los animales control sangraban a los tres días de iniciado el tratamiento; por contra, los tumores de los animales tratados con PCI tardaron 8 días en sangrar.

TABLA 15
Actividad del PCI en "human tumor xenografts"

Línea tumoral	Tipo histológico	Tratamiento Droga	Tratamiento (días) ^a	Administración		s.c.
				Dosis (mg/kg/day)	T/C% ^b óptimo	
Capan-1	Adenocarcinoma pancreático	PCI	0-32	0,55	39,79	1,09(+)
				3	21,36	3,51(+++)
				6	69,4	0,34(-)

^a El tratamiento se inició 12 días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones fueron tratados diariamente durante 32 días.

^b Los valores de T/C se determinan después de finalizar el tratamiento. $T/C = (\text{media } V_t/V_o \text{ tratados} / \text{media } V_t/V_o \text{ control}) \times 100$. $T/C < 50\%$ actividad moderada; $T/C < 25\%$, actividad significativa.

^c $T_d \text{ tratados} - T_d \text{ control} / T_d \text{ control}$ (T_d , tiempo de duplicación del tumor) $SGD < 1$ expresado como -; > 1 expresado +; y > 3 expresado como +++

Los tumores control se mantuvieron con una apariencia bastante rojiza durante todo el ensayo, mientras que los tratados con PCI nunca alcanzaron dicha tonalidad. Así mismo, cabe destacar también que los tumores control presentaron siempre una gran consistencia, mantenida durante todo el ensayo, mientras que los tratados con PCI nunca alcanzaron dicha consistencia. A medida que avanzaba el tratamiento la piel que rodeaba los tumores tratados fue perdiendo su capacidad de retención de líquido, resultando cada vez más dificultoso el suministro de PCI. Las anteriores constataciones son claramente indicativas de que el tratamiento está afectando al proceso de neo-vascularización y de angiogénesis y, de acuerdo con Folkman M.D. (1995) *New England J. Med.*, 33, 1757-1763, una terapia antiangiogénica en ratones provoca una disminución de la presión intersticial con la consecuente disminución de la compactación (consistencia) de la masa tumoral.

4.E. Citotoxicidad

Con el fin de establecer si el efecto inhibitor del crecimiento del PCI es debido a que induce citotoxicidad de forma inespecífica, o bien si por contra el efecto es específico, siendo originado por la alteración

ES 2 122 912 A1

de algunos procesos celulares, se realizó un ensayo de citotoxicidad "in vitro" del PCI sobre la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, con un amplio rango de concentraciones de PCI.

5 Aparte del material reseñado en el apartado 4.B.1 necesario para realizar cultivos celulares, en esta experiencia se emplearon los materiales y disoluciones necesarios para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad que fueron:

- Placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca).
- 10 - BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxy-ethyl)-5-(6) carboxyfluorescein, aminoxy- methyl éster), se prepara resuspendiendo 100 µg de dicho reactivo en 10 µl de DMSO que se añaden a 12mL de medio (DMEM+10%BMS). (Molecular Probes, Inc., USA).
- Ioduro de propidio (Boehringer Mannheim, Alemania).
- 15 - CytoFluorTM 2300/2350 Fluorescence Measurement System (Millipore, USA).

El ensayo de citotoxicidad se basa en la utilización de dos fluoróforos. la BCECF-AM y el ioduro de propidio. El primero se emplea como marcador de células viables debido a que penetra rápidamente en el citoplasma celular donde es fragmentado por la acción de las esterasas, convirtiéndose en molécula fluorescente, siendo estas esterasas activas sólo cuando la células están vivas. Y el ioduro de propidio es un derivado del fenantreno que se une específicamente a la estructura polinucleotídica de los ácidos nucleicos intercalándose entre sus pares de bases, debido a su estructura iónica, no puede penetrar en las células vivas, pero sí en las muertas, marcando DNA y RNA. Así las bases del ensayo consisten en poner en contacto las células con el PCI y seguir la viabilidad y mortalidad durante 24 horas; se considera que un producto es citotóxico si a una determinada concentración, en este período de tiempo, produce una disminución de la viabilidad respecto a las células control (no tratadas con dicho producto) que conlleva un aumento de la mortalidad. El procedimiento que se siguió fue:

30 En una placa de 24 pocillos se sembró cada uno de ellos con 160.000 células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. Se dejaron en el incubador durante 24h, tiempo suficiente para que las células estén completamente adheridas a la superficie y en ese momento se inició el ensayo.

35 1. Se leyó la absorbancia de la placa mediante el citofluor. El citofluor es un fluorímetro diseñado especialmente para la lectura de fluorescencia en células, tiene un control por ordenador que permite utilizar varias combinaciones de filtros de excitación-emisión a la vez. En nuestro caso se utilizó un filtro de excitación de 485nm y uno de emisión de 530 y 645nm, estos filtros nos permiten detectar la fluorescencia de los dos reactivos utilizados para el ensayo de citotoxicidad como son la BCECF-AM y el ioduro de propidio. Esta primera lectura corresponde a la autofluorescencia de las células, que luego restaremos al valor final de fluorescencia.

2. A continuación se incubaron las células con la BCECF-AM durante 30 minutos a 37°C. La cantidad de BCECF-AM que se añadió a cada pocillo fueron 500µL de la disolución descrita en material.

45 3. A continuación se leyó la absorbancia de la placa. Esta medida corresponde a la fluorescencia total.

4. Lavados de la placa, por dos veces, con medio (DMEM + 10% BMS). Estos lavados nos permiten eliminar la fluorescencia que no ha sido incorporada por las células.

50 5. Se añadió 200 µL de medio a cada pocillo con las diferentes concentraciones de PCI a ensayar, se realizaron cuadruplicados de cada concentración ensayada. En nuestro caso fueron de 0, 10µg/mL, 30µg/mL, 45µg/mL, 60µg/mL, 75µg/mL. Al mismo tiempo se añadió 50µL de ioduro de propidio a cada pocillo, para tener una concentración final de dicho producto 2µM.

55 6. Lectura de la placa. Esta lectura corresponde al tiempo 0 y a partir de este momento se realizaron lecturas cada hora mientras duró el ensayo.

Una vez obtenidos todos los valores de intensidad de fluorescencia (i.f.) a los diferentes tiempos se calculó el valor real de fluorescencia debido a la BCECF-AM y el ioduro de propidio mediante la siguiente fórmula:

$$I. F. = i.f. \text{ a un determinado tiempo} - I.f. \text{ autofluorescencia de las células}$$

ES 2 122 912 A1

Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 16 y 17. En éstas se representa la variación de la intensidad de la fluorescencia para cada uno de los fluoróforos respecto al tiempo para los diferentes tratamientos con PCI. Como se puede observar en el caso de la BCÉCF-AM, que nos indica viabilidad de las células, no hay ninguna diferencia entre control y tratamientos con PCI, no observándose ninguna disminución de viabilidad, y la disminución de intensidad que se observa no es más que la pérdida de fluorescencia por parte del propio fluoróforo a lo largo del tiempo. Y respecto al yoduro de propidio tampoco se observa ninguna diferencia significativa respecto al control, y el ligero aumento de intensidad que se observa es el mismo para el control y los tratamientos, indicándonos que se trata de una muerte celular espontánea no debida a la presencia del PCI.

4.F.1. Estudios sobre el mecanismo celular y molecular de acción del PCI.

En los estudios expuestos ha quedado claramente establecido que el inhibidor de carboxipeptidasa de patata recombinante tiene un claro efecto inhibidor de: 1) el crecimiento de líneas tumorales en cultivo, 2) el desarrollo de tumores inducidos en ratones atímicos por inyección de células de adenocarcinoma pancreático humano, y 3) la aparición de metástasis en hígado de ratones por inyección de la línea de melanoma murino B16. Para tratar de reunir datos sobre los mecanismos moleculares y celulares responsables de tales efectos que sean relevantes para la presente invención se ha realizado un conjunto de experimentos de laboratorio y de análisis computacionales.

4.F.1. Ensayos de internalización del PCI

Para averiguar si el PCI recombinante es internalizado por parte de las células tumorales en cultivo se realizaron dos tipos de ensayos:

a) Adición de PCI a medios de cultivo de las células tumorales y seguimiento de su concentración a lo largo del tiempo en dicho medio externo (abreviadamente, estudios de desaparición de PCI)

b) Marcado del PCI con un fluoróforo, y observación al microscopio de fluorescencia de células tumorales tratadas con dicho PCI a distintos tiempos (abreviadamente, estudios de internalización por fluorescencia)

El resultado de dichos estudios fue que de las dos líneas de adenocarcinoma pancreático humano ensayadas, las líneas Capan-1 y Panc-1 internalizan cantidades significativas de PCI, que se sitúan en una localización perinuclear.

4.F.1.a. Estudios de desaparición de PCI.

Los estudios de desaparición de PCI se llevaron a cabo en la línea celular Capan-1, empleando diferentes concentraciones de PCI.

Aparte de lo reseñado en el apartado 4.B.1, en esta experiencia se emplearon los materiales y disoluciones precisos para llevar a cabo ELISAs y ensayos de actividad inhibidora de carboxipeptidasa, y que se describen en detalle en la bibliografía citada en el apartado 4.A.

En tres frascos de cultivo pequeños (de 25 cm²) se sembraron 5 x 10⁵ células en cada uno, y se cultivaron en medio DMEM+10%FBS hasta que por observación microscópica se vio que casi habían alcanzado un 75% de confluencia. En ese momento se retiró el medio y se sustituyó por nuevo DMEM+10%FBS (frasco control), por el mismo medio con 50 µg/mL de PCI (frasco 50 µg/mL) y por medio con 200 µg/mL de PCI (frasco 200 µg/mL). Los tres frascos se cultivaron durante 24 horas más. De cada uno se extrajeron muestras de 100 µL de medio de cultivo cada media hora. En cada una de esas muestras se determinó la concentración de PCI presente mediante dos métodos, (descritos en la bibliografía citada en el punto 4. A.):

- Ensayos de actividad inhibidora de carboxipeptidasa A

- ELISA

En tales ensayos, se usaron como blancos las muestras obtenidas del frasco control a los mismos tiempos.

Uno de los ELISAs que se realizaron con las muestras provenientes del frasco 200 µg/mL se llevó a

cabo con unas condiciones especiales en el primer paso (fijación de los antígenos), en concreto empleando una concentración de 0,5 M NaCl.

Los resultados obtenidos en el caso del frasco 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se muestran en la Figura 18. Las concentraciones de PCI en el medio de cultivo calculadas a partir de los ensayos de actividad inhibidora y a partir del ELISA son en general bastante coincidentes, las discrepancias entre ambos métodos son seguramente debidas a los errores e imprecisiones propios de los mismos. Como se puede observar en la Figura 18, el PCI es claramente internalizado por las células y su concentración en el medio de cultivo desciende de forma acusada alrededor de la 1h30min; y después, de forma aún más marcada, entre las 3 y las 6h. A partir de este momento, parecen observarse ciclos de aparición y desaparición del PCI del medio de cultivo cada 3 a 5h, aproximadamente.

En la Figura 19 se pueden observar los resultados para el frasco 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Es posible observar, como en el caso anterior, y especialmente en las medidas por ELISA, repetidos ciclos de desaparición y reaparición de PCI en el medio de cultivo. Es muy destacable el hecho de que, al contrario que en el caso anterior, se observa una clara diferencia entre los resultados obtenidos a partir de los ensayos de actividad y del ELISA. Las concentraciones de PCI calculadas a partir de esta última técnica resultan ser de cinco a diez veces menores, y dicha diferencia no puede ser adjudicada a los errores inherentes a ambos métodos. Para explicar estas discrepancias se elaboró una explicación basada en el hecho de que los ensayos de actividad se realizan en condiciones de alta fuerza iónica (0,5M NaCl), lo que no ocurre en el caso del ELISA. En efecto, es posible que el PCI presente en el medio de cultivo se halle unido a proteínas, restos de membrana, etc, y que tal unión se rompa en las condiciones de alta fuerza iónica del ensayo de actividad. En cambio, en el caso del ELISA, esto no ocurriría, y tales hipotéticas proteínas o restos de membrana bloquearían epítomos del PCI, por lo cual la concentración que se detectaría del mismo sería claramente inferior. Esta hipótesis se vio apoyada al realizar un ELISA donde la incubación de las muestras (primer paso del ELISA) se hizo en condiciones de alta fuerza iónica (0,5 M NaCl), idéntica a la que se emplea en los ensayos de actividad. El resultado del ELISA fue que se detectaron concentraciones de PCI en los medios de cultivo muy superiores a las determinadas en el ELISA anterior, y muy similares a las concentraciones halladas en ensayos de actividad.

4.F.1.b. *Estudios de internalización mediante fluorescencia*

En los estudios de fluorescencia se siguió por observación al microscopio la posible internalización de PCI marcado con un fluoróforo por parte de células de las líneas Capan-1 y Panc-1.

Además del material y disoluciones ya descritas anteriormente, en estas experiencias se empleó:

- Rodamina isotiocianato (RITC) (Aldrich, Alemania)
- Cámaras de cultivo/portas (Nunc, Dinamarca)
- Columnas PD-10 con Sephadex G-25 M (Pharmacia, Suecia)
- Microscopio de fluorescencia Zeiss (Alemania)

a) *Procedimiento de marcado del PCI con RITC*

El fluoróforo escogido fue el RITC (Rhodamine B isothiocyanate), que reacciona selectivamente con aminos a través de su grupo isotiocianato. Así, puede reaccionar con el grupo amino libre del extremo N-terminal o bien con los grupos amino de las lisinas 10 y 13 de la molécula de PCI, rindiendo complejos relativamente estables, con un espectro de absorción y emisión no demasiado sensible al pH, y excitables emitiendo luz a 546 nm.

El protocolo de marcaje fue el descrito por Billings P.C., et al. (1989) *Carcinogenesis*, 10, 687-691, ligeramente modificado:

1.- Se disuelven 2 mg de PCI purificado en tampón bicarbonato sódico 0,5 M (pH 9,2) hasta una concentración final 1 mg/mL. (disolución A)

2. - Se disuelven 0.4 mg de RITC en agua milli Q hasta una concentración 1mg/mL (solució B)

3.- Se mezclan las disoluciones A y B a temperatura ambiente durante 3 horas en una plataforma

ES 2 122 912 A1

giratoria, siempre protegiendo la disolución de la luz.

4.- Se centrifuga a 2000 xg durante 1 minuto para que precipite el material insoluble.

5 5. - Para eliminar el RITC libre no unido al PCI se pasa la muestra por una columna PD-10, según el protocolo:

- Lavar la columna con 25 mL de agua milli Q.

10 - Añadir la muestra en un volumen que no supere los 2,5 mL.

- Eluir el RITC-PCI con 4 mL de agua milli Q, para obtener el RITC libre después de pasar 10 mL más de agua por la columna.

15 Este último paso permite separar el RITC libre del que está unido al PCI, ya que este último se eluye en el volumen de exclusión de la columna.

b) Cuantificación del PCI marcado

20 La cantidad de RITC unida al inhibidor se determina espectrofotométricamente, sabiendo que el coeficiente de extinción molar del RITC a 560 nm, es de $\epsilon=22.000M^{-1}$.

La cantidad de PCI marcado se determina mediante una prueba de inhibición de la actividad carboxipeptidasa A, empleando como blanco la disolución de RITC libre que se eluye de la columna PD-10.

25

c) Incorporación del RITC-PCI a los cultivos celulares

En los estudios de incorporación del RITC-PCI se siguió el protocolo de Billings P.C., et al. (1989) *Carcinogenesis*, 10, 687-691, ligeramente modificado:

30

1- Se ponen a crecer 200.000 células de la línea a estudiar en cámaras de cultivo/portas ("chamber/slides") y se dejan crecer durante 48h.

35

2- A las células creciendo en fase exponencial, se les cambia el medio y en el nuevo medio se añaden 20 o 50 $\mu\text{g/mL}$ de RITC-PCI, manteniendo este en el medio durante un tiempo de incubación variable desde un minuto hasta 4 horas dentro del incubador.

3- Se retira el medio después de la incubación, y se lava la monocapa de células con PBS durante 10 minutos a oscuras.

40

4- Se fijan las células con 350 μl de una disolución 50% metanol -50% acetona durante 8 minutos a 4°C en una cámara oscura y húmeda.

5- Se lavan de nuevo las células con PBS durante 10 minutos a oscuras.

45

6- Se secan las preparaciones con papel absorbente poniendo mucho cuidado de no tocar las células. Se montan las preparaciones con PBS:Glicerol (1:1) y se sellan con laca de uñas. A continuación se observan al microscopio de fluorescencia, si la observación no es inmediata se mantienen las preparaciones a 4°C y a oscuras.

50

Además de los cultivos de células Capan-1 y Panc-1 a las que se añadió el PCI-RITC, se realizaron una serie de controles:

55 a- Un cultivo se incubó con la disolución de RITC eluida de la columna PD-10 para comprobar si había unión o internalización inespecífica del fluoróforo a las células.

b- Se añadió RITC-PCI a una placa sin células para ver si se une inespecíficamente a la placa.

60 c- A un último cultivo control no se le añadió RITC-PCI para comprobar la ausencia de fluorescencia propia de las células.

Los resultados de los tres controles fueron negativos; es decir, no se detectó fluorescencia.

En cuanto al análisis de internalización del PCI en si se obtuvieron los siguientes resultados:

d) *Análisis de la eficiencia del marcado del PCI con RITC*

5 Para confirmar que las células realmente incorporan el PCI se decidió marcarlo fluorescentemente, lo que permite observar al microscopio dicha incorporación y seguirlo dentro de la célula.

10 El fluoróforo elegido para marcar el PCI fue el RITC, siguiendo a Billings P.C., et al. (1989) *Carcinogenesis*, 10, 687-691. El RITC reacciona con los grupos amino de las lisinas y del N-terminal. En los dos casos el lugar de reacción está lejos de la región del PCI de unión con la carboxipeptidasa, lo que permite determinar su concentración mediante ensayos de inhibición de actividad carboxipeptidasa A. La cantidad de RITC incorporado por el PCI se evalúa espectrofotométricamente.

15 Los resultados típicos obtenidos al marcar el PCI con RITC fueron que aproximadamente cada mol de PCI une 0,66 moles de RITC. Como el PCI tiene 3 lugares de unión de RITC (grupos amino libres), se puede afirmar que la probabilidad de que uno esté marcado es de 0,22. De esto se deduce que el 43 % de las moléculas de PCI de las preparaciones de inhibidor marcado no estarían marcadas, y del 57 % restante, el 40 % estaría marcada en un solo lugar y el 13% en más de uno.

20 e) *Incorporación del RITC-PCI en cultivos de células Capan-1 y Panc-1*

Antes de iniciar los estudios de incorporación de RITC-PCI a las líneas celulares, se realizaron los blancos descritos en métodos, que permitieron comprobar que:

25 a- Las células no internalizan RITC libre

b- El RITC-PCI no se une inespecíficamente a la superficie de las cámaras de cultivo.

30 c- Las células de las líneas ensayadas no presentan fluorescencia intrínseca a la longitud de onda a la que la presenta el RITC.

35 El resultado de los estudios de incorporación de RITC-PCI por células Capan-1 ofreció, como resultado general, que tales células presentaban una intensa fluorescencia al microscopio, revelando que internalizan cantidades significativas de PCI marcado. La fluorescencia se visualizaba en todo el interior del citoplasma, pero con una clara acumulación alrededor del núcleo (localización perinuclear). Dicha localización perinuclear aparece ya en células expuestas al RITC-PCI durante sólo 1 minuto. Todo esto se puede observar en la Figura 20, donde se presenta una microfotografía de contraste de fase de las células y una de fluorescencia que nos muestra el tipo de internalización que presenta el PCI por parte de las

40 células Capan-1. El tiempo de exposición necesario para poder fotografiar las células nos da idea de la intensidad de marcado y con ello de la cantidad de PCI captado por las mismas. Así, a mayor intensidad se necesita menos tiempo de exposición. Con carácter general, las células incubadas a igual concentración de PCI presentaban mayor intensidad de marcado cuanto más tiempo habían estado en contacto con el mismo. Sin embargo hay que indicar que, para una misma muestra, había diferencias en la intensidad de la fluorescencia entre distintas células. Al comparar las microfotografías de fluorescencia con las de campo claro, se podía apreciar que las células con mayor intensidad de marcado presentaban un núcleo disgregado, no esférico, y que a veces resultaba difícil de ver.

50 En el caso de la línea Panc-1, el marcado de las células era también perinuclear. Con carácter general, para los mismos tiempos de incubación y concentración de RITC-PCI el marcado en el caso de Panc-1 era algo menos intenso que en Capan-1 (se requerían tiempos de exposición algo superiores para obtener una microfotografía). De aquí se deduce que la cantidad de PCI internalizado por las células de la línea

55 f) *Marcado del PCIdelYVG con RITC*

60 Dado que se habían realizado los ensayos de proliferación con el mutante del PCI con la delección C-terminal YVG, y este había resultado tener efecto sobre el crecimiento celular, se procedió al marcado de dicho mutante con un fluoróforo para estudiar la posible internalización del PCIdelYVG marcado por parte de células de la línea Panc-1. El protocolo de marcaje fue exactamente el mismo que para el PCI

silvestre tal como se describe en el apartado 4.F.1.b. Los estudios de incorporación del mutante marcado se realizaron tal como se describen en el apartado 4.F.1.c.

5 De los estudios de incorporación se concluye que el mutante PCI_{del}YVG es incorporado por las células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Panc-1. Al igual que en el caso del PCI silvestre el marcaje es visualiza en todo el citoplasma, pero con una clara acumulación alrededor del núcleo.

10 El tiempo de exposición necesario para poder fotografiar las células, que nos da idea de la intensidad de marcado y con ello de la cantidad de molécula marcada captada por las células, es ligeramente inferior en el caso del mutante PCI_{del}YVG para tiempos de incubación y concentraciones idénticas a las del PCI silvestre. Esto indica que el mutante es captado por las células pero con mayor dificultad respecto a la captación de PCI silvestre.

15 4.F.2. Posible relación con apoptosis

Para profundizar en el mecanismo mediante el cual el PCI produce una disminución de la tasa de crecimiento de la línea Capan-1, y basándonos en la morfología observada de las células tratadas con PCI, se estudió la posibilidad de que el PCI indujera apoptosis (o muerte celular programada).

20 Las células apoptóticas sufren una condensación de la cromatina, que va seguida de una fragmentación del núcleo en los llamados cuerpos apoptóticos (Earnshaw W.C. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 337-343). Este fenómeno es fácilmente observable mediante una tinción específica del DNA con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), ya que las células apoptóticas presentan un marcado muy intenso debido a la condensación de la cromatina. Además, se observa el núcleo fragmentado. Así, por observación al
25 microscopio de fluorescencia se puede determinar si el PCI induce apoptosis y el porcentaje en que este fenómeno se produce.

Además del material y disoluciones ya descritas anteriormente, en estas experiencias se empleó lo siguiente:

- 30 - Cámaras de cultivo/portas (Nunc, Dinamarca)
- Formaldehído al 2%, (Panreac, España).
- 35 - Triton X100 al 0,25% en PBS, (Sigma, España).
- DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), (Sigma, España).
- Fluoropep (Biomerx, Francia).

40 Los estudios de posible inducción de apoptosis por parte del PCI se realizaron con la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. El procedimiento detallado que se siguió fue:

45 1. Se sembraron 5×10^5 células en las cámaras de cultivo/portas y se mantuvieron en cultivo durante 3 o 4 días (hasta que por observación microscópica presentaban un 75% de confluencia). Las células se cultivaron en el medio DMEM + 10% FBS.

50 2. A las células creciendo en fase exponencial se les cambió el medio y en el nuevo medio se añadieron diferentes concentraciones de PCI: 0,1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/mL y 200 μ g/mL. Se añadió un control positivo, cisplatino en una concentración de 10 μ g/mL (droga que se ha visto que induce apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales, Borner M. M., et al. (1995) *Cancer Res.*, 55, 2122-2128. El tiempo de incubación fue de 24 horas.

3. Se retiró el medio después de la incubación y se lavó la cámara con 2 mL de PBS.

55 5. Se fijaron las células con 2 mL de formaldehído al 2% durante 20 minutos a 4°C.

6. Se lavaron de nuevo las placas con 2 mL de PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

60 7. Se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X100 al 0,25% en PBS durante 5 min a 4°C.

8. Se volvió a lavar con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

9. Se marcaron las células con DAPI a una concentración final de 2µg/mL durante 50 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

10. Se montó la preparación con el medio fluoroprep y se observó al microscopio de fluorescencia.

Para confirmar que una posible vía de inhibición del crecimiento, por parte del PCI, podría ser la inducción de apoptosis se decidió tratar la células y luego realizar un marcaje específico de DNA, que permite distinguir células en apoptosis de células vivas. El tratamiento se llevó a cabo con diferentes dosis de PCI y cisplatino, como control positivo, que se realizó durante 24 horas.

Las preparaciones se observaron al microscopio de fluorescencia y se contaron el número de células en apoptosis y el número total de células, lo cual permitió calcular el % de apoptosis mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ apoptosis} = (\text{número de células en apoptosis} / \text{número total de células}) \times 100$$

Los resultados obtenidos, correspondientes a tres ensayos, se presentan en la Tabla 16 y Figura 21. Como se puede observar el cisplatino induce claramente apoptosis y en el caso del PCI, es a una concentración de 50 µg/mL donde se observa un índice de apoptosis mayor, 5 veces superior al control.

Aún así, resulta que estos niveles son muy bajos y dado que en los ensayos de proliferación la inhibición del crecimiento es de al menos el 50%, nos hace pensar que posiblemente se necesite de una exposición más larga al PCI para que un número más elevado de células entre en apoptosis. En todo caso parece demostrarse que el PCI actuaría frenando el crecimiento del tumor y no por inducción de la muerte de células tumorales.

TABLA 16

Porcentaje de apoptosis inducida por el PCI sobre la línea Capan-1.

Muestra	% Apoptosis
Control negativo (0 µg/mL PCI)	0,08
0,1 µg/mL PCI	0,11
10 µg/mL PCI	0,095
50 µg/mL PCI	0,41
200 µg/mL PCI	0,038
cisplatino (control positivo)	5,19

4.F.3. *Relación con la alteración del patrón de glicosilación.*

Con la intención de comprobar si el PCI, al afectar al crecimiento celular, también puede estar provocando cambios metabólicos, se analizaron los cambios en una proteína de secreción, la ribonucleasa, expresada por la línea de adenocarcinoma pancreático Capan-1, y presente en el medio de cultivo. Aparte del material reseñado necesario para cultivos celulares, este análisis se basó en la detección de actividad ribonucleasa, que se estudia mediante un análisis electroforético en geles de actividad (zimogramas) (Bravo J. et al. (1994). *Anal. Biochem.*, 219, 82-86).

Para ello se recogió el medio de cultivo de los ensayos de proliferación del apartado 4.B.1. Así se dispuso de medio de cultivo de células control, de células tratadas con PCI desde el inicio (pre-adhesión) y de células tratadas una vez se habían adherido a la superficie de cultivo (post-adhesión). Estas células estaban creciendo en DMEM suplementado con BMS al 10%. dado que el FBS contiene ribonucleasa

ES 2 122 912 A1

bovina que interferirla en nuestros estudios. El procedimiento que se siguió fue:

- Se recogió el medio de los frascos de cultivo y se centrifugó a 1500rpm durante 10 minutos.
- 5 - Si su utilización no era inmediata se congeló a -20°C en tubos estériles.
- En el momento del análisis se descongelaron los medios con objeto de disponer de una alícuota de cada muestra. Se determinó la concentración de proteína total mediante el método de Bradford (Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248-254).
- 10 - Se realizó un análisis electroforético por zimograma, cargando la misma cantidad de proteína total de cada muestra.

El análisis de la secreción de ribonucleasa se realizó con Capan-1. La concentración de PCI con el
15 que las células fueron tratadas pre y post-adhesión fue de $5\mu\text{g}/\text{mL}$. Mediante el análisis electroforético de actividad ribonucleasa se pudo observar el patrón de glicosilación de esta proteína, así como llevar a cabo una cierta cuantificación. Como se puede observar en la Figura 22, para la línea Capan-1 hay una mayor secreción de ribonucleasa con un mayor grado de glicosilación respecto al control, hecho que está más marcado en la situación de post-adhesión que en la de pre-adhesión. Estos resultados nos indican
20 que la célula, en el caso de Capan-1 en presencia de PCI, está glicosilando con más intensidad y, por tanto, que la maquinaria de glicosilación del aparato de Golgi está sobreestimulada. Esto sugiere que se está afectando alguna vía de transducción de señal.

4.F.4. *Análisis por citometría de flujo de la distribución de las fases del ciclo celular.*

25 La metodología de la citometría de flujo permite realizar histogramas de contenido de DNA a partir del cual se puede estimar el porcentaje de células que están en cada una de las fases del ciclo celular: G_1 , S y G_2/M (Ormerod M.G. (1992) *Cytometry*, 13, 678-685; Darzynkiewicz Z. et al (1992) *Cytometry*, 13, 795-808).

30 El fin de este experimento es determinar si el tratamiento de las células de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1 con el PCI produce alguna variación en la distribución de las fases del ciclo, es decir, si se produce una parada del crecimiento en alguna de las fases del ciclo. Además del material reseñado en el apartado 4.B.1., se emplearon los materiales y disoluciones precisos para realizar un ensayo
35 de citometría de flujo, que se describen a continuación:

- Disolución de lavado: PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- Tampón CMFH-Tripsina-EDTA: 7,54 g/L NaCl, 0,37 g/L KCl, 0,09 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0478g/L
40 Na_2HPO_4 , 0,084 g/L NaHCO_3 , 0,9 g/L glucosa (dextrosa), 5,96 g/L HEPES, tripsina concentración final 0,0025% y EDTA concentración final 2mM. Dicha disolución se tampona con NaOH a $\text{pH}=7,4$, y posteriormente se filtra bajo campana con un filtro de $0,22\mu\text{m}$.
- Disolución de fijación de las células: etanol 70% a -20°C .
- 45 - Disolución de ioduro de propidio: ioduro de propidio (PI) $50\mu\text{g}/\text{mL}$ y ribonucleasa $20\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Citómetro de flujo: EPICS-752 Flow Cytometer (Coulter Electronics Inc, Hialeah, Fla).

50 A continuación se detalla el procedimiento que se ha seguido para realizar los estudios de citometría de flujo:

1. Se siembran 1×10^6 células en frascos de 25 cm^2 , que se mantienen en cultivo durante 5 días. Se siembran 5 frascos para los diferentes tratamientos a realizar: un control y cuatro tratamientos, estos se
55 trataron con $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI a diferentes tiempos: 96h, 72h, 48h, 24h.
2. Después del tratamiento, se lavan las células con la disolución de lavado por dos veces.
3. Se procede a desenganchar las células añadiendo 1 mL del tampón CMFH-Tripsina-EDTA por
60 frasco. La reacción se para añadiendo 2 mL de medio completo por frasco.
4. Se centrifugan las células durante 5 minutos a 1500 rpm.

ES 2 122 912 A1

5. Se lavan nuevamente las células con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , por dos veces. En el último lavado se descarta el sobrenadante.

6. Se resuspende el sedimento de células en $200\mu\text{L}$ de PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , se le añaden 2mL de etanol al 70% a -20°C . Es necesario que la adición sea lenta y vaya acompañada de una ligera agitación, para evitar la formación de agregados de células. En este punto se pueden guardar las células a 4°C hasta el momento de pasarlas por el citómetro de flujo, siendo el tiempo mínimo de fijación de 2 horas.

7. El día del análisis por citómetro, se centrifugan las células durante 5 minutos a 1500 rpm y a 4°C .

8. Lavar el sedimento de células por dos veces con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

9. Teñir las células durante 15 minutos a 37°C con 1mL de la disolución de ioduro de propidio.

10. Pasar las células por el citómetro de flujo: excitándolas con un láser de 488 nm , lo que permite detectar la fluorescencia roja de los complejos DNA-PI.

La citometría de flujo permite determinar el porcentaje de células en la fases del ciclo: G_1 , S y G_2M . Así se puede comparar esta distribución para cada uno de los tratamientos realizados. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17.

Como se desprende de los resultados de la tabla el PCI produce un aumento del número de células en G_1 . Por ello, se puede concluir que el PCI tiene un efecto inhibitor del crecimiento ya que detiene las células en la fase G_1 del ciclo celular, parando su división. Este hecho viene corroborado por la observación de una sobreexpresión de la p53 (apartado 4.F.5).

TABLA 17

Resultados de citometría de flujo. Células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, se trataron con $50\mu\text{g/mL}$ de PCI añadido al medio de cultivo a diferentes tiempos.

Tratamiento	% G_1	% S	% G_2M
Control	79,2	14,3	6,4
24h	74,9	20,4	4,7
48h	85,3	11	3,7
72h	85,1	10,9	4
96h	88,5	7,6	3,9

4.F.5. Estudio de expresión génica en células tratadas con PCI.

Para comprobar si el PCI juega algún papel en la transducción de señal, se llevaron a cabo estudios de expresión génica por transferencia tipo Northern. Las sondas que se utilizaron fueron: $\beta 2$ -microglobulina, p53, y tripsina. La $\beta 2$ -microglobulina es un gen constitutivo que se utiliza como control de carga de muestra en el gel. La p53 es un factor de transcripción, que controla el estado del DNA genómico y el ciclo celular, entre otras funciones (Bates S. & Vousden K.H. (1996) *Curr.opin. Genet. Develop.*, 6, 12-19). Si el DNA está dañado, la p53 induce su reparación y si está excesivamente dañado dispara la muerte celular programada o apoptosis. La tripsina es un marcador de células pancreáticas de tipo acinar. La tripsina no la expresan todas las células tumorales y se cree que la expresan las células con poder metastásico y/o invasivo (Fernández E. et al., (1994) *Cancer*, 73, 2285-2295). A continuación se describen las sondas utilizadas:

ES 2 122 912 A1

a) β_2 Microglobulina

Sonda obtenida a partir de PCR de DNA genómico humano. Se obtuvo usando los siguientes "primers":

5 B2M-N901-920/5: TTAGCTGTGCTCGCGCTACT
B2M-N3999-3980: TAACCACAACCATGCTTAC

que se diseñaron a partir del gen de la β_2 microglobulina.

10 La sonda resultante tiene 940 pb. (Gussow. D. et. al. (1987) *J. Immunol.*, 139, 3132-3138)

b) p53

15 Sonda obtenida a partir de la retrotranscripción de mRNA de células humanas. El inserto de 1760pb se insertó en las dianas *Sal I* y *EcoRI* en el plásmido pUC8. El plásmido es ampicilina resistente. (Harlow E. D. et.al. (1985) *Mol. Cel. Biol.*, 5, 1601-1610).

c) *Tripsina*

20 Sonda obtenida a partir del mRNA del tripsinógeno I de páncreas de rata. El inserto de aproximadamente 700 pb, pcXP4-78 se clonó en PBR322 en la diana Pst I. El plásmido presenta resistencia a la tetraciclina y es sensible a la ampicilina (McDonald et al. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 14582-14585).

La metodología utilizada consta de diversas etapas, que se detallan a continuación:

25

1. *Extracción del RNA total: método del Tiocianato de Guanidinio* (Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.*, 162, 156-159).

30 En primer lugar se sembraron 12 frascos de 150cm² con 3x10⁶ células de la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1, cada uno. Estos se dividieron en 3 grupos de 4 frascos: un grupo control y dos grupos tratados con 1 y 10 μ g/mL de PCI respectivamente. Se mantuvieron en cultivo durante 12 días, cambiándoles el medio cada 4 días, añadiéndole PCI fresco. Una vez finalizado el tratamiento se tripsinizaron las células y se guardó el sedimento de células a -80°C. Posteriormente se realizó la extracción del RNA.

35

Para la extracción de RNA es preciso ser extremadamente cuidadoso pues cualquier pequeña contaminación de ribonucleasa degradaría toda la muestra. Por ello es preciso trabajar siempre con guantes limpios, autoclavar todo el material de plástico y utilizarlo solamente para extracción de RNA, lavar el material de vidrio con NaOH 1 N y enjuagar con agua destilada estéril y tratada con DEP (diethylpirocarbonato), y finalmente tratar todas las soluciones acuosas con DEP (Sigma, U.S.A) durante al menos 6 horas en agitación (DEP 0.1%) y autoclavar posteriormente (al autoclavar el DEP es eliminado). Se utilizaron las siguientes disoluciones:

40

45 - Disolución de Stock: 250 g de tiocianato de guanidinio (Promega). 293 mL de H₂O estéril, 17,6 mL de citrato sódico 0,75 M pH 7, añadir 26,4 mL de sarcosil al 10% a 65°C. Esterilizar por filtración y mantener en oscuridad.

50 - Disolución D: mezcla de 0,36 mL de 2-mercaptoetanol por cada 50 mL de disolución de stock (Tiocianato de Guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7, sarcosil 0,5% y 2-mercaptoetanol 0,1M).

- Cloroformo-alcohol isoamílico (49:1)

- Fenol saturado con agua

55

- Acetato sódico 2M pH 4 tratado con DEP y esterilizado

- SDS 0,5% tratado con DEP o EDTA 1mM pH8 tratado con DEP y estéril

60

Se siguió el siguiente procedimiento para extraer el RNA:

1. Utilizar tejido congelado mantenido en nieve carbónica y células frescas o bien congeladas. Mantener todos los aparatos y disoluciones a 4°C. Lavar el material de vidrio con NaOH 1M y enjuagar con

ES 2 122 912 A1

agua estéril tratada con DEP. Sumergir el homogenizador en NaOH 1M durante 10 minutos y enjuagar.

2. Homogeneizar el tejido (100 mg) en un tubo estéril con 1 mL de disolución D. Para las células, añadir 1 mL de disolución D a cada tubo cónico y vortex durante 2 minutos.

5

3. Añadir 0,1 mL de Acetato sódico 2 M pH 4. Vortex 5 segundos.

4. Adicionar 1 mL de fenol. Vortex 5 segundos.

10

5. Añadir 0,2 mL de la mezcla de cloroformoalcohol isoamílico. Vortex 10 segundos. Mantener en hielo 15 minutos.

6. Centrifugar en Sorvall SS-34 a 10000 r.p.m., a 4°C, durante 20 minutos.

15

7. Para precipitar el RNA pasar la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 1 volumen de isopropanol en hielo (o bien añadir 2 volúmenes de etanol frío). Vortex 10 segundos y dejar a -20°C durante una hora.

8. Centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos. Eliminar el sobrenadante.

20

9. Se reprecipita el RNA como sigue: disolver el pellet de RNA en 0,3 mL de disolución D. Se transfiere a un eppendorf y se precipita con 1 volumen de isopropanol (o doble volumen de etanol). Vortex 10 segundos y mantener a -20°C por 1 hora.

10. Centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.

25

11. Lavar el pellet con 0,5 mL de etanol frío al 75%. Centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y secar en rotovapor 15 min.

30

12. Disolver el pellet en 50 μ L de SDS 0.5% a 65°C y mantener a esta temperatura durante 10 minutos. También se puede disolver en EDTA 1mM, pH 8.

2. Electroforesis con ácido cítrico.

35

La concentración de RNA total obtenido se calcula como sigue: Se toman 5 μ L de muestra y se disuelven en 0,5 mL de H₂O tratada con DEP. Se lee la absorbancia a 260 nm en cubetas de cuarzo tratadas con NaOH 1N y lavadas con H₂O autoclavada y tratada con DEP. Se estiman 50 μ g de RNA total por cada unidad de densidad óptica.

40

Para comprobar la calidad del RNA extraído se somete éste a electroforesis en geles de urea y ácido cítrico (Frazier M. L. et al., (1983) *Mol. Cell. Biochem.*,56:,113-122).

-Urea 10 M

-Citrato 0,25 M pH 3,5: 48,03 g de ácido cítrico, 10 g NaOH, llevar a 1 litro.

45

-Tampón de carga: 5mL de citrato 0,25 M, 39 mL de urea 10M, 10 g de sacarosa y 25 mg de azul de bromofenol, llevar a 50 mL con agua.

50

1. Preparar un gel de agarosa al 2%: 2 g de agarosa, 60 mL de urea 10M, 10 mL de citrato 0,25 M y 30 mL de agua destilada. Fundir la agarosa en microondas y preparar el gel de acuerdo con la metodología habitual (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

55

2. Cargar entre 3 y 5 μ g de RNA total por pocillo en un volumen de 20 μ L. Añadir 30 μ L de tampón de carga.

60

3. Para la electroforesis preparar 1 litro de tampón: 100 mL de citrato 0.25 M y 900 mL de agua. Colocar el tampón en la cubeta, teniendo cuidado de que el gel no esté sumergido, que el tampón en ambos lados de la cubeta no entre en contacto.

4. Correr el gel a 100 V hasta que el azul de bromofenol haya recorrido una distancia de unos 3 cm.

ES 2 122 912 A1

5. Teñir el gel entre 15 y 30 minutos con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bromuro de etidio en Tris-HCl 50 mM pH 7,6 (10 mg/mL). Enjuagar con agua. Visualizar en transiluminador de U.V. y fotografiar.

3. Obtención de RNA poli (A+).

En la obtención de RNA poli (A+) es necesario extremar los cuidados para evitar la contaminación por ribonucleasa ya que ningún paso se realiza en presencia de inhibidores de ribonucleasa ni tampoco se desproteíniza la muestra. Así pues es necesario trabajar con material recién esterilizado, guantes y disoluciones tratadas con DEP y esterilizadas.

3.1 Columnas de oligo-dT (Frazier M. L. et al., (1981) Biochemistry, 20, 367-371)

- Oligo(dT) cellulose tipo 3 (Collaborative Research Incorporated, U.S.A.)

- Tampón de unión de alta fuerza iónica: NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, Tris 10 mM, sarcosil 0,1%, pH 7,6. Para preparar el tampón x4: 200 mL de NaCl 5M, 100 mL de EDTA 20 mM, 20 mL de Tris 1M, 10 mL de sarcosil 20%, llevar a 500mL con H₂O. Tratar con DEP y autoclavar.

- Tampón de baja fuerza iónica: Tris 10 mM, sarcosil 0,1%, pH 7,6 (10 mL de Tris 1M y 5 mL de sarcosil 20% en un volumen total de 1 litro), tratar con DEP y esterilizar por autoclave.

- Acetato sódico 4,5 M pH 6 tratado con DEP y esterilizado.

1. Preparar una jeringa de 1mL estéril tapando el orificio de salida con lana de vidrio. Tomar unos 0,5 g de resina de oligo-dT y disolverla en tampón de alta fuerza iónica 1x. Dejar sedimentar con cuidado, lavar la columna con 50 mL de tampón de alta fuerza iónica 1x.

2. Preparar la muestra. Se ha de partir de 2 mg de RNA total a una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de alta fuerza iónica 1x, para ello diluiremos la muestra con tampón de alta fuerza iónica 4x y agua destilada estéril libre de ribonucleasa. Calentar la muestra a 70°C durante 5 minutos para reducir la agregación del RNA, enfriar rápidamente en hielo. Ajustar a tampón de alta fuerza iónica 1x con el tampón preparado a 4x y agua (no añadir tampón de alta fuerza iónica a la muestra antes de calentarla y enfriarla).

3. Cargar la muestra en la columna. Recoger el volumen eluido. Lavar la columna con tampón de alta fuerza iónica 1x hasta que la DO₂₆₀ sea insignificante, sobre unos 15 mL.

4. Eluir el RNA poli (A+) retenido en la columna con tampón de baja fuerza iónica (entre 2-2,5 mL) recogiendo fracciones de 0,5 mL. Recoger fracciones hasta que las lecturas a 260 nm sean despreciables.

5. Cada fracción eluida con tampón de baja fuerza iónica debe ser precipitada con 2 volúmenes de etanol frío y 1/24 volúmenes de acetato sódico 4,5 M pH 6. Llevar todos los volúmenes a 3 mL en tubos de ultracentrifuga para facilitar la posterior centrifugación. Mantener toda la noche a -20°C.

6. Equilibrar los tubos con etanol frío. Colocarlos en el rotor SW 60 de la ultracentrifuga Beckmann. Ultracentrifugar a 40.000 r.p.m. 30 minutos.

7. Lavar el pellet con 3 mL de etanol al 70% frío. Ultracentrifugar a 40.000 r.p.m. (SW60 Beckman) 30 minutos.

8. Resuspender en 100 μL de agua estéril libre de ribonucleasas. Determinar la concentración por lectura a 260 nm. El RNA poli (A+) supone un 5% del RNA total, mediante éste método se consiguen recuperaciones entre un 50%-75%

3.2. Magneto-esferas

El sistema de aislamiento de RNA poli (A+) con magneto-esferas (PolyAtract mRNA Isolation Systems, Promega, U.S.A.) permite aislar mRNA en 45 minutos partiendo de RNA total sin utilizar columnas de Oligo (dT) celulosa eliminando los problemas que este método conlleva. El sistema utiliza un cebador de oligo (dT) biotinizado que hibridiza en disolución a una alta eficiencia con la región 3' poli (A+) presente en la mayoría de los mRNA maduros de eucariotas. Los híbridos son capturados y lavados a alta astringencia utilizando partículas paramagnéticas (PMP) unidas a estreptavidina y un soporte magnético.

ES 2 122 912 A1

El mRNA se eluye de la fase sólida mediante la simple adición de agua estéril libre de ribonucleasa.

-Se utiliza 20xSSC : 87,7 g de NaCl, 44,1 g de citrato sódico, 500 mL de H₂O y ajustar el pH a 7,2 con NaOH. Tratar con DEP y esterilizar.

5

1. En un tubo estéril tomar entre 0,1-1 mg de RNA total y llevar hasta un volumen de 500 μ L con agua libre de ribonucleasa. Colocar el tubo en un bloque térmico a 65°C durante 10 minutos.

10 2. Añadir 3 μ L del cebador oligo (dT) biotinizado y 13 μ L de 20xSSC al tubo que contiene el RNA. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente hasta que se enfríe completamente (unos 10 minutos). Preparar 1,2 mL de 0,5xSSC estéril (30 μ L de 20xSSC y 1,17 mL de agua) y 1,4 mL de 0,1xSSC estéril (7 μ L de 20xSSC y 1,393 mL de agua).

15 3. Resuspender las PMP-estreptavidina suavemente hasta que estén completamente dispersas en el tubo y capturarlas en el soporte magnético hasta que todas las partículas estén en el lateral del tubo (30 segundos). Retirar el sobrenadante con una pipeta con mucho cuidado (no centrifugar las partículas).

20 4. Lavar las PMP-estreptavidina tres veces con 0,5xSSC (0,3 mL por lavado) resuspendiendo las partículas en la disolución, capturando las PMP con el soporte magnético y retirando con cuidado la disolución con ayuda de una pipeta.

5. Resuspender las partículas magnéticas en 0,1 mL de 0,5xSSC. Añadir el contenido de la reacción de "ANNEALING". Incubar a temperatura ambiente 10 minutos.

25 6. Capturar las PMP utilizando el soporte magnético y eliminar el sobrenadante con cuidado sin tocar las partículas. Conservar el sobrenadante de RNA hasta estar seguros que el mRNA se ha unido al cebador de oligo (dT).

30 7. Lavar las partículas cuatro veces con 0,1xSSC (0,3 mL por lavado) igual que en el paso 4. En el lavado final, eliminar la totalidad de la fase acuosa.

35 8. Para eluir el mRNA, resuspender el pellet de partículas paramagnéticas en 0,1 mL de agua libre de ribonucleasa. Capturar la PMP en el soporte y transferir el mRNA eluido a un eppendorf estéril. Repetir la elución volviendo a resuspender las partículas en 0,15 mL de agua. Reunir éste mRNA con el anterior (volumen total 0,25 mL). Si en el proceso hemos arrastrado alguna partícula, eliminarla por centrifugación. Determinar la concentración por lectura a 260nm en cubetas de cuarzo libres de ribonucleasa.

4. *Transferencia tipo Northern.*

40

4.1. *Geles desnaturalizantes en agarosa y formaldehído.*

- Tampón de elución x 10 (MOPS): 41,8 g de MOPS, 4,1 g de acetato sódico, 40 mL de EDTA 250 mM, H₂O hasta 1 litro, ajustar a pH 7 con NaOH. Filtrar y mantener en la oscuridad.

45

- Disolución de desnaturalización para muestras: 0,72 mL de 10xMOPS, 3,6 mL de Formamida 98%, 1,17 mL de Formaldehído 37% y 0,51 de H₂O. Filtrar. Preparar disolución nueva cada 3 meses.

- Tampón de carga: 1 mL de 10xMOPS, 2,5 g de Ficoll, 5 μ g de Azul de Bromofenol, H₂O hasta 10 mL.

50

1. Preparar el gel como sigue: Pesar 1, 87 g de agarosa (GCG-FMC), añadir 24 mL de tampón de elución 10x y 168,8 mL de H₂O. Llevar a ebullición en microondas hasta que toda la agarosa esté fundida. Enfriar hasta 60°C y adicionar 39,2 mL de formaldehído al 37% en campana extractora, mezclar. Colocar la agarosa en un equipo Maxi-Protean (Bio-Rad) con vidrio pequeño esmerilado (33x16) y pinza de 10 pocillos. Dejar polimerizar el gel durante 1 hora.

55

2. Preparación de las muestras: Tomar en un eppendorf 20 μ g de RNA total disuelto en agua por muestra. Secar las muestras en rotavapor y posteriormente añadir 5 μ L de agua libre de ribonucleasa, preparar los marcadores de RNA (5 μ L) como el resto de las muestras. Adicionar 20 μ L de disolución de desnaturalización de muestras. Calentar a 60°C en un baño durante 15 minutos y a continuación enfriar en hielo. Añadir 10 μ L de tampón de muestras.

60

ES 2 122 912 A1

3. Preparar 3 litros de tampón de elución y montar el equipo de electroforesis. Cargar las muestras con ayuda de una pipeta automática. Correr la electroforesis a 70-80V durante 3 horas aproximadamente.

4. Sacar el gel del equipo y tratar en una estufa a 65°C en H₂O tratada con DEP (previamente mantenida a 65°C) durante 30 minutos para eliminar el formaldehído que contiene el gel.

5. Cortar el bolsillo correspondiente a los marcadores de peso molecular y teñir durante 20 min con bromuro de etidio. Desteñir toda la noche y fotografiar.

4.2. *Transferencia.*

Además del material reseñado anteriormente, en este apartado se utiliza una disolución 20xSSC.

1. Cortar el filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schwell, Alemania; o bien filtro de Nilón, Amersham) del tamaño del gel, tres trozos de papel Whatman nº1 del mismo tamaño y dos trozos de 33 x 16 cm.

2. Preparar 1 litro de 10 x SSC. Sumergir los filtros en la disolución. Colocar en la bandeja la disolución 10 x SSC, encima el vidrio y los 2 papeles Whatman que deben llegar hasta el fondo de la bandeja.

3. Poner el gel encima y sobre éste el filtro (de nitrocelulosa o nilón); eliminar las burbujas entre el gel y el filtro con ayuda de una pipeta. Colocar encima los tres papeles Whatman eliminando las burbujas cada vez, y sobre éstos depositar servilletas de papel. Se envuelve todo en papel transparente para evitar evaporaciones y se pone un peso de aproximadamente 1 Kg sobre el papel.

3. Dejar transferir toda la noche.

4.3. *Fijación del RNA al filtro.*

En el caso de filtros de nitrocelulosa el proceso a seguir es: se saca el filtro de la transferencia y se seca con papel de filtro. A continuación se coloca en el horno de vacío a 80°C durante 2-4 horas. El filtro se puede guardar de esta forma hasta su utilización envuelto en papel de filtro. Si se utilizan filtros de nilón no es necesario secarlos tras la transferencia.

Para fijar el RNA se envuelve el filtro en papel transparente y se coloca en el transiluminador de luz U.V. durante 5 minutos con la cara donde se encuentra el RNA hacia la luz. El filtro se guarda envuelto y húmedo hasta su utilización. Los filtros de nilón utilizados permiten fijar el RNA con mayor eficiencia que la nitrocelulosa y se pueden reutilizar con pérdidas de RNA menores.

4.4. *Marcado radioactivo de la sonda.*

El protocolo seguido para el marcaje de las sondas con ³²P es el descrito por Feienberg, A.P., and Volgestein, B. (1983) *Anal. Biochem.*, 132, 6-13, que se detalla a continuación.

- Disolución TM: 250mM Tris-HCl, 25 MM MgCl₂, 50mM β-mercaptoetanol, pH 8.

- Disolución DTM: dATP, dTTP y dTGP 100μM en disolución TM.

- Disolución OL: Tris 1mM y EDTA 1mM pH 7,5 + 90 unidades /mL de oligodeoxiribonucleótidos.

- Disolución LS: Hepes 1M pH6,6 : DTM : OL (25:25:7). Almacenar las alícuotas a -20°C.

- Disolución de Stop: EDTA 10 mM, 1% SDS.

- Tampón NET: NaCl 100mM, EDTA 2mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,6.

- BSA Fracción V (Boehringer Mannheim, Alemania) 10 mg/mL.

- (α-³²P) dCTP 3000Ci/mmoL. 10.0 mCi/mL (Amersham).

- t-RNA (Serva, Alemania) 10 mg/mL.

- Sephadex G-100 pureza para Biología Molecular (Pharmacia, Suecia).

ES 2 122 912 A1

- Disolución de centelleo (Cytoscint TM, ICN Biomedicals Inc., U.S.A.).

- Acetato sódico 2M pH 5,0.

5 1. Poner entre 50 y 100 μg de ^{32}p en un eppendorf (5 μL). Secar en rotovapor 10 minutos. Añadir 5,7 μL de LS y 1 μL de BSA

2. Adicionar 75ng de sonda a un eppendorf y llevar a 6,6 μL con agua estéril. Hacer un orificio en la
10 tapa del eppendorf, hervir durante 3-5 min. Enfriar en hielo.

3. Añadir la sonda al tubo eppendorf con ^{32}p , LS y BSA.

4. Adicionar 1 μL de DNA polimerasa (Klenow), mezclar el contenido con agitación suave y centrifugar
15 unos segundos. Mantener toda la noche a temperatura ambiente.

5. Añadir 25 μL de disolución de stop y 5 μL de t-RNA.

6. Separar la sonda marcada del ^{32}p -dCTP libre en una columna de Sephadex G-100 de 5mL en
20 tampón NET preparada en una pipeta de 10 mL de plástico estéril. Cargar la mezcla de reacción y eluir con tampón NET. Recoger 10 fracciones de 0,5mL.

7. Tomar 10 μL de cada fracción y añadir 2 mL de disolución de centelleo, mezclar y leer en el contador
de centelleo.

8. Recoger el primer pico, añadir 50 μL de Acetato sódico 2M pH 5 y 1 mL de etanol a cada eppendorf.
Mantener a -80°C durante 30 minutos.

9. Centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C 15 minutos. Descartar el sobrenadante, secar el pellet y resus-
30 pender en 100 μL de TE.

10. Mezclar 5 μL de cada eppendorf con 2mL de disolución de centelleo y leer las muestras en el
contador de centelleo. Estimar el número de cuentas por μL .

35 4.5. Prehibridización.

- 20 x SSPE: 179 g de NaCl, 27,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7,4 g EDTA, y H_2O hasta 500 mL. Tratar con
DEP y autoclavar

40 - 50 x Disolución Denhardtts: 5g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona, 5 g de BSA fracción V, y H_2O
hasta 500 mL. Tratar con DEP. Alicuotar y congelar.

- Disolución de prehibridización: 1 g de Glicina, 1mL de SDS 20%, 25 mL de 20 x SSPE y 10 mL de 50
x Disolución Denhardtts llevar a 100mL con H_2O tratada con DEP. Preparar justo antes de su uso.

45 1. Colocar el filtro en una bolsa de hibridización. Añadir 50 mL de la disolución de prehibridización
por filtro. Eliminar las burbujas y sellar la bolsa herméticamente. Dejar incubar en un baño a 42°C con
agitación toda la noche.

50 4.6. Hibridación.

- 20 x SSPE

- 50 x disolución Denhardtts

55 - t-RNA: 10 mg tRNA (Serva. Alemania) por mL de agua tratada con DEP.

- Disolución de hibridización: 0,1 g de Glicina, 2,5 mL de 20 x SSPE, 0,1 mL de SDS 20%, 0,5 mL de 50
x disolución Denhardtts, 0,25 mL de t-RNA (10mg/mL), 4,5 mL de Formamida y 2,05 mL de agua libre
60 de ribonucleasa. Preparar justo antes de su uso.

1. Sacar el filtro de la bolsa y colocarlo en papel Whatman para eliminar los restos de disolución de

ES 2 122 912 A1

prehibridación. Dejar el filtro en el papel 5-10 minutos como máximo y colocar en una bolsa de hibridación nueva.

2. Preparar la disolución de hibridación. Tomar la sonda marcada y estimar 1×10^7 cpm por filtro. Colocar la sonda en un eppendorf, hacer un agujero en el tapón y hervir durante 3 minutos. Enfriar rápidamente en hielo. Añadir la sonda a 3mL de disolución de hibridación.

3. Añadir la disolución con la sonda desnaturalizada a la bolsa que contiene el filtro. Eliminar las burbujas con ayuda de una pipeta, con extremo cuidado ya que la disolución es radioactiva. Sellar la bolsa.

4. Incubar en un baño con agitación a 42°C toda la noche.

4.7 Lavados.

- 20 x SSC

- SDS 20%

1. Sacar el filtro de la bolsa con cuidado y colocarlo en papel Whatman para eliminar los restos de disolución de hibridación. Poner el filtro en una bandeja en agitación para proceder a los lavados.

2. Lavados:

a) 2 x SSC (50mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5mL SDS 20%) en 500 mL. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Repetir una vez más.

b) 1 x SSC (25 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5mL SDS 20%) en 500 mL. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

c) 0,5 x SSC (12,5 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5mL SDS 20%) en 500 mL. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

d) 0,1 x SSC (2,5 mL 20 x SSC), 0,5% SDS (12,5mL SDS 20%) en 500 mL. Incubar a 42°C durante 30 minutos.

4.8. Autorradiografía.

Una vez lavado el filtro, se coloca en papel Whatman, se eliminan los restos de disolución y se deja secar al aire en el caso de filtros de nitrocelulosa. Los filtros de nilón no se secan. Posteriormente el filtro se envuelve en papel transparente y se coloca en un cassette de exposición con una película Kodak X-OMAT AR (U.S.A.) con dos placas amplificadoras, poniendo la cara que contiene el RNA hacia la película. Se impresiona la película colocando el cassette a -80°C el tiempo apropiado. La autorradiografía se revela en la cámara oscura con disolución reveladora Kodak. Se para el revelado en acético al 10% y se fija con disolución fijadora Kodak. Se lava la película con agua y se seca al aire.

4.9. Eliminación de la sonda.

Los filtros una vez autorradiografiados, pueden ser reutilizados tras la eliminación de la sonda marcada del filtro y vueltos a hibridar. Para ello se procede de la forma siguiente:

1. Colocar el filtro en una bolsa de hibridación nueva con 50 mL de agua libre de ribonucleasa (tratada con DEP y estéril) a 65°C. Sellar la bolsa evitando que queden burbujas.

2. Colocar la bolsa dentro de una bandeja con agua hirviendo. Mantener la bolsa a 100°C en agitación durante 5-10 minutos.

3. Sacar el filtro de la bolsa y secar al aire en el caso de filtros de nitrocelulosa. Envolver el filtro en papel transparente y exponer toda la noche a -80°C en las condiciones anteriormente descritas.

4. Comprobar que no existe marcaje. El filtro puede volver a ser hibridado.

4.10. *Contaje de emisión beta.*

La cuantificación de los filtros hibridados con las sondas respectivas se realizó con un contador Beta-
 cospe 603 blot Analyzer (Betagen, USA). El tiempo de contaje fue de 45 minutos para el filtro hibridado
 5 con la sonda de p53 Y β_2 microglobulina y de 2 horas para la sonda de tripsina.

En la Tabla 18 que se presenta a continuación se pueden observar los resultados obtenidos para cada
 una de las sondas en el contador beta en ausencia y en presencia de PCI.

10 Asumiendo que las cuentas de la β_2 -microglobulina son una indicación de la cantidad total de
 RNApoli-A se pueden estandarizar los datos como porcentaje de cuentas de la banda respecto a las
 cuentas de la β_2 -microglobulina de las mismas células, dando un valor que depende de la abundancia del
 mRNA específico respecto al total de mRNA.

15 Los resultados se presentan en la Tabla 19.

TABLA 18

20 *Resultados de las cuentas beta correspondientes a los Northern de las células
 Capan-1, de los diferentes tratamientos hibridados con las sondas de p53,
 tripsina y β_2 -microglobulina.*

Tratamiento	p53	Tripsina	β_2 -microglobulina
Control	138	511	955
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	882	396	2183
110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	1111	432	6287

TABLA 19

35 *Cuentas de una banda respecto a las de la β_2 microglobulina.*

Tratamiento	p53/ β_2	Tripsina/ β_2
Control	0,1445	0,5351
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	0,4040	0,1814
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	0,1767	0,0687

Partiendo de estos datos se puede evaluar cuantas veces es más abundante (o menos) un mRNA en
 las células tratadas respecto a las control. Así, en la Tabla 20 se presentan los resultados obtenidos del
 cociente entre el número de cuentas estandarizado para un tratamiento y el número de cuentas de las
 50 células control.

En resumen, al tratar las células con una concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI se aumenta 2,8 veces el nivel
 de expresión del mRNA de la p53, y disminuye 2.9 veces el de la tripsina. Y para el tratamiento con 10
 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumenta 1,2 la expresión de la p53 y disminuye 7,8 veces la de la tripsina.

Estos resultados indican que el tratamiento con PCI provoca una sobreexpresión de p53. Hasta la
 fecha, dicha sobreexpresión se ha descrito para situaciones de estrés celular, como radiaciones ultravioleta
 y gamma, calor, falta de suero en el medio de cultivo de las células o algún carcinógeno (Bates S. &
 60 Vousden K.H. (1996) *Curr.Opin. Genet. Develop.* 6, 12-19). Una sobreexpresión de p53 provoca o
 bien una inducción de apoptosis, o una parada en G_1 . De acuerdo con los resultados expuestos en los
 apartados (4.F.2. y 4.F.4) no se ha observado un gran incremento de apoptosis, pero sí un aumento
 del número de células de Capan-1 en G_1 al ser tratadas con PCI. Dicha línea celular, dejando a parte

problemas de heterogeneidad de la línea celular entre laboratorios, presenta una p53 mutada (Barton C. M. et al. (1991) *British J. cancer*, 64, 1076-1082; Berrozpe et. al. (1994) *Int. J. Cancer.*, 58, 185-191). Esta mutación puede anular su poder de inducción de apoptosis, pero no de la parada en G₁ (Rowan et. al. (1996) *EMBO J.*, 15, 827-838). De hecho es lo que estamos observando al tratar las células de la línea Capan-1 con PCI.

TABLA 20

Cuantificación de la mayor o menor expresión de p53 y tripsina en células tratadas con diferentes concentraciones de PCI respecto a las células control.

Tratamiento	p53	Tripsina*
1 µg/mL PCI	2,8	2,9
10 µg/mL PCI	1,2	7,8

* En el caso de la sonda de tripsina al ser el número de cuentas de las células tratadas inferior al número de cuentas de las células control, se ha obtenido el cociente inverso (control/tratamiento) y el número resultante indica las veces que estás inhibida la expresión del mRNA par dicha proteína

El tratamiento con PCI ha provocado por tanto una gran disminución en la expresión de tripsina, típica proteína de estirpe acinar (Koivunen E. et al., (1991) *Cancer Res*, 51, 2107-2112).

4.F.6.a Estudios de unión competitiva del PCI a receptores de factores de crecimiento.

Con la finalidad de determinar si el PCI se une a receptores de factores de crecimiento se realizaron ensayos de unión competitiva dado que ya se había comprobado que el PCI era internalizado rápida y masivamente. Se ha estudiado la posible unión del PCI al receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), puesto que se ha demostrado que PCI y EGF son notinas, que comparten un núcleo estructural común denominado "nudo de cisteínas" (cystine-Knot) (Lin S.L. & Nussinov R. (1995) *Nature Med.*, 2, 835-837; Sun P.D. (1995) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Strut.*, 24, 269-91). Se ha seguido un protocolo estándar de "binding" (unión o interacción) de acuerdo con el trabajo de Reiss M. et al. (1991) *Cancer Res*, 51, 6254-6262, con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

Aparte del material reseñado en el apartado 4.B.1, se emplearon los materiales y disoluciones precisos para realizar un ensayo de "binding", que se describen a continuación:

- Medio de "binding": DMEM-0,3% BSA- 20 mM Hepes pH 7,4.

- EGF: se prepara una disolución stock 12µM en tampón Hepes 20mM-BSA 0,3%. Las diluciones posteriores se realizan en el medio de "binding". (ICN, U.S.A).

- ¹²⁵I-EGF: se prepara una disolución stock en tampón Hepes 20mM-BSA 0,3%. Las diluciones posteriores se realizan en el medio de "binding". (ICN, U.S.A).

- PCI: se prepara una disolución stock 1 mg/mL en H₂O milliQ y las diluciones posteriores en medio de "binding".

- Disolución de lavado: PBS-BSA 0,1%.

- Disolución de permeabilización NaOH 1N-SDS 0,1%.

- Contador gamma. (LKB. Suecia)

Los estudios de unión competitiva del PCI a receptores para el factor de crecimiento epidérmico se realizaron con la línea de adenocarcinoma pancreático humano Capan-1. El procedimiento detallado que se ha seguido es el siguiente:

ES 2 122 912 A1

1. Se sembró $1,25 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 24 pocillos, que se mantienen en cultivo durante 48 h en DMEM FBS 10%. Se siembran triplicados para cada concentración de competidor a ensayar.

2. Se reemplazó, 24 h antes del ensayo, el medio completo de los pocillos por 2 mL, por pocillo, de DMEM sin suero fetal.

3. Al día siguiente se lavaron las células, por 3 veces, con medio de "binding" frío.

4. Se incubaron las células con 70 μL de medio de "binding" en el que se habían añadido las concentraciones de competidor a ensayar. En el caso del EGF las concentraciones ensayadas fueron de 0, 0,005, 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 nM. Para el PCI las concentraciones ensayadas fueron de 0, 2,32 nM, 23,28 nM, 232,8 nM, 2328,2 nM, 11641,4 nM y 46565,7 nM, que se utilizaron previamente en los ensayos de proliferación. Posteriormente se añadieron 40000 cpm (350 pM) de ^{125}I -EGF. La incubación se realizó a 4°C durante 5 horas. Para determinar la unión inespecífica, tanto en el caso de competencia con EGF no marcado como con PCI, se incubaron pocillos control con un exceso 100 veces molar de EGF no marcado (100nM) respecto al ^{125}I -EGF ensayado.

5. Se lavaron las células rápidamente 3 veces con 500 μL de la disolución de lavado fría.

6. Se solubilizaron mediante incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con la solución de permeabilización.

7. La radiactividad en la suspensión se determinó en un contador gamma. Para determinar la unión específica, a la radiactividad total unida se le restó el valor de unión inespecífica.

En primer lugar se realizó una competencia entre el ^{125}I -EGF y EGF no marcado, este ensayo nos permitiría determinar si la línea en estudio, Capan-1, presenta un sólo tipo de receptor para este factor de crecimiento o bien más de uno. A partir del ensayo se determinó la radiactividad unida para cada una de las concentraciones de competidor no marcado ensayadas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 21. A partir de estos datos se determinó el porcentaje de unión (P), donde el 100% es la cantidad de unión específica en ausencia de competidor (B_0). Se aplicó la fórmula siguiente para determinar el porcentaje:

$$P = \frac{B \times 100}{B_0}$$

donde B es la cantidad de unión específica en presencia de una concentración determinada de competidor.

En la Figura 23 se observa que al representar el log [EGF] versus el porcentaje de unión no resulta una línea recta. Este resultado está indicando que el EGF se une a dos tipos de receptores, uno de alta y otro de baja afinidad. Con el fin de comprobar el tipo de unión que se está dando se realizó una representación de pseudo-Hill o de Logit-log (Pratt W.B. y Taylor P. "Principles of drug action. The basis of pharmacology". Ed. Churchill Livingstone, N. Y., 1990). Se utilizan los datos de porcentaje de unión específica para calcular el log ($P/[100-P]$), el cual se representa versus el logaritmo de la concentración de competidor.

TABLA 21
Competencia del EGF frente ^{125}I -EGF. para los receptores de EGF de la línea Capan-1.

[EGF] nM	log [EGP] M	Unión específica (cpm)	Desviación estándar	Porcentaje de unión específica
0,00001	-12	1896.2	94,9	99,9
0,005	-11.3	1641.5	85,0	86,57
0,01	-11	1224.8	86,9	64,59

ES 2 122 912 A1

TABLA 21 (Continuación)

[EGF] nM	log [EGP] M	Unión específica (cpm)	Desviación estándar	Porcentaje de unión específica
0,1	-10	844,50	171,9	44,53
1	-9	395,5	43,27	20,33
10	-8	56	10	2,95

La pendiente de la recta resultante se denomina coeficiente de pseudo-Hil. Si este coeficiente es igual a -1 indica que el competidor se está uniendo a un solo tipo de receptor, y si el coeficiente es diferente de -1 indica que se puede realizar un ajuste de los datos para un tipo de competición con dos receptores.

En la Tabla 22 se pueden observar los valores de Logit-log obtenidos a partir de los datos originales, y en la Figura 24 se puede observar la representación de pseudo-Hill.

La ecuación de la recta resultante del gráfico es la siguiente:

$$y = -9,0949 - 0,92058x$$

con un coeficiente de regresión de $r = 0,90804$ resultando que la pendiente de la recta es diferente de -1 y, por lo tanto, se puede considerar que el EGF se está uniendo a dos tipos diferentes de receptores, lo cual permite llevar a cabo un ajuste de los datos para una competición con dos lugares de unión.

TABLA 22

Valores para la representación de Logit-log.

Log [EGF] M	Log (P/ [100-P])
-12	2,99
-11,3	0,809212
-11	0,2610825
-10	-0,095292
-9	-0,579147
-8	-1,516677

El ajuste se ha realizado mediante el programa Graphpad Inplot4. Se realiza un ajuste no lineal para competencia por dos lugares de unión. Se ha representado el logaritmo de la concentración de competidor frente a los valores de Logit-log (Figura 25).

Del anterior ajuste se determinó el valor de IC_{50} , es decir, la concentración de competidor que inhibe el 50% de la unión específica, para los dos lugares de unión. Así como se determinó el porcentaje de los dos tipos de lugares de unión. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 23.

Una vez caracterizados los tipos de receptor que presentan las células de la línea Capan-1 para el EGF, se procedió a realizar un estudio de competencia entre el PCI y el ^{125}I -EGF, para comprobar si el

ES 2 122 912 A1

PCI compite por los mismos receptores que el EGF. Igual que para el estudio de competencia anterior entre ^{125}I -EGF y EGF a partir del ensayo se determinó la radiactividad unida para cada una de las concentraciones de PCI ensayadas.

TABLA 23

Porcentaje de los dos tipos de lugares de unión del EGF en sus receptores en células Capan-1.

Lugar de unión	IC50	% receptores
Alta afinidad	0,6 pM	82,3
Baja Afinidad	2,82 nM	17,8

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 24. A partir de estos datos originales se determinó el porcentaje de unión (P).

TABLA 24

Competencia del PCI frente ^{125}I -EGF, para los receptores de EGF de la línea Capan-1

[PCI] nM	log [PCI] M	Unión específica (cpm)	Desviación estándar	Porcentaje de unión específica
1	-9	1597	100	99
2,32	-8,63	1503,5	130	94,14
23,2	-7,63	1307	117	83,78
232,8	-6,63	1250	212	80,13
2328,2	-5,83	621,5	21,9	39,38
11641	-4,93	582,6	86,19	37,35
4656	-4,33	543,33	88,75	34,83

En la Figura 26 se representan los resultados recogidos en la Tabla 24. En ellos se observa que al representar el log [PCI] versus el porcentaje de unión a los receptores tipo EGF en células Capan-1 no resulta una línea recta. Esto parece indicar que el PCI se está uniendo a dos tipos de receptores, uno de alta y otro de baja afinidad.

En este caso, también se llevó a cabo una representación de pseudo-Hill o Logit-log, para calcular el coeficiente de pseudo-Hill, y comprobar si el PCI se estaba uniendo a los dos receptores para EGF que presentan las células de Capan-1.

En la Tabla 25 se pueden observar los valores de Logit-log obtenidos a partir de los datos originales, y en la Figura 27 se puede observar la representación de pseudo-Hill.

TABLA 25
Valores para la representación de Logit-log.

5	Log [PCI] M	Log (P/ [100-P])
	-9	1,99
10	-8,63	1,205
	-7,63	0,713
15	-6,63	0,605
	-5,83	-0,1873
20	-4,93	-0,2246
	-4,33	-0,272

25 La ecuación de la recta resultante del gráfico es la siguiente:

$$y = -2,4589 - 0,44789x \text{ con un coeficiente de regresión de } r = 0,94546$$

30 Se observa que la pendiente de la recta obtenida es diferente de -1 y, por lo tanto, se puede considerar que el PCI se está uniendo a dos tipos diferentes de receptores y que es correcto hacer el ajuste de los datos para una competición con dos lugares de unión.

35 Seguidamente se realizó una representación (mediante el programa Graphpad Inplot 4) con un ajuste no lineal para analizar la competencia por dos lugares de unión, tal como ya se había hecho para el EGF, representando el logaritmo de la concentración de competidor frente a los valores de Logit-log, tal como se muestra en la Figura 28.

40 Del anterior ajuste se determinó el valor de IC₅₀ para los dos lugares de unión y el porcentaje de cada tipo de lugares de unión. Los resultados se presentan en la Tabla 26.

TABLA 26
Porcentaje de los dos tipos de lugares de unión

45	Lugar de unión	IC ₅₀	% receptores
	Alta afinidad	3,96 pM	99,7
50	Baja Afinidad	0,579 μM	0,3

55 Los resultados descritos indican la existencia de dos tipos de receptores para el EGF, en las células de la línea Capan-1, uno de baja y otro de alta afinidad; los valores de IC₅₀ obtenidos para dichos receptores coinciden con los resultados descritos en la literatura (Groenen I.C. et al. (1994) *Growth Factors*, 11, 235-257). El PCI compite con el ¹²⁵I-EGF para unirse al receptor de dicho factor de crecimiento; el desplazamiento de EGF generado por la presencia de PCI se produce mayoritariamente en el receptor de alta afinidad, siendo la fuerza de unión del PCI a dicho receptor unas 6 veces inferior a la del EGF.

60

ES 2 122 912 A1

4.F.7. Estudio de fosforilación basal del receptor de EGF, o bajo el estímulo de EGF solo o más PCI, en las líneas celulares A431 y Capan-1.

Una vez determinado que el PCI se unía al receptor de EGF mediante estudios de unión competitiva a dicho receptor, se procedió a estudiar si el PCI actúa como un antagonista del EGF inhibiendo la fosforilación del receptor de dicho factor de crecimiento, tanto en estado basal como bajo la estimulación por parte del propio EGF. El material y protocolo utilizados ha sido el descrito por Donato, N.J. et. al. (1989) *J. of Cell. Biochem.*, 41,139-157.

Se realizaron este tipo de experimentos con dos líneas celulares diferentes A431 y Capan-1, la primera es una línea de cáncer de vulva de tipo escamosa que tiene un número muy elevado de receptores de EGF (Reiss, M. et. al. (1991) *Cancer Research*, 51,6254-6262) y la segunda ha sido la línea de adenocarcinoma pancreático humano en la cual se ha observado que el PCI compite con el EGF por los receptores de dicho factor.

Además del material detallado en los Apartados 4.B.1 y 4.B.2, el material empleado fue el siguiente:

- Tampón 1M de fosfato sódico pH 7,4: se preparó mezclando 19 mL de 1M NaH₂PO₄ con 8 mL de 1M Na₂HPO₄.

- Tampón de lisis RIPA B: su composición es 20mM tampón fosfato sódico pH 7,4, 1% tritón X-100, 150 mM NaCl y 5mM EDTA. Esta disolución se guarda a 4 °C.

- Disolución de leupeptina: se prepara un stock 10µg/mL que se conserva a -20°C.

- Disolución 250mM de vanadato sódico, se conserva a -20°C.

- Tampón ICKA: su composición es 10mM tampón fosfato sódico pH 7,4, 150mM NaCl y 0,1% tritón X-100. Esta disolución se guarda a 4 °C.

- Disolución 100nM MnCl. Esta disolución se guarda a 4 °C.

- Tampón vanadato Hepes: su composición es 20mM Hepes pH 7,4 y 100µM vanadato sódico.

- Tampones para realizar una electroforesis de geles de poliacrilamida PAGE-SDS (Laemmli U.K. (1970) *Nature*, 227:680-5).

- Disoluciones 2x, 3x o 5x de tampón de carga para PAGE-SDS. Añadir 5% de β-mercaptoetanol justo antes de usar.

- Disolución 1M KOH. Esta disolución se conserva a temperatura ambiente.

- Disolución de fijación: 40% metanol y 10% ácido acético.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Preparación de las células para lisarlas:

1.a. Cultivar las células en placas de petri de 100mm hasta alcanzar un 70% de confluencia.

1.b. Lavar las células dos veces con PBS atemperado a 37°C. Seguidamente añadir medio sin suero y hacerlas crecer en el mismo durante 18h.

1.c. Lavar nuevamente las células 2 veces con PBS atemperado y añadir nuevo medio sin suero. A continuación añadir PCI a la concentración a estudiar a los cultivos que se quieran tratar y incubar durante 10 minutos a 37°C. Seguidamente añadir EGF a los cultivos (5ng/mL en el caso de la línea Capan-1 y 1ng/mL para la línea A431) e incubar nuevamente durante 10 minutos a 37°C.

1.d. Retirar el medio de cultivo y lavar dos veces con PBS frío.

1.e. Preparar el tampón RIPA B: preparar una disolución de PMSF 200 mM en etanol. Añadir al tampón RIPA incompleto (el descrito en material) PMSF a una concentración final 5mM, ajustar el pH

ES 2 122 912 A1

a 7,4 con NaOH 1M y filtrar la disolución a través de un filtro de $0,22\mu\text{m}$. Entonces, añadir al 1% (v:v) aprotinina, $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina y $250\mu\text{g}/\text{mL}$ de vanadato sódico. Mantener la disolución de RIPA B en hielo.

- 5 1.f. Añadir 0,5 mL de RIPA B a cada placa. Rascar las células con un rascador.
- 1.g. Transferir el lisado celular a tubos de homogeneización de vidrio, puestos previamente en hielo. Homogeneizar 50-60 veces.
- 10 1.h. Transferir a tubos corex de 15mL previamente enfriados y centrifugar a 10.000 rpm. durante 10 minutos a 4°C .
- 1.i. Transferir el sobrenadante a eppendorfs y mantenerlos en hielo. Descartar los pellets.
- 15 1.j. Determinar la concentración de proteína usando el método de Bradford (Bradford M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248-254), diluyendo las muestras 1:100 en agua y añadiendo el mismo volumen de RIPA B que de muestra en las diluciones a los tubos de estándar.
- 1.k. Calcular el volumen de lisado celular necesario para tener $250\mu\text{g}$ de proteína. Completar este
20 volumen hasta $300\mu\text{L}$ con RIPA B. Proceder a la inmunoprecipitación.
2. Inmunoprecipitación:
- 2.a. Añadir $5\mu\text{L}$ de anticuerpo contra el receptor de EGF (EGFR) a cada muestra y mezclar mediante
25 vortex. Incubar durante 1 hora en hielo.
- 2.b. Añadir $50\mu\text{L}$ de pansorbina a cada muestra y mezclar mediante vortex. Incubar durante 20-30 minutos en hielo.
- 30 2.c. Centrifugar a 13000 rpm. durante 2 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
- 2.d. Mezclar con vórtex los pellets y resuspender en 1 mL de tampón ICKA frío.
- 2.e. Repetir los pasos 2.c i 2.d 3 veces.
- 35 2.f. Secar los pellets con un papel absorbente. Dejar los pellets en hielo y proceder inmediatamente al ensayo de actividad quinasa, o congelar los pellets, no por mucho tiempo, a -70°C .
3. Ensayos de actividad quinasa utilizando complejos inmunes:
- 40 3.a. Preparar el tampón de reacción. Cada muestra necesita $50\mu\text{L}$.
- 3.a.1. Determinar la cantidad de cofactor (Mn^{2+}) a añadir. La concentración final debe ser 8 mM (el stock es 100mM).
- 45 3.a.2. Calcular el ^{32}P -ATP necesario. Cada muestra necesita $10\mu\text{Ci}$.
3. a. 3. Completar el volumen total con el tampón Hepes-vanadato,
- 50 3.b. Mezclar con vórtex los pellets secos y resuspender cada uno en $50\mu\text{L}$ de tampón de reacción acabado de preparar.
- 3.c. Mezclar fuertemente. Incubar exactamente 10 minutos a temperatura ambiente.
- 55 3.d. Parar la reacción añadiendo 2X, 3X o 5X del tampón de carga con β -mercaptoetanol. Mezclar los pellets fuertemente. Hervir las muestras durante 5min a 100°C , junto con los marcadores de peso molecular.
- 3.e. Centrifugar las muestras a 13000rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- 60 3.f. Cargar las muestras en un gel al 8% SDS-PAGE. Descartar los pellets.

ES 2 122 912 A1

3.g. Correr el gel toda la noche a 50-60V o alternativamente correrlo durante 3-4 horas a 40-50mA con un sistema de refrigeración.

3.h. Fijar el gel en la disolución de fijación durante 30-60 min.

3.i. Hervir el gel en 1M KOH durante 20min.

3.j. Transferir el gel a la disolución de fijación. Mantenerla en esta con cambios de la misma cada 5-10 minutos hasta que el gel vuelva a alcanzar su tamaño normal y sea transparente en lugar de blanco. Normalmente tarda entre 30-60 minutos.

3.k. Secar el gel (al menos durante 3 horas) y autorradiografiar el mismo durante 10 minutos para la línea A431 y durante 2-4 horas para la línea Capan-1. Contar la radioactividad del filtro con un contador beta para cuantificarlo.

Los resultados obtenidos para la fosforilación basal de la línea A431 se resumen en la Tabla 27. Se ha considerado como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI (basal), y se han comparado los valores de actividad quinasa en presencia de diferentes concentraciones de PCI respecto a esta actividad basal.

TABLA 27

Actividad quinasa basal del receptor de EGF restante previo tratamiento de las células de la línea A431 durante diez minutos con PCI.

Incubación con PCI($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Actividad quinasa (%)
0	100
1	68
50	80
50	78
50	61
100	29

Como se puede observar el PCI claramente disminuye la actividad basal del receptor de EGF de las células A431. Esta inhibición de la actividad basal del receptor es mayor al aumentar la concentración de PCI, y oscila entre el 20 y el 70%.

En el caso de Capan-1 los resultados de actividad quinasa basal se presentan en la Tabla 28, al igual que para A431 se ha considerado como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI y se ha comparado con esta la actividad quinasa de las células tratadas con PCI.

ES 2 122 912 A1

TABLA 28

Actividad quinasa basal del receptor de EGF restante previo tratamiento de las células de la línea Capan-1 durante diez minutos con PCI.

Incubación con PCI($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Actividad quinasa (%)
0	100
50	88
50	90
50	70

Para la línea Capan-1 sólo se ha probado la incubación previa con $50\mu\text{g}/\text{mL}$ de PCI y se ha observado una inhibición de la actividad quinasa basal de entre un 10 y un 30%.

En el caso de los ensayos de estudio de la actividad quinasa del receptor de EGF bajo la incubación con EGF sólo o más PCI, los resultados de la línea Capan-1 se presentan en la Tabla 29. Nuevamente se ha considerado como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI o EGF y se ha comparado con esta la actividad quinasa de las células tratadas con EGF sólo o con PCI.

TABLA 29

Actividad quinasa del receptor de EGF después del tratamiento de las células de la línea Capan-1 durante diez minutos con PCI y posteriormente con EGF $5\text{ng}/\text{mL}$.

Muestra	Actividad quinasa (%)
Control	100
Tratada con $50\mu\text{g}/\text{ml}$ PCI	70
Tratada con $5\text{ng}/\text{ml}$ EGF	240
Tratada con $5\text{ng}/\text{ml}$ EGF+ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	180
Tratada con $5\text{ng}/\text{ml}$ EGF+ $10\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	170
Tratada con $5\text{ng}/\text{ml}$ EGF+ $50\mu\text{g}/\text{mL}$ PCI	120

Como se puede observar el PCI no tan solo inhibe la actividad quinasa basal del receptor, sino que disminuye la actividad quinasa inducida por la estimulación de las células con EGF. Esta disminución de la actividad quinasa inducida por EGF aumenta al aumentar la dosis de PCI, siendo ésta de un 50% en el caso de la concentración de PCI de $50\mu\text{g}/\text{mL}$.

El mismo tipo de ensayo se ha realizado con la línea A431, es decir, se ha estudiado la estimulación de la actividad quinasa del receptor de EGF inducida por el propio EGF y el efecto que tiene el PCI cuando se incuba conjuntamente con el EGF. Los resultados se presentan en la Tabla 30 y también se ha tomado como 100% la actividad quinasa en ausencia de PCI o EGF y se ha comparado con esta la actividad quinasa de las células tratadas con EGF sólo o con PCI.

TABLA 30

Actividad quinasa del receptor de EGF después del tratamiento de las células de la línea A431 durante diez minutos con PCI y posteriormente con EGF 1ng/mL.

Muestra	Actividad quinasa (%)
Control	100
Tratada con 50 μ g/ml PCI	77
Tratada con 1ng/ml EGF	200
Tratada con 1ng/ml EGF+ 1 μ g/mL PCI	126
Tratada con 1ng/ml EGF+10 μ g/mLPCI	108
Tratada con 1ng/ml EGF+50 μ g/mLPCI	53

Para las células A431 el PCI produce el mismo efecto que en el caso de la línea Capan-1, pero en este caso el efecto inhibitorio de la actividad quinasa del receptor es mucho más marcado, pues para la dosis de PCI más alta, 50 μ g/mL, dicha actividad queda reducida a la mitad de la actividad basal. Por lo tanto podemos concluir que el PCI es un antagonista del EGF, inhibiendo la acción estimuladora del EGF.

4.F.8. Análisis computacional para determinar la relación topológica entre el PCI y diversos factores de crecimiento celular de los que puede resultar ser antagonista

Los resultados obtenidos con la forma mutante PCI del Y37V38G39 indican que la acción antitumoral no se debe mayoritariamente a la actividad inhibidora de proteasas del PCI sino a alguna característica topológica de su núcleo globular, por ejemplo relacionada con su patrón estructural tipo notina. Para determinar esto se ha realizado un análisis computacional que permite establecer esta relación mediante un programa computacional elaborado por nuestro grupo de investigación ("KNOT -MATCH", Más J. et al., enviado a Prot. Science). Este programa permite establecer de forma automática la similitud topológica de los puentes disulfuro de una proteína con los del resto de las existentes en el banco de datos de estructuras cristalográficas de proteínas (Protein Data Bank, PDB 1996). El programa compara las distancias entre los centros geométricos de cada puente disulfuro y el ángulo entre los diferentes puentes intracatenarios (o extracatenarios) existentes en una proteína con otras del PDB. A través de una rutina de alineamiento, secuencial o de r.m.s., se llega a una selección de aquellos que presentan r.m.s. menores de 2 Å.

Este análisis da lugar a los siguientes r.m.s. entre bucles definidos por los puentes disulfuro del PCI y de otras moléculas como:

- TGF- α de 0,65 a 1,46 Å, según la región
- EGF 0,85 Å

Es de resaltar el alto grado de superponibilidad estructural existente entre el PCI (especialmente los bucles 18-27 27-34) y moléculas relacionadas con el crecimiento celular y por ello con el tumoral. Esta coincidencia ha sugerido la realización de los experimentos ya detallados en anteriores apartados (4.B.2.c. y 4.F.6.) que indican que el PCI presenta afinidad por los receptores de factores de crecimiento. Es también de resaltar la similitud físico-química posicional entre aminoácidos del EGF y del TGF- α de los que se ha descrito que juegan un papel clave en la interacción EGF y TGF- α con el receptor (Groenen L. C. et al (1994) *Growth Factors*. 11, 235-257) y el PCI. La Tabla 31 presenta estos resultados.

ES 2 122 912 A1

TABLA 31

Aminoácidos con función importante del EGF y TGF- α y su equivalente superponible del PCI.

5	PCI	P11	S19	G20	W22	F23	W28	N29	S30	A31	R32	T33
	EGF	Y13	-	-	Y37	W50	M21	E24	S25	L26	D27	S28
10	TGF	-	T20	G19	H18	F17	L24	V25	Q26	E27	D28	K29

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el PCI no inhibe el crecimiento celular y tumoral por su actividad inhibidora de proteasas sino a través de un mecanismo de asociación a receptor celular tipo factor de crecimiento, probablemente a través de su núcleo globular tipo notina. Se trataría pues de un verdadero antagonista de factores de crecimiento. Su gran estabilidad frente a las proteasas facilita que no sea destruido al ser internalizado, el ser reciclado y puede volver a actuar. La implicación de la topología tipo notina del PCI abre grandes posibilidades de diseño de variantes de PCI menores, o de moléculas peptidomiméticas u organomiméticas, que presenten mejores características de formulación, farmacocinética y farmacodinámica, para su utilización terapéutica como agentes antitumorales.

Listado de la secuencia

(1) INFORMACION GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
- (B) CALLE: CAMPUS UAB
- (C) CIUDAD: BELLATERRA
- (D) ESTADO O PROVINCIA: BARCELONA
- (E) PAIS: ESPAÑA
- (F) CODIGO POSTAL: 08193

- (A) NOMBRE: UNIVERSITAT DE GIRONA
- (B) CALLE: Albareda, 3
- (C) CIUDAD: GIRONA
- (D) ESTADO: GIRONA
- (E) PAIS: ESPAÑA
- (F) CODIGO POSTAL: 17071

(ii) TITULO DE LA INVENCION:

Inhibidores de metalocarboxipeptidasas y moléculas derivadas como agentes antitumorales.

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) DIRECCION PARA CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: OFICINA PONTI
- (B) CALLE: Consell de Cent, 322, bxs.
- (C) CIUDAD: BARCELONA
- (D) ESTADO O PROVINCIA: BARCELONA
- (E) PAIS: ESPAÑA
- (F) CODIGO POSTAL: 08007

(v) FORMATO PARA LECTURA POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE SOPORTE: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

ES 2 122 912 A1

(D) SOFTWARE: WORD 7.1

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NUMERO DE SOLICITUD: P 9601986/7

(B) FECHA DE PRESENTACION: 20 septiembre 1996

(C) CLASIFICACION: A61K-38/00, A61K-38/55,
A61K-38/56, C12N-15/11, C07K-16/00,
C07K-14/00

(vii) INFORMACION SOBRE EL AGENTE/REPRESENTANTE:

(A) NOMBRE: Adelaida PONTI SALES

(B) NUMERO DE REGISTRO: 388/3

(viii) INFORMACION PARA COMUNICACIONES:

(A) TELEFONO: 93-487.49.36

(B) TELEFAX: 93-487.97.13

4.G. Lista de secuencia

20 SEQ. ID. NO.1

DEFINICION gen sintético de la isoforma IIa del inhibidor de carboxipeptidasa de patata

25 CARACTERISTICAS Localización/Calificadores
/producto="PCI"
/codón de inicio=1

ORIGEN DE LA MOLECULA: sintética

30 COMPOSICION DE BASES 28 A 38 C 35 G 25 T
GAACAGCAGC CGGATCCGAT CTGCAACAAA CCGTGCAAGA CTCACGACGA 50
CTGCTCCGGC GCTTGGTTCT GCCAAGCTTG CTGGAACAGC GCTCGTACCT 100
GCGGCCCGTA CGTTGGTTAA TAG 123
35 GAA CAG CAC GCG GAT CCG ATC TGC AAC AAA CCG TGC AAG ACT CAC 45
Glu Gln His Ala Asp Pro Ile Cys Asn Lys Pro Cys Lys Thr His
1 5 10 15
40 GAC GAC TGC TCC GGC GCT TGG TTC TGC CAA GCT TGC TGG AAC AGC 90
Asp Asp Cys Ser Gly Ala Trp Phe Cys Gln Ala Cys Trp Asn Ser
20 25 30
45 GCT CGT ACC TGC GGC CCG TAC GTT GGT TAA TAG 123
Ala Arg Thr Cys Gly Pro Tyr Val Gly
35 39

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Molécula polipeptídica inhibidora de metalocarboxipeptidasas, sus isoformas naturales, sus variantes naturales o artificiales sustancialmente homólogas, sus fragmentos polipeptídicos y sus derivados peptidomiméticos y organomiméticos, para su uso como agente antitumoral.
2. Molécula polipeptídica inhibidora de metalocarboxipeptidasas según la reivindicación 1 procedente de la patata (PCI) cuya secuencia aminoacídica es SEQ. ID. NO. 1 para su uso como agente antitumoral.
3. Variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se obtiene artificialmente por ingeniería de proteínas a partir de las estructuras nativas, para su uso como agente antitumoral.
4. Molécula polipeptídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una conformación similar a la del PCI, para su uso como agente antitumoral.
5. Fragmentos de la molécula polipeptídica inhibidora de metalocarboxipeptidasas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprenden por lo menos uno de los siguientes determinantes estructurales de la actividad antitumoral: núcleo globular estabilizado por puentes disulfuro tipo notina, bucles entre los residuos 18-27 27-34 o cola C-terminal, para su uso como agente antitumoral.
6. Molécula peptidomimética y organomimética del inhibidor de metalocarboxipeptidasas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se obtiene a partir de los determinantes estructurales de la actividad antitumoral, para su uso como agente antitumoral.
7. Composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo, una cantidad eficaz de la molécula según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
8. Utilización de la molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento antitumoral.

35

40

45

50

55

60

FIGURAS

Figura 1

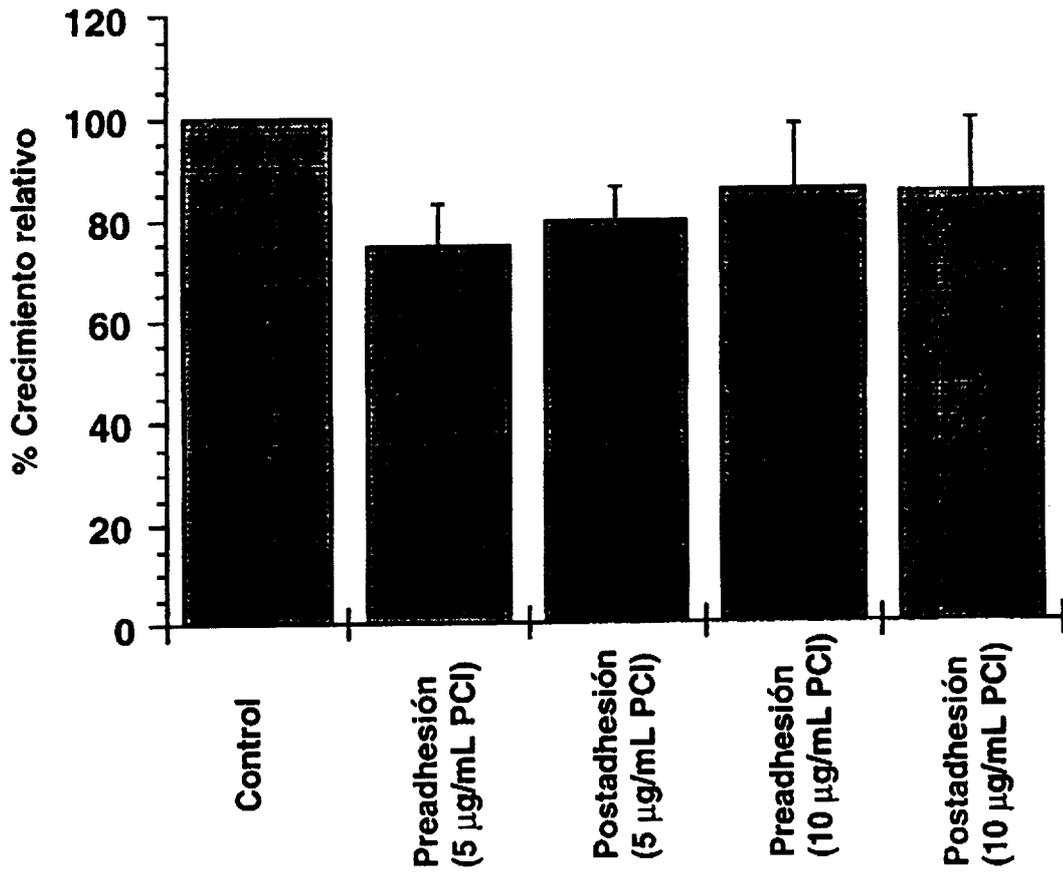


Figura 2

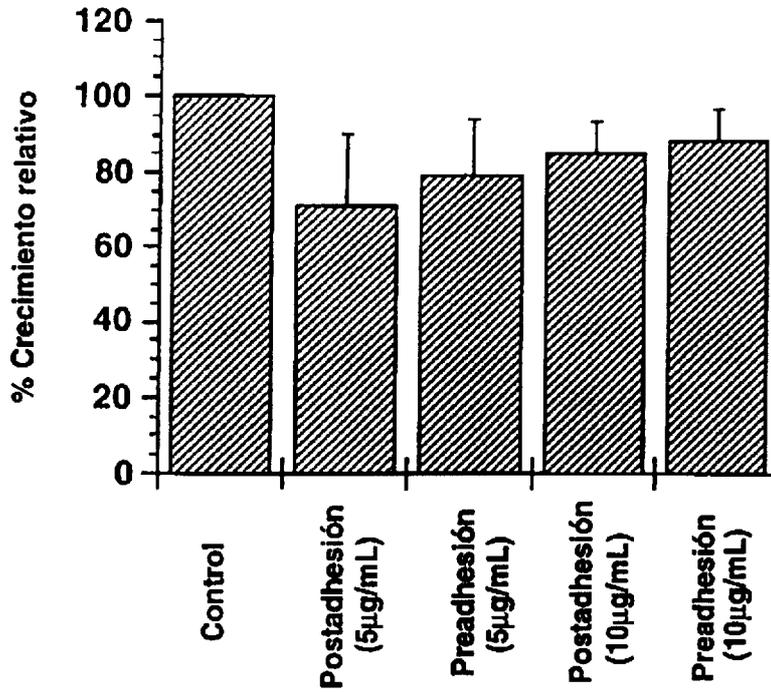


Figura 3

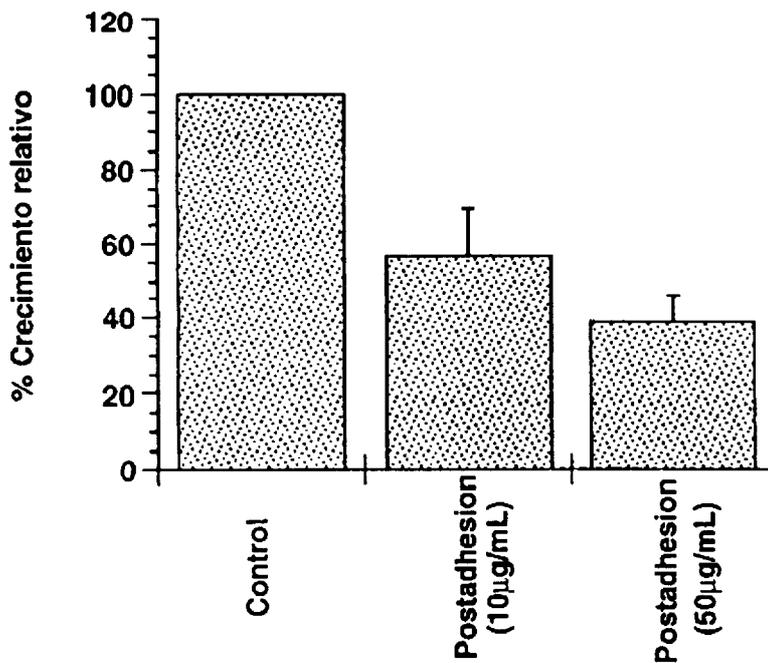


Figura 4

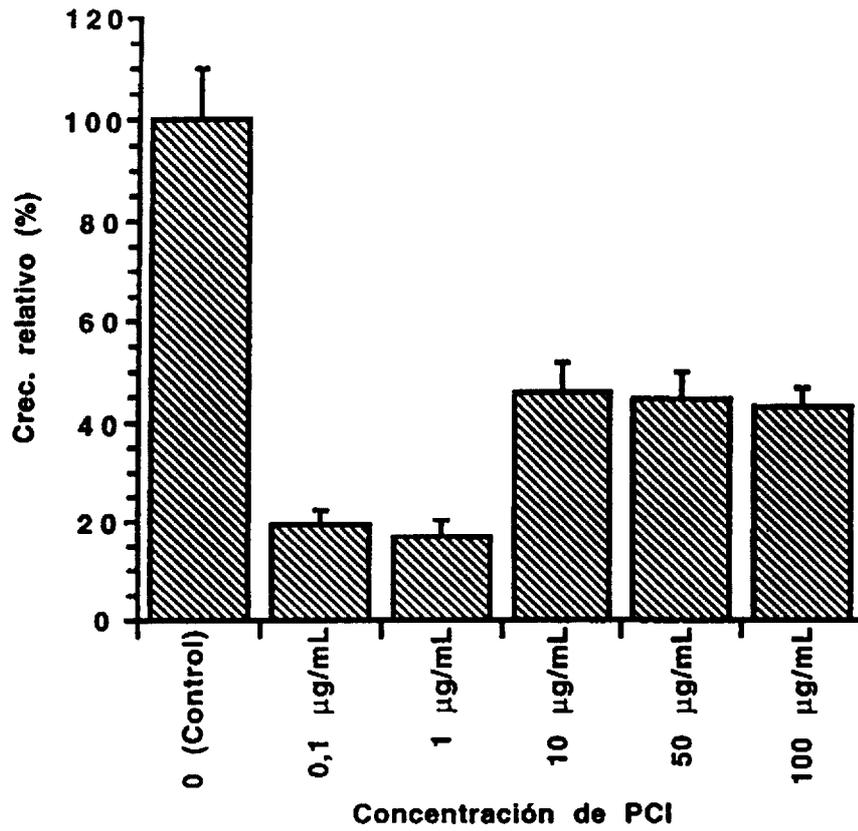


Figura 5

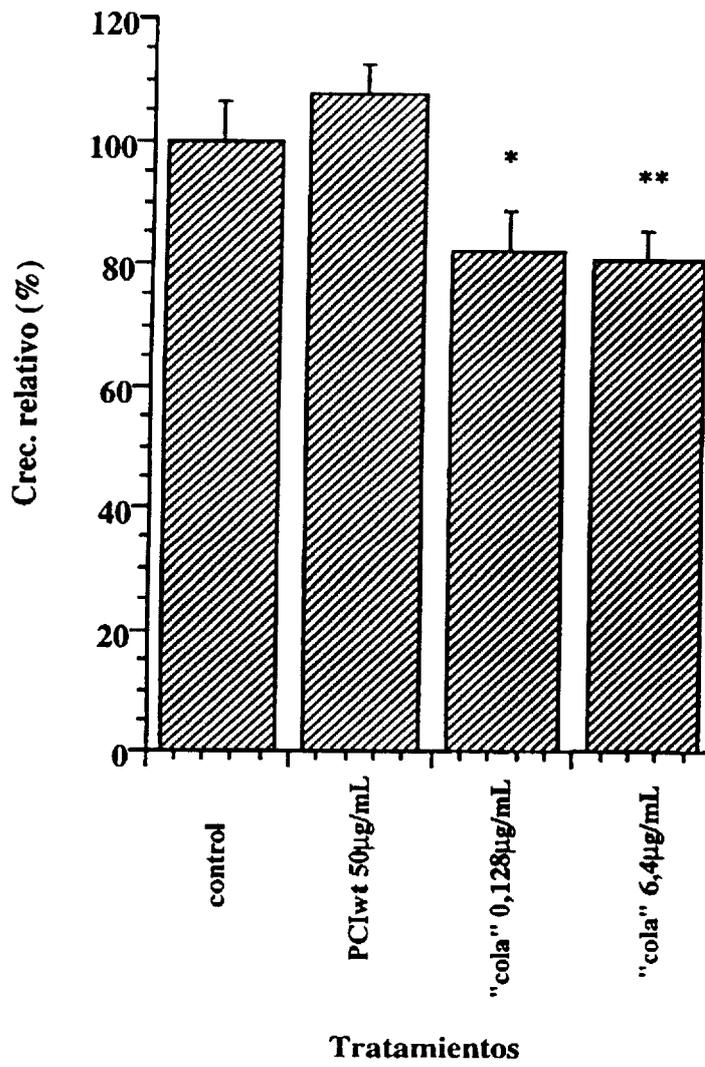


Figura 6a

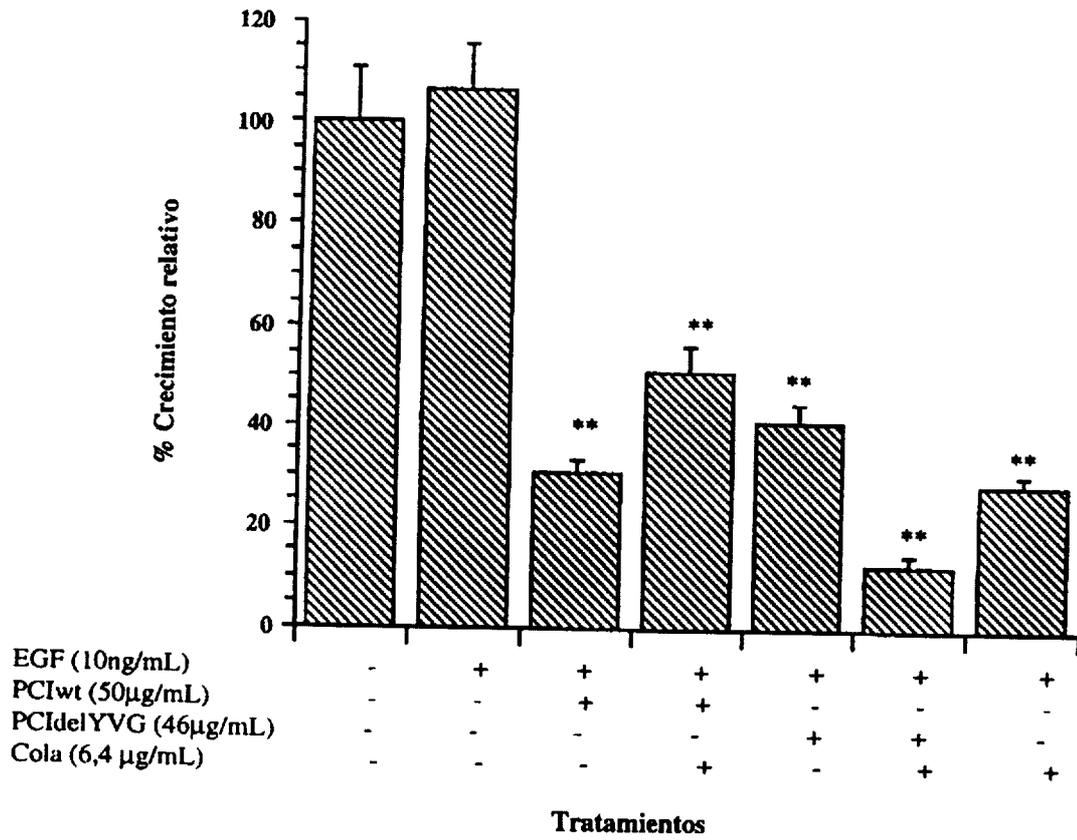


Figura 6b

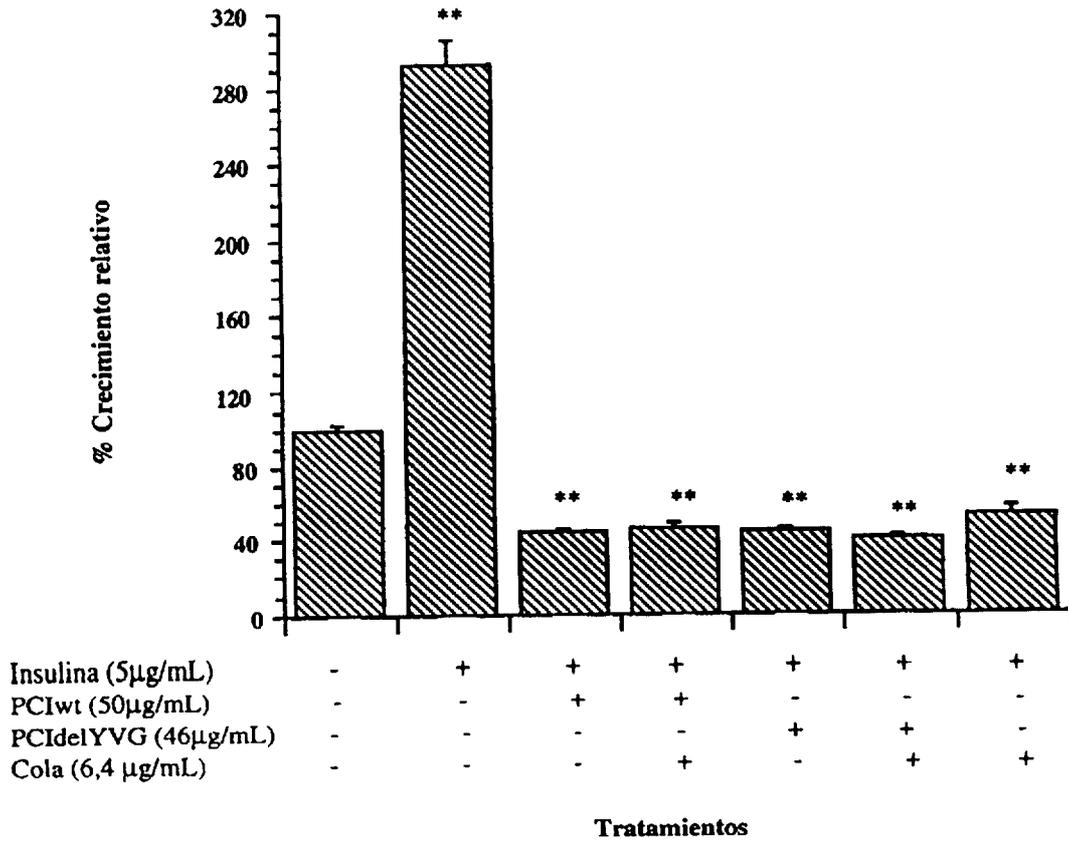
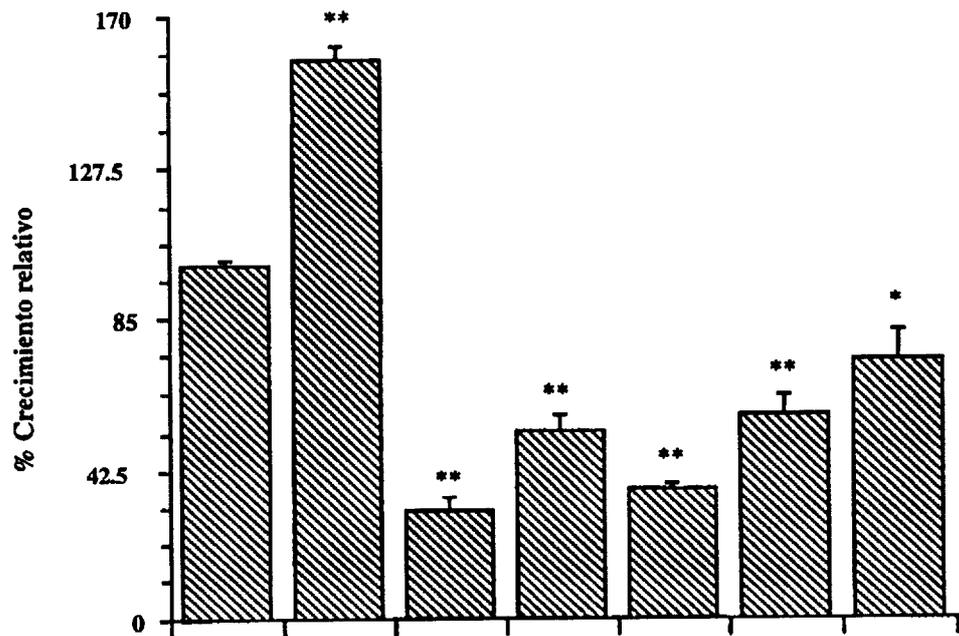


Figura 6c



IGF-1 (20ng/mL)	-	+	+	+	+	+	+
PCIwt (50µg/mL)	-	-	+	+	-	-	-
PCI del YVG (46µg/mL)	-	-	-	-	+	+	-
Cola (6,4µg/mL)	-	-	-	+	-	+	+

Tratamientos

Figura 7

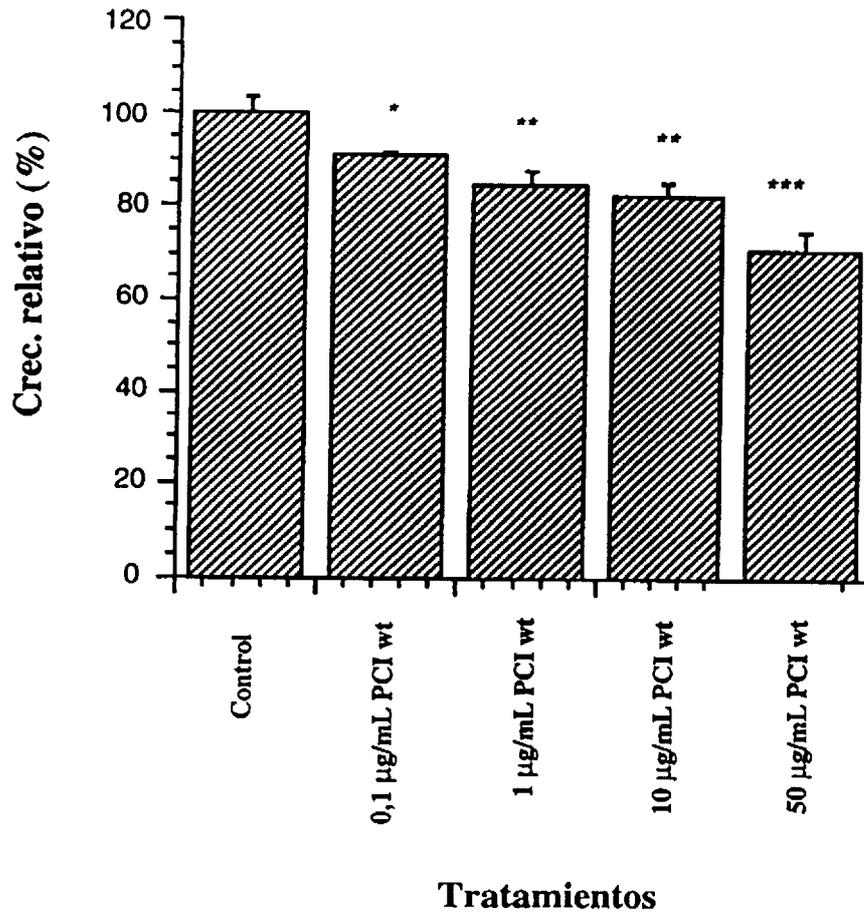


Figura 8

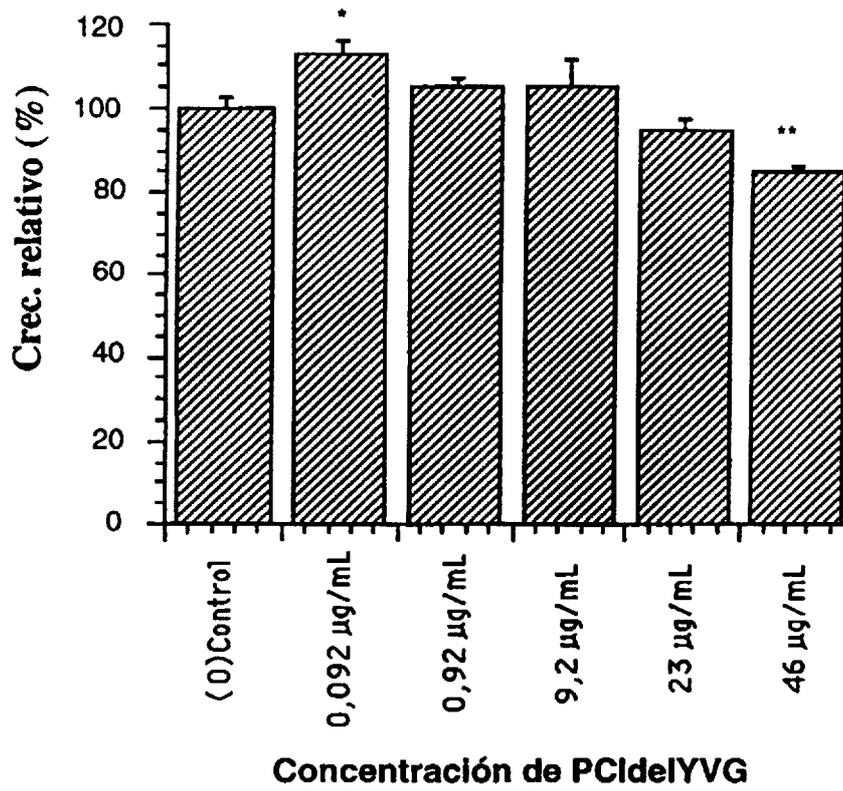


Figura 9a

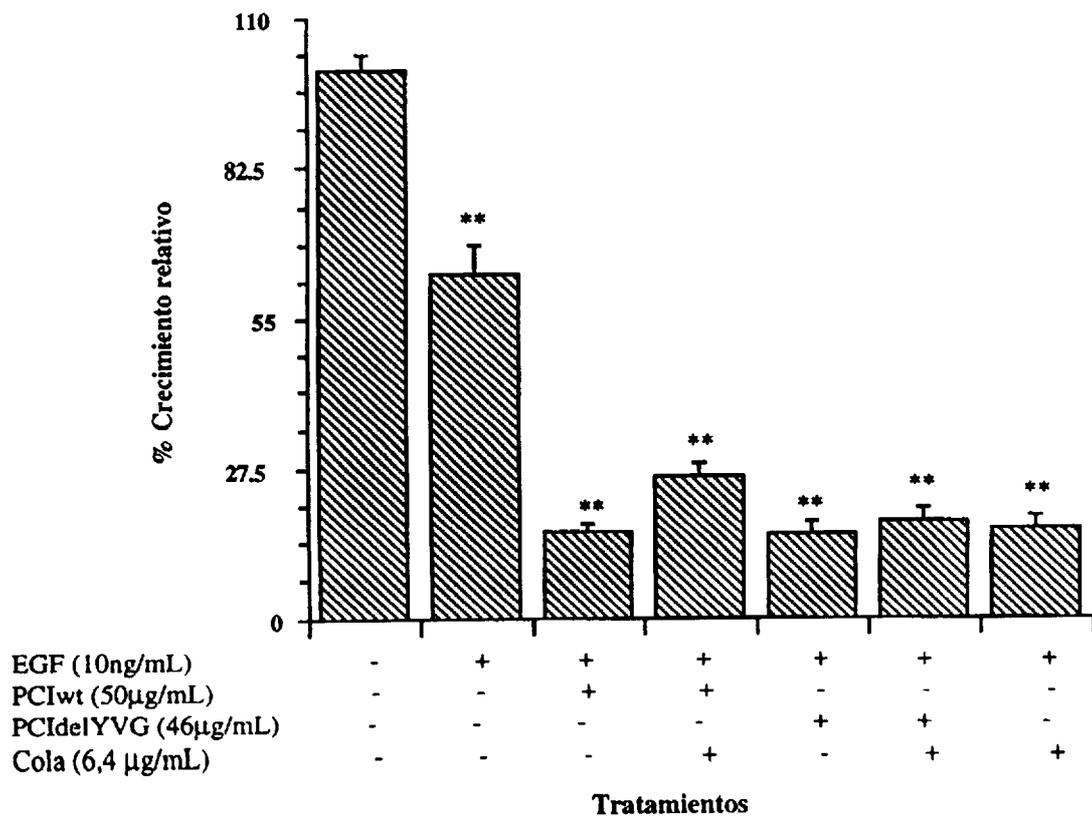


Figura 9b

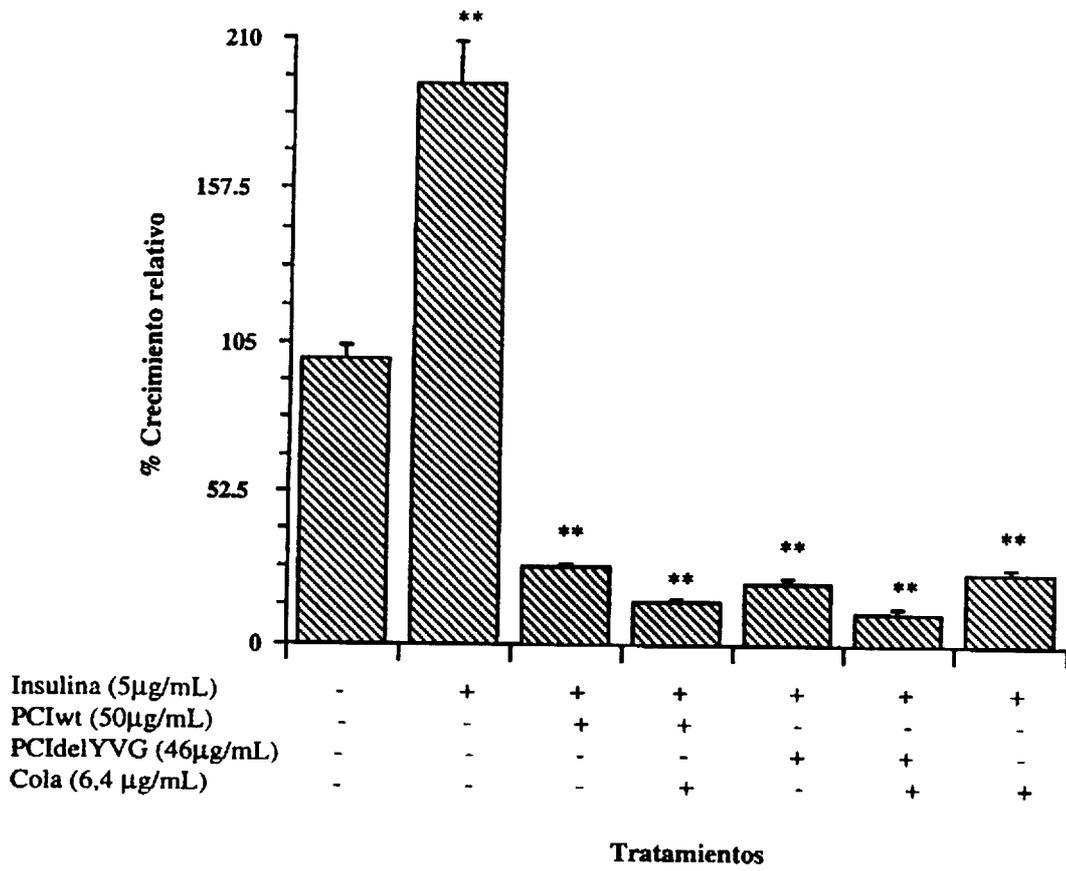


Figura 9c

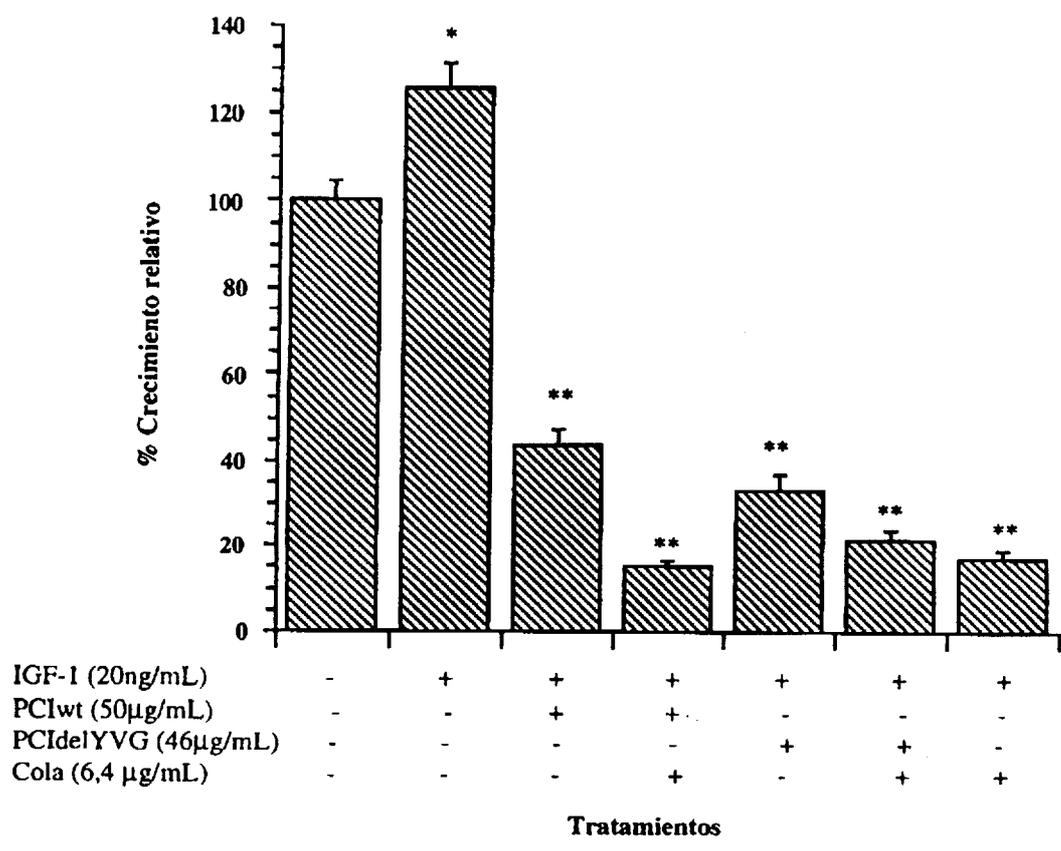


Figura 10

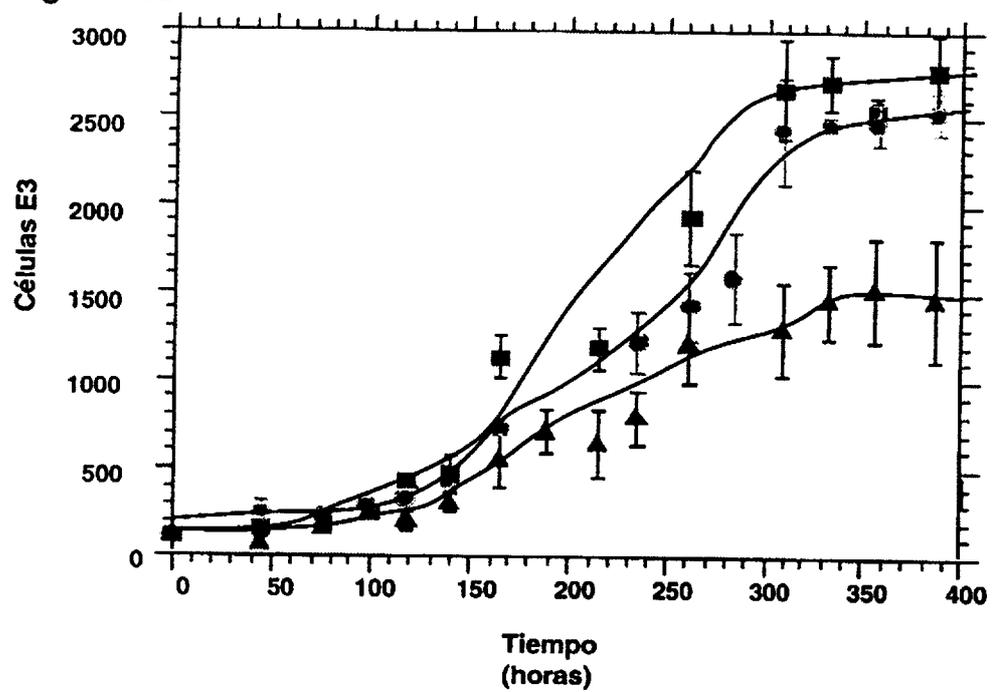


Figura 11a

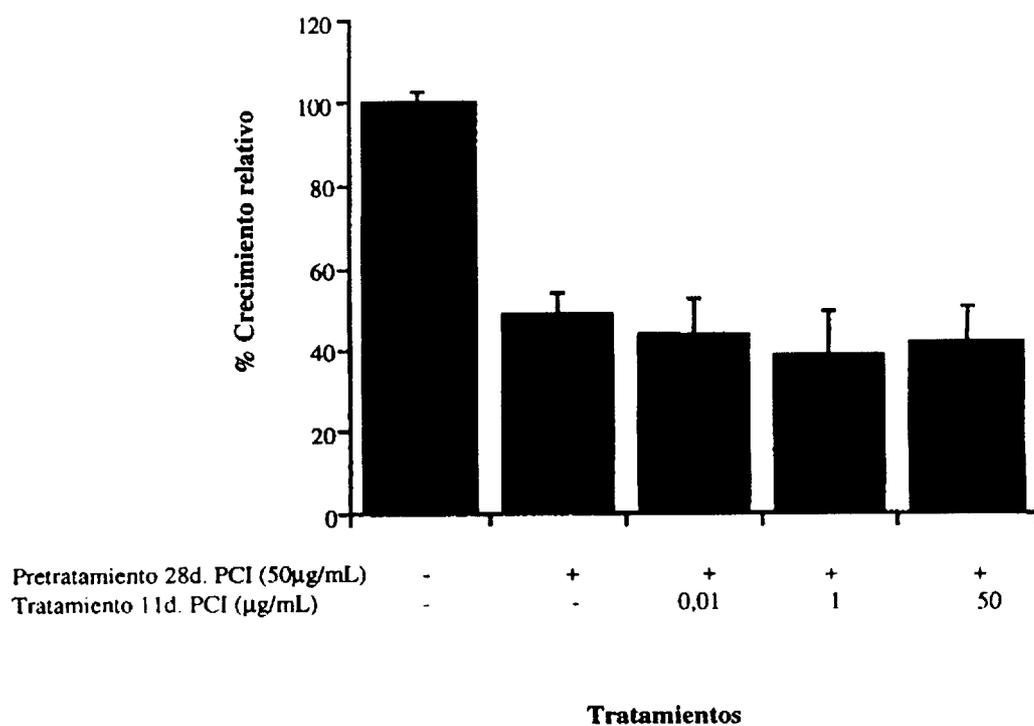


Figura 11b

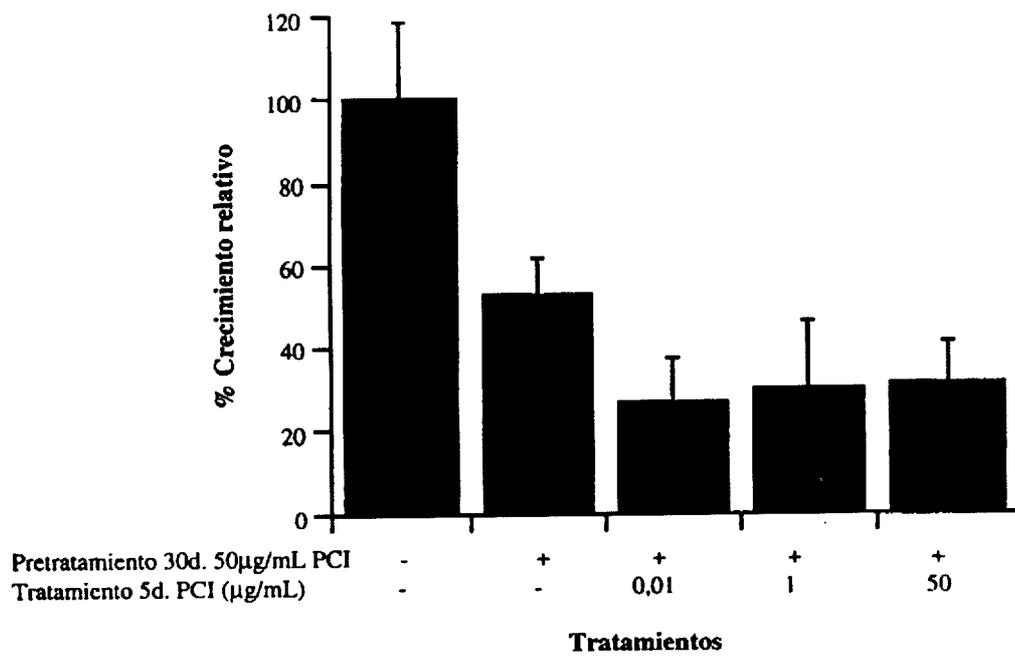


Figura 11c

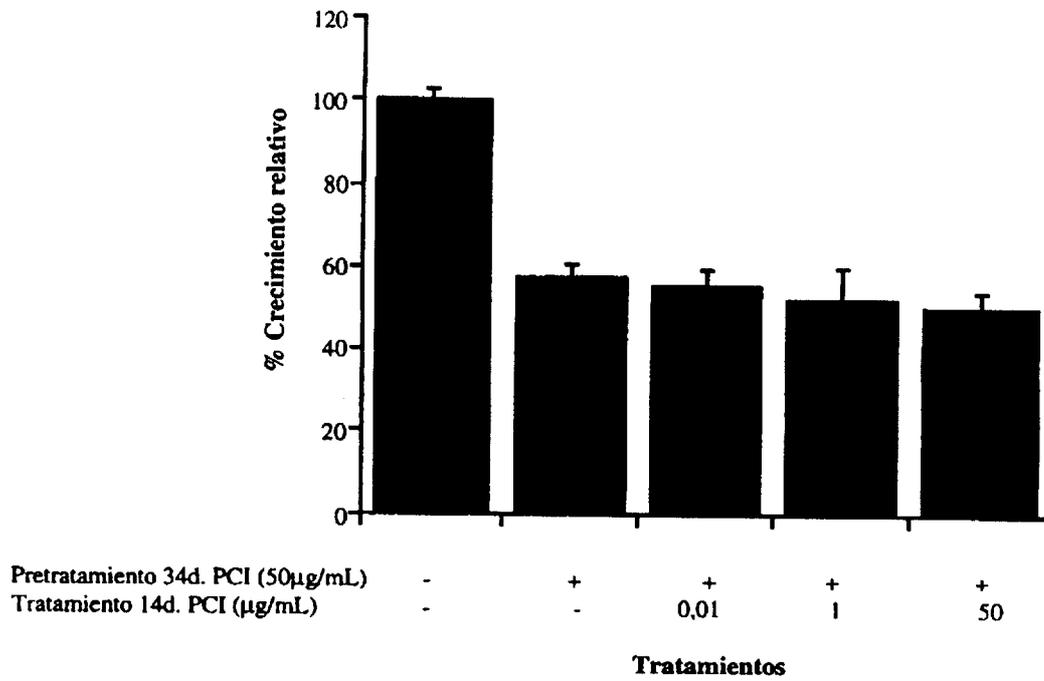


Figura 12

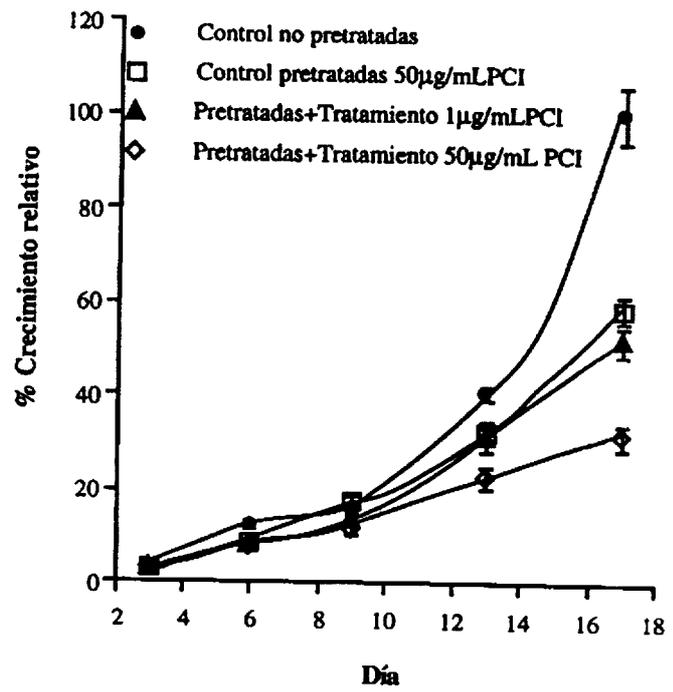


Figura 13a

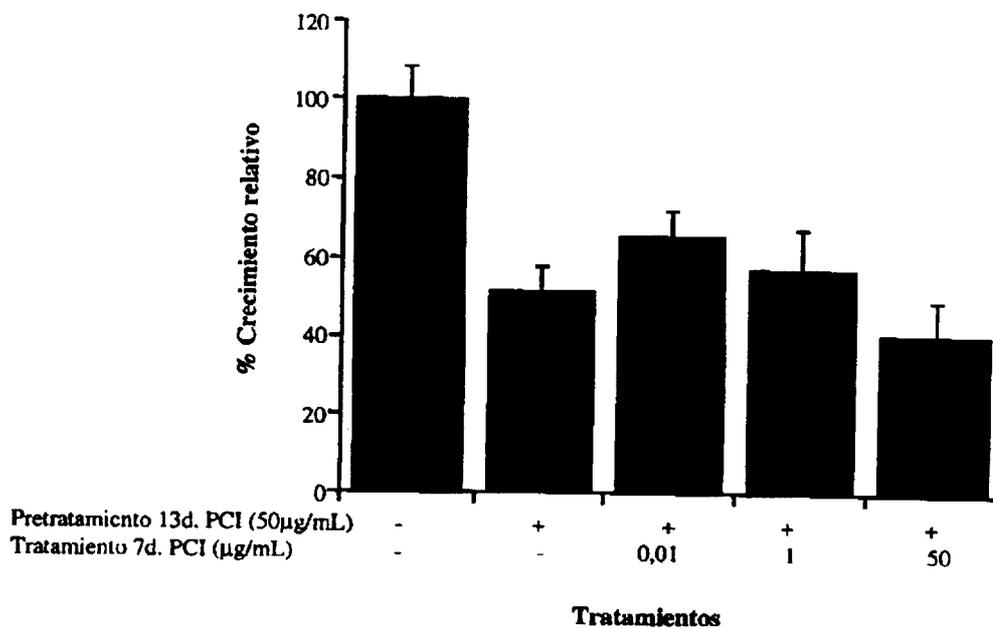


Figura 13b

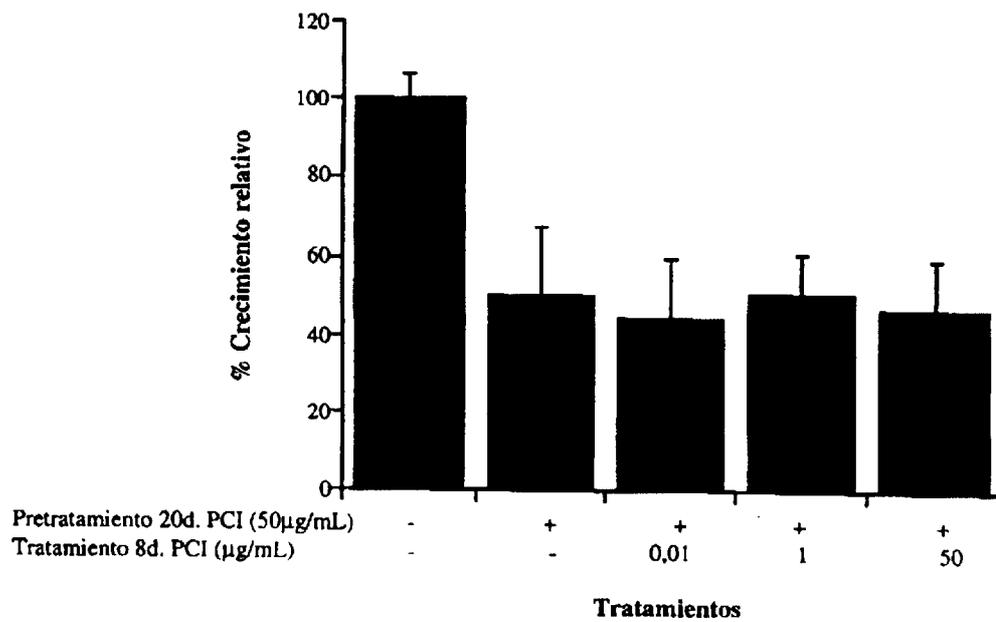


Figura 13c

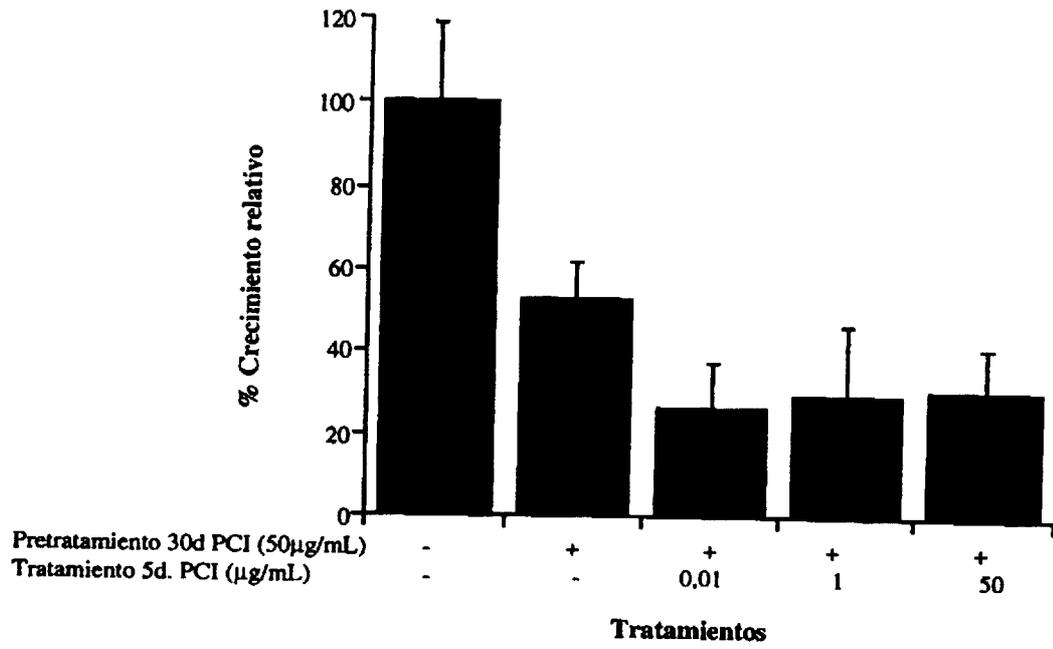


Figura 14

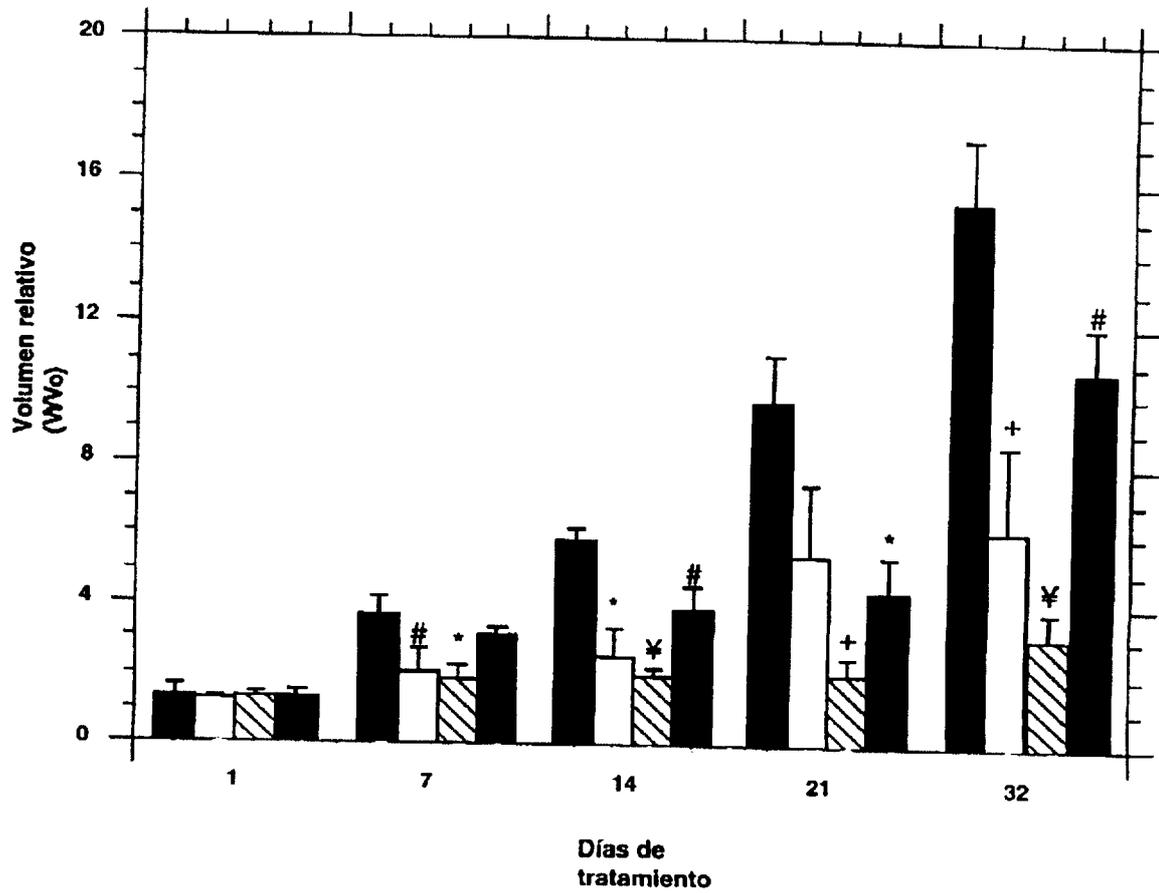


Figura 15

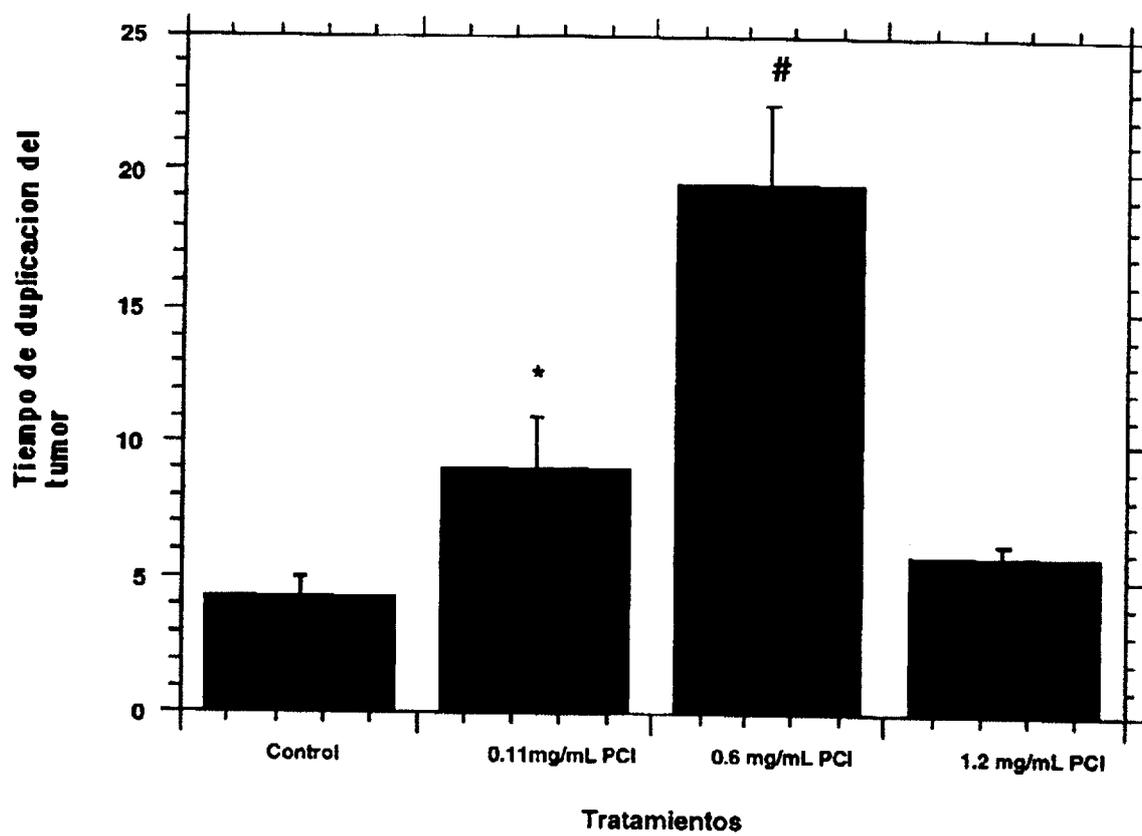


Figura 16

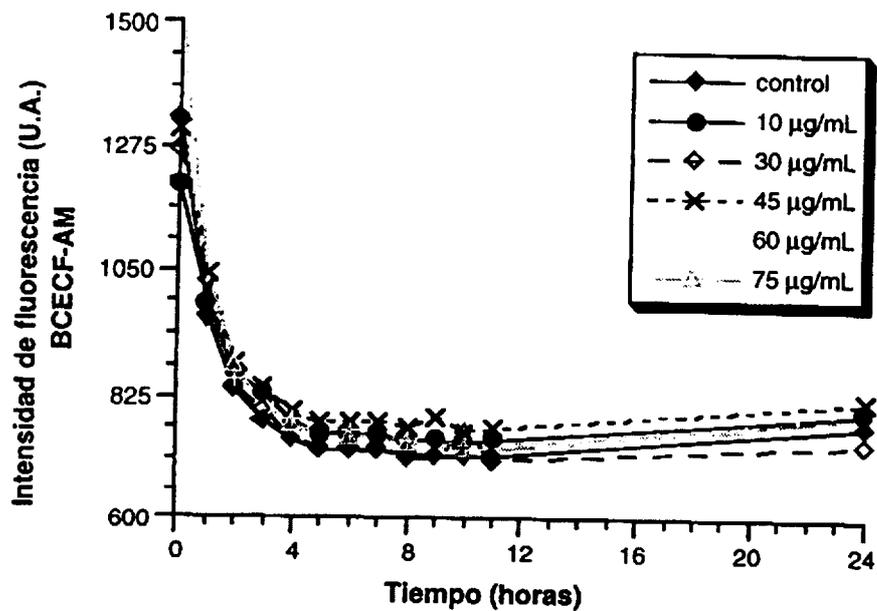


Figura 17

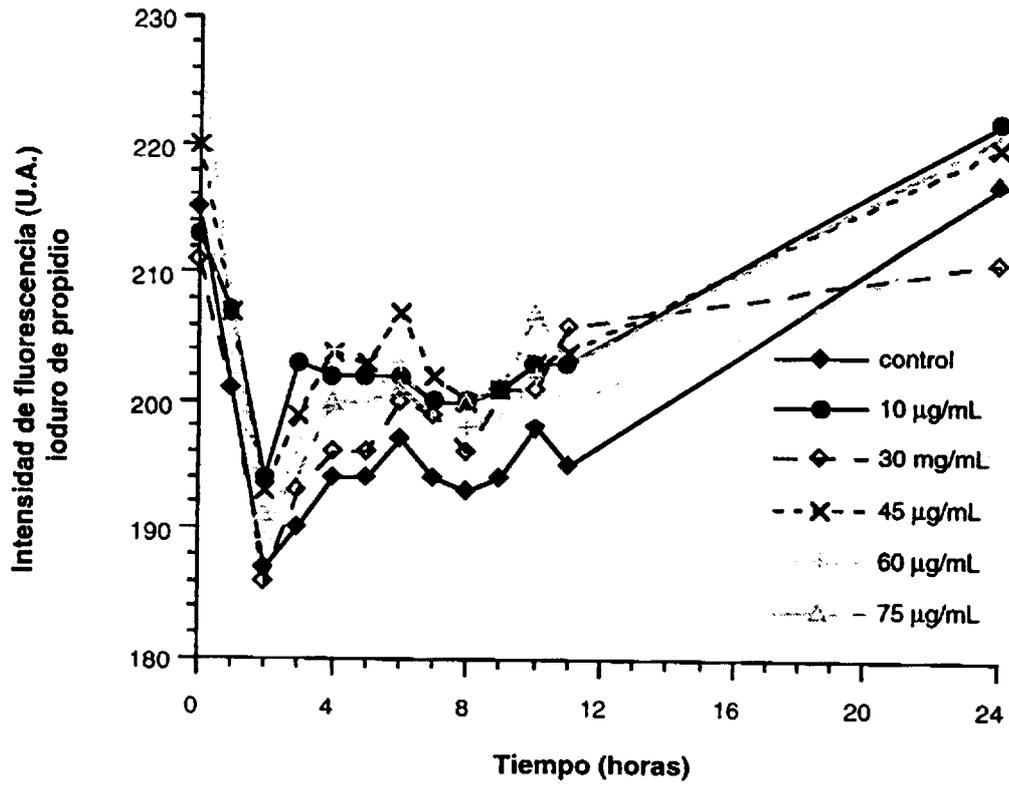


Figura 18

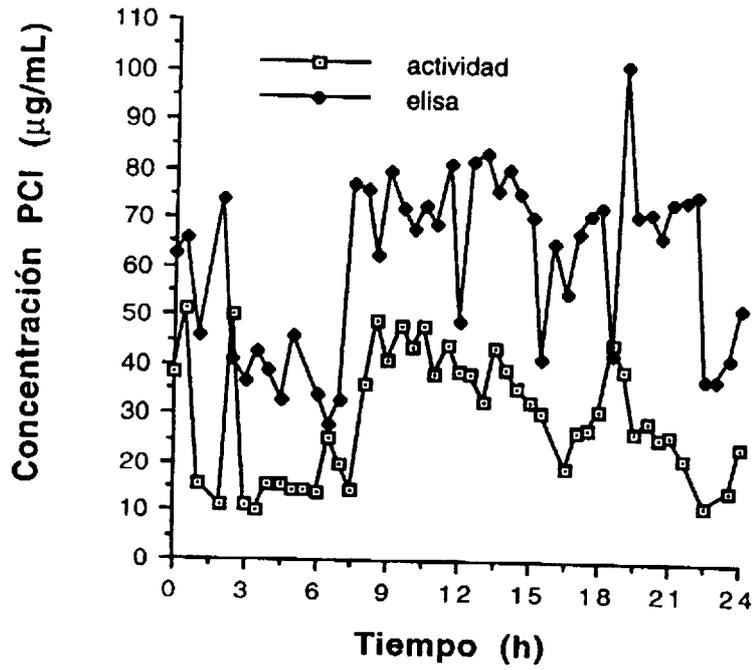


Figura 19

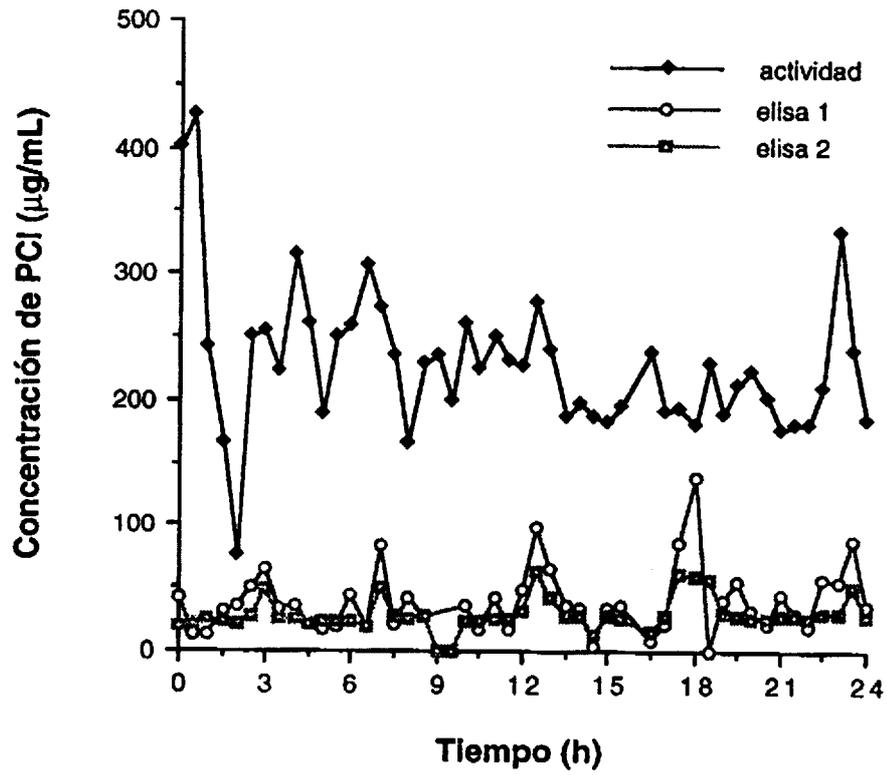
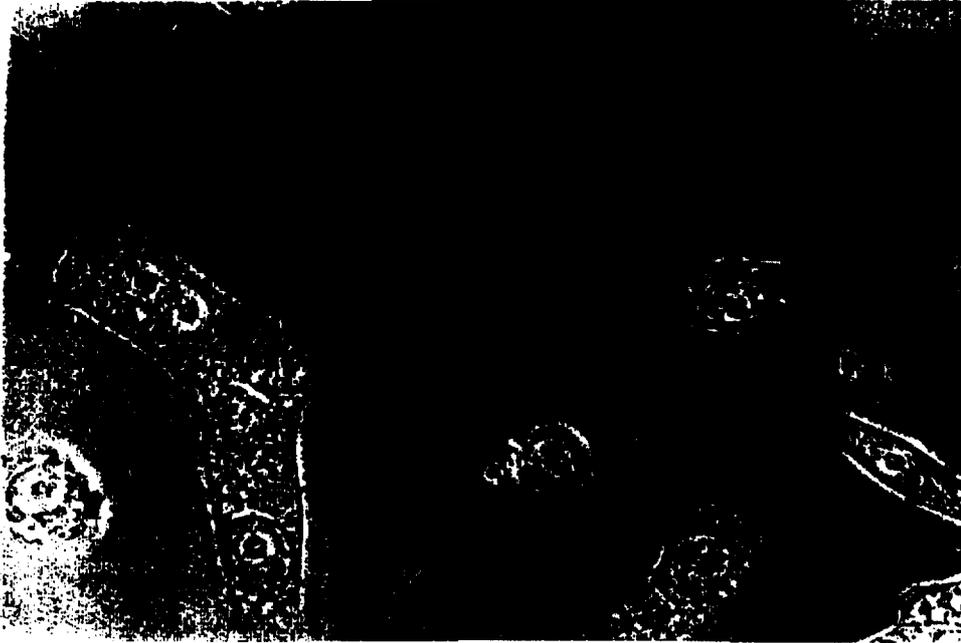
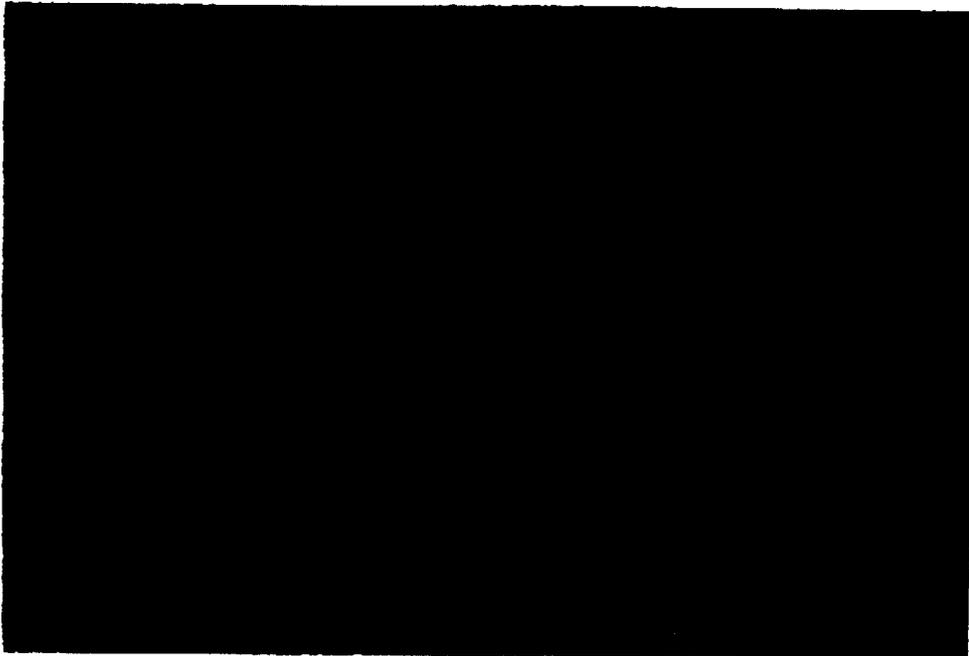


Figure 20



A



B

Figure 21

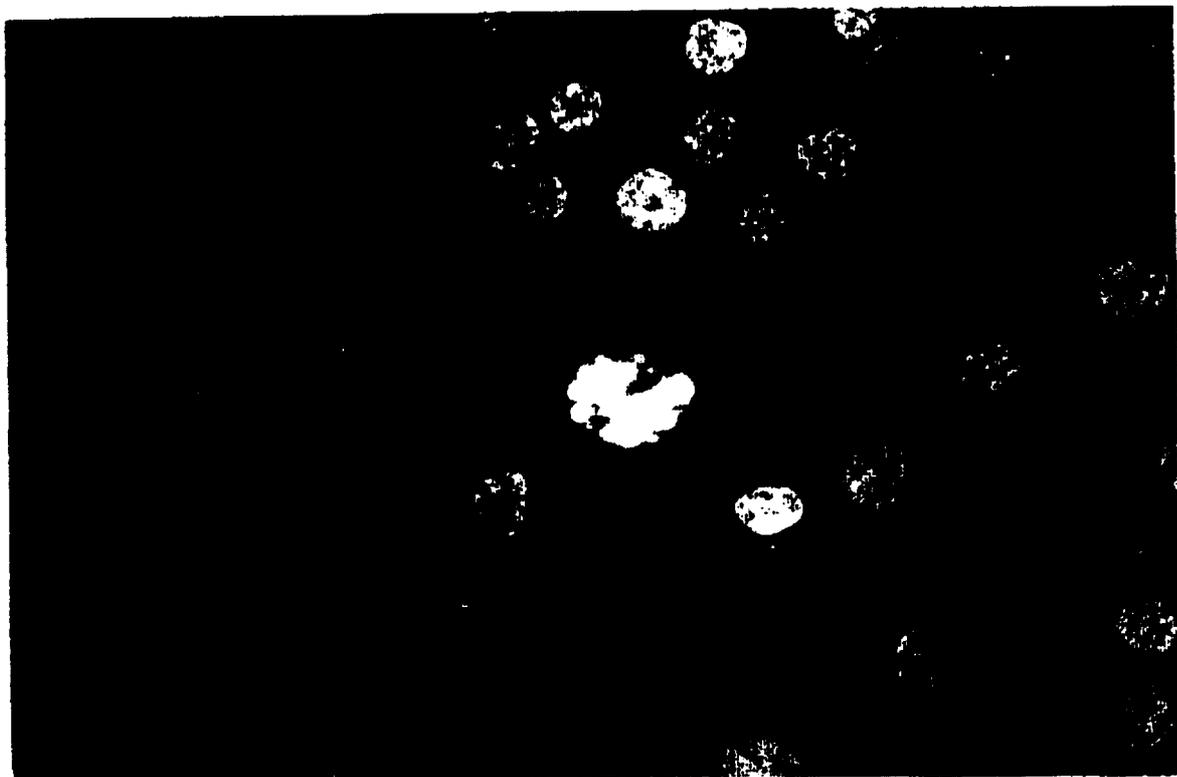


Figure 22

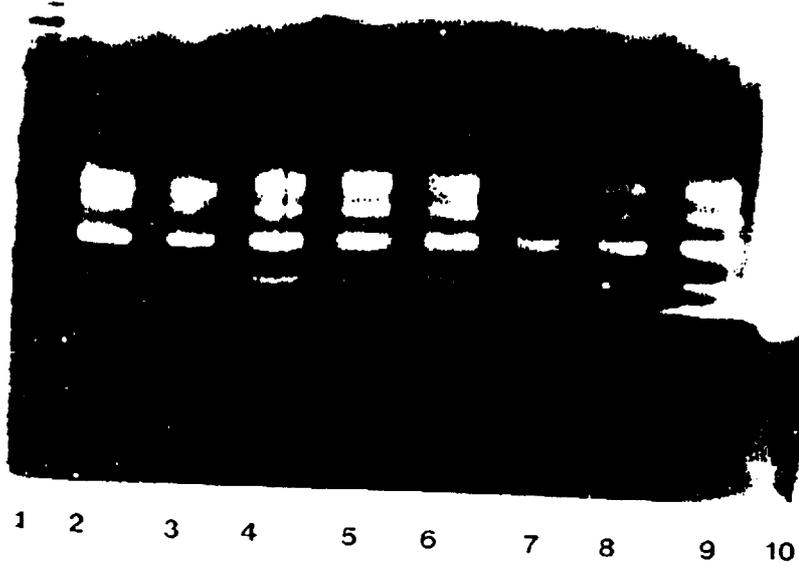


Figura 23

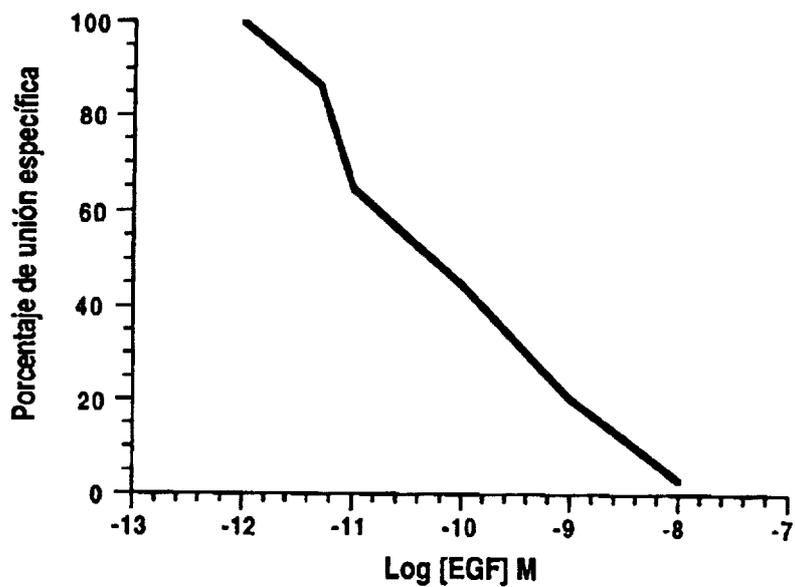


Figura 24

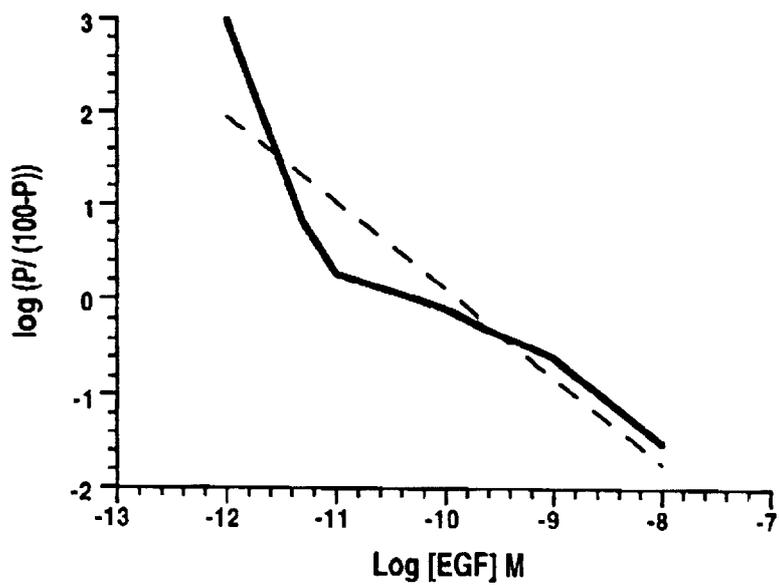


Figura 25

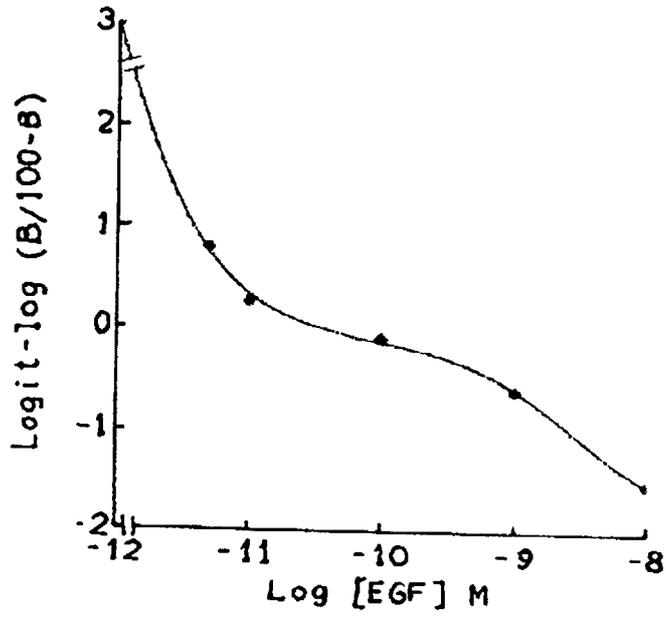


Figura 26

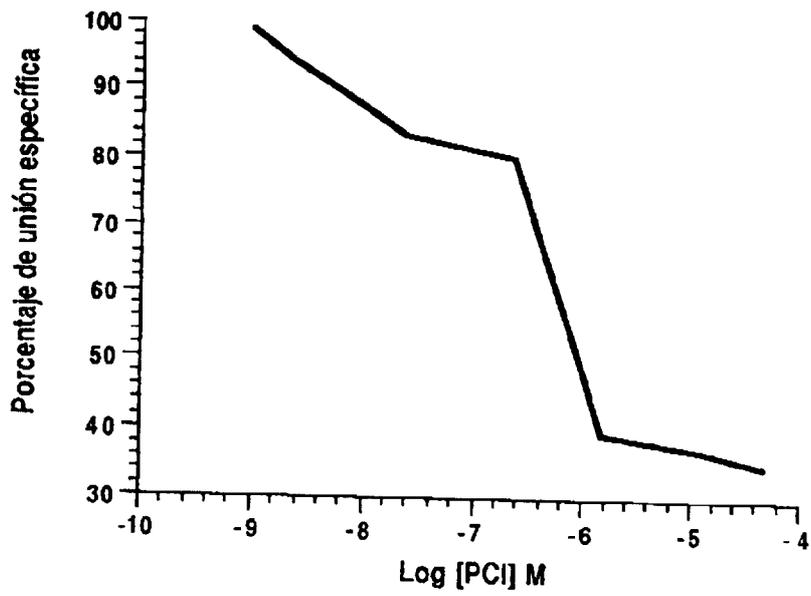


Figura 27

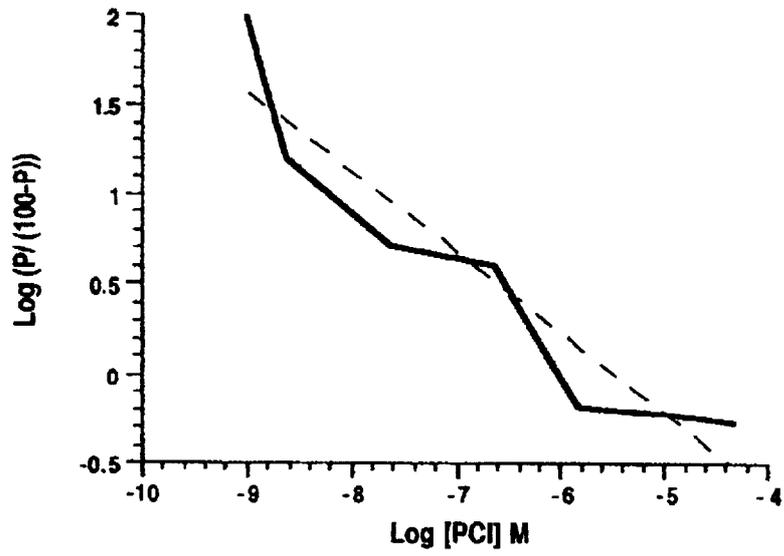
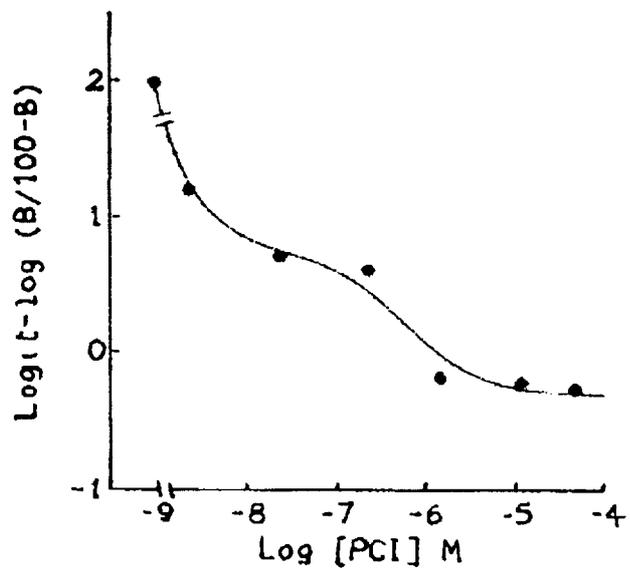


Figura 28





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C07K 14/81, A61K 38/56

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	HASS, G.M et al. " The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes". BIOCHEMISTRY, Vol. 14, nº 6, 1975, páginas 1334-1342, todo el documento.	1-8 8
Y	SLEDGE, G.W. Jr. et al.: "Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice". J. NATL. CANCER INST., Vol. 87, nº 20, 1995, páginas 1546-1550, todo el documento.	8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

12.11.98

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1