

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 601**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2005** **E 05789520 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 1805319**

54 Título: **RNasa T2 humana recombinante y usos de la misma**

30 Prioridad:

29.09.2004 US 613702 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2014

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (100.0%)
Hi Tech Park, Edmond J. Safra Campus, The
Hebrew University of Jerusalem, Givat Ram, P.O.
Box 39135
9139002 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 524 601 T3

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

DESCRIPCIÓN

RNasa T2 humana recombinante y usos de la misma

5 La presente invención se refiere a una proteína de ribonucleasa aislada de la familia T2 como se expone en SEC ID N°: 4 de acuerdo con la reivindicación 1, una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, y un artículo de fabricación de acuerdo con la reivindicación 10.

10 La presente divulgación se refiere a una proteína de ribonucleasa T2 humana, que tiene propiedades de unión a actina y antitumorales, y la clonación y expresión de la misma en células de levadura. Además, la presente invención se refiere a métodos para el uso de proteínas de ribonucleasa T2 humanas en el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas con tumores sólidos y crecimiento metastásico en un sujeto, y nuevos métodos para la purificación de ribonucleasas T2 humanas. La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen, como un principio activo, una ribonucleasa humana de la familia T2 o un polinucleótido que la codifica
15 para el tratamiento de enfermedades o trastornos proliferativos en general y cáncer en particular.

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

Pueden usarse potencialmente como fármacos antineoplásicos, agentes que presentan propiedades antiproliferativas, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo (como antiangiogénesis) contra células de mamífero. Como tales, estos agentes se buscan ampliamente de fuentes tanto naturales como sintéticas.

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

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

El mecanismo específico por el que las RNAsas extracelulares actúan en reacciones celulares se desconoce.
45

La principal barrera para la actividad citotóxica de algunas RNAsas es la membrana celular. Se ha descubierto que ECP forma canales en membranas tanto artificiales como celulares. Supuestamente, ECP liberado de la membrana granular junto con EDN (RNasa eosinófila, que es responsable de la destrucción de células de Purkinje cerebrales) transfiere EDN al espacio intercelular. La entrada de la toxina fúngica α -sarcina (un miembro de la familia de RNasa A) en células diana depende de la infección viral que permeabiliza la membrana celular (Rybak, M. *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207). También es posible que las RNAsas entren a la célula mediante endocitosis. Cuando los fármacos disruptores del Golgi ácido retinoico o monensina se usaron para suministrar artificialmente RNasa BS a las células, la citotoxicidad aumentó drásticamente (Wu Y, *et al.*, 1995, J Biol Chem. 270(29): 17476-81).
50

La citotoxicidad de las RNAsas puede usarse para fines terapéuticos. La RNasa L humana se activa por interferón e inhibe el crecimiento viral. La expresión del gen para RNasa L humana junto con el de una 2'5'-A sintetasa en plantas de tabaco es suficiente para proteger las plantas del virus del mosaico del pepino y para prevenir la replicación del virus de la patata Y. El virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) induce el bloqueo en las rutas antivirales de RNasa L (Schein, C. H. 1997 Nature Biotechnol. 15: 529-536.). Las RNAsas pueden fusionarse con anticuerpos de proteína de membrana específicos para crear inmunotoxinas. Por ejemplo, la fusión de RNasa A con anticuerpos para el receptor de transferrina o para el antígeno de linfocitos T CD5 conduce a la inhibición de la síntesis proteica en células tumorales que portan un receptor específico para cada una de las toxinas anteriores (Rybak, M. *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207; Newton DL, *et al.*, 1998, Biochemistry 14; 37(15): 5173-83). Ya que las RNAsas son menos tóxicas para los animales, estas pueden tener menos efectos secundarios indeseables que las inmunotoxinas usadas actualmente.
65

La citotoxicidad de ribonucleasas citotóxicas parece estar relacionada de forma inversa con la fuerza de la interacción entre un inhibidor de ribonucleasa (RI) y la RNasa. El inhibidor de ribonucleasa (RI) es una molécula de origen natural hallada dentro de células de vertebrados que actúa para proteger estas células de los efectos potencialmente letales de las ribonucleasas. El inhibidor de ribonucleasa es una proteína citosólica de 50 kDa que se une con RNasas con diversa afinidad. Por ejemplo, el RI se une con miembros de la superfamilia de ribonucleasa pancreática bovina A (RNasa A) de ribonucleasas con constantes de inhibición que abarcan diez órdenes de magnitud, variando las K_i de 10^{-6} a 10^{-16} M.

A-RNasas

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

Aunque la actividad RNasa de ONCONASA es relativamente baja, se acepta que las actividades enzimática y citotóxica de la misma están asociadas en algún grado. Se cree que la estructura terciaria de A-RNasas diferencia entre tipos citotóxicos y no citotóxicos. Por ejemplo, se cree que las diferencias entre la estructura terciaria de ONCONASA y RNasa A son responsables de la citotoxicidad aumentada observada para ONCONASA. La ONCONASA, a diferencia de RNasa A, contiene un resto Glu1 N terminal bloqueado (piroglutamato) que es esencial para las actividades tanto enzimática como citotóxica. Esta estructura única permite que la ONCONASA permee a células diana (Boix E., *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 19: 257(5): 992-1007). Además, en la ONCONASA el resto Lys9 reemplaza el resto Gln11 de RNasa A, que se cree que efectúa la estructura del sitio activo. Además, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria entre ONCONASA y RNasa A provocan cambios topológicos en la periferia del sitio activo que efectúan la especificidad del mismo (Mosimann S. C., *et al.*, 1992, Proteins 14(3): 392-400).

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

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

El tratamiento de cultivos tisulares susceptibles con ONCONASA da como resultado la acumulación de células detenidas en la fase G1 del ciclo celular, que tienen un nivel muy bajo de contenidos de ARN (Mosimann S. C., *et al.*, 1992, Proteins 14(3): 392-400). En células de glioma la ONCONASA inhibió la síntesis proteica sin una reducción significativa en la densidad celular, mostrando que la ONCONASA también es citotóxica para células además de ser citostática (Wu Y., *et al.*, 1993, J. Biol. Chem. 15; 268(14): 10686-93). La ONCONASA, combinada con agentes quimioterapéuticos, puede superar la resistencia a múltiples fármacos. El tratamiento con vincristina y ONCONASA aumentó el tiempo de supervivencia medio (MST) de ratones que portaban tumores resistentes a vincristina hasta 66 días, en comparación con 44 días en ratones tratados con vincristina solamente (Schein, C. H., 1997, Nature Biotechnol. 15: 529-536).

Además, algunos agentes quimioterapéuticos pueden actuar de forma sinérgica con ONCONASA. En líneas celulares tumorales de adenocarcinoma pancreático humano y el carcinoma de pulmón humano tratado con una combinación de ONCONASA y tamoxifeno (anti-estrógeno), trifluoroperacina (Estelazina, inhibidor de calmodulina) o lovastatina (inhibidor de 3-hidroxil-3-metilglutamil coenzima A (HMG-CoA) reductasa) se observó una inhibición del crecimiento más fuerte que las células tratadas con ONCONASA solamente (Mikulski S. M., *et al.*, 1990, Cell Tissue Kinet. 23(3): 237-46). Por lo tanto, resulta evidente una posibilidad de desarrollar regímenes de terapia de combinación con mayor eficacia y/o menor toxicidad.

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

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

RNasas T2

En plantas, la autocompatibilidad es abundante y es eficaz en la prevención de la autofertilización. El polen que porta un alelo particular en el locus S, que controla la autoincompatibilidad, es incapaz de fertilizar plantas que portan el mismo alelo S. En muchas plantas autoincompatibles, especialmente miembros de las Solanáceas y Rosáceas, la RNasa S, un miembro de la familia de RNasa T2 se secreta por los órganos femeninos. La RNasa S específicamente reconoce el polen propio y detiene su crecimiento en el estigma o el estilo antes de que se produzca la fertilización (Clarke, A. E. y Newbigin, E., 1993, Ann. Rev. Genet. 27: 257-279). Se ha propuesto que la detención del crecimiento del tubo polínico es una consecuencia directa de la degradación de ARN, sin embargo el modo de entrada de la RNasa S a la célula del tubo aún se desconoce.

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

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

En plantas, las RNasas T2 desempeñan un papel en el proceso de polinización, limitando selectivamente la elongación de los tubos polínicos que se mueven hacia los óvulos (Roiz, L. y Shoseyov, O., 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41, Roiz L. *et al.*, 1995, Physiol. Plant. 94: 585-590). Hasta recientemente, ha habido controversia con respecto al mecanismo por el que estas RNasas afectan a los tubos polínicos. Sin embargo, como se describe en detalle en la sección de Ejemplos posteriormente en el presente documento, los presentes autores, trabajando con RNasa B1 de *A. niger*, han mostrado que la RNasa T2 B1 interfiere con la estructura de la red citoesquelética de F-actina del tubo polínico, provocando una alteración de la corriente citoplasmática y el colapso de la red de F-actina hacia la punta. Además, en experimentos con RNasa B1 que tienen niveles indetectables de actividad ribonucleolítica, se ha mostrado que la detención del crecimiento del tubo polínico es independiente de la actividad RNasa (Roiz *et al.* en preparación).

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

Apoptosis y enfermedad

La muerte celular puede producirse mediante dos procesos diferentes, denominados necrosis y apoptosis, que pueden distinguirse por conjuntos específicos de características funcionales y morfológicas. La necrosis es una muerte celular traumática que se produce como respuesta a agentes nocivos en el ambiente extracelular, por ejemplo hipoxia, hipertermia, invasión viral, exposición a toxinas o ataque por patógenos. Las bombas de iones y agua en la membrana plasmática pierden sus capacidades para mantener los gradientes de concentración, las células y mitocondrias se hinchan y con el tiempo estallan, vertiendo constituyentes celulares y conduciendo a una respuesta inflamatoria en el tejido circundante. En la apoptosis, o muerte celular programada (PCD), se induce que las células se autodestruyan mediante un programa genómico intrínseco. Las células se encogen y las mitocondrias se degradan y liberan citocromo c. El ADN nuclear se degrada gradualmente en monómeros y multímeros de aproximadamente 200 bases. Con el tiempo, las células experimentan formación de ampollas, y se rompen en fragmentos pequeños, incluidos en membranas denominados cuerpos apoptóticos que se capturan por células fagocíticas cercanas (Rudin CM y Thompson CB. 1997. *Annu Rev Med.* 48: 267-81; Chamond R. R. *et al.* 1999. *Allogol Immunol Clin.* 14: 367-374). Significativamente, no se induce ninguna respuesta inflamatoria en tejidos circundantes. La diferencia entre las dos formas de muerte celular se resume en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: apoptosis frente a necrosis

	Necrosis	Apoptosis
Etiología	Lesión celular aguda debido a estímulos extracelulares	Diversos estímulos intracelulares o extracelulares
Carácter	Patológico	Fisiológico o patológico
Distribución	Grupos de células o trozos de tejidos	Células aisladas totalmente dispersas
Requisitos de energía	Proceso pasivo (independiente de ATP)	Proceso activo (dependiente de ATP)
Características morfológicas	Hinchamiento del citoplasma. Lisis de membrana con pérdida de contenidos celulares y de orgánulos.	Reducción del citoplasma, externalización de fosfatidilserina. Formación de ampollas de la membrana celular para formar cuerpos apoptóticos que abarcan el citoplasma y orgánulos. Condensación de cromatina y fragmentación de ADN en multímeros de 200 bases.
Reacción del tejido circundante	Inflamación	Fagocitosis sin reacción inflamatoria

(Nikitakis N. G. *et al.* 2004. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 97: 476-90.)

La apoptosis desempeña un papel central en la regulación de la homeostasis en procesos normales, y patológicos. Durante la embriogénesis la apoptosis es responsable de la desaparición de la cola de los renacuajos, la diferenciación de dedos de las manos y de los pies, y la eliminación de neuronas innecesarias en el cerebro. También está implicada en el desensamblaje del endometrio en la menstruación, y en el proceso de envejecimiento (Herndon FJ. *et al.* 1997. *Mechanism of ageing and development* 94: 123-134).

La apoptosis es necesaria para retirar células que representan una amenaza para la integridad del organismo. Por ejemplo, es el mecanismo por el que los linfocitos T citotóxicos (CTL) destruyen células infectadas por virus (Barber GN. 2001. *Cell Death Differ.* 8: 113-126). Los CTL pueden inducir apoptosis incluso entre sí, de modo que puedan eliminarse después de completar su función fisiológica, evitando que se conviertan en una desventaja para el tejido circundante (Duke RC. 1992. *Semin Immunol.* 4: 407-412).

La cámara anterior del ojo y los testículos se conocen como órganos "inmunoprivilegiados", ya que se ha descubierto que los antígenos no inducen una respuesta inmunitaria en estos sitios. En estos sitios, las células expresan de forma constitutiva altos niveles de ligando de Fas (FasL), una citocina que se une con un receptor de superficie celular denominado Fas (también llamado CD95) y conocida como un activador de muerte potente. FasL es tóxico para linfocitos T, y permite por lo tanto la supervivencia prolongada, y en ocasiones permanente, de tejido ajeno e injertos tumorales (apoptosis inhibida) (Niederkorn JY. 2002. *Crit Rev Immunol.* 22: 13-46; Takeuchi T. *et al.* 1999. *J. Immunol.* 162: 518-522; Sugihara A, *et al.* 1997. *Anticancer Res.* 17: 3861-3865). Por lo tanto, la regulación positiva de procesos apoptóticos en células específicas, por ejemplo linfocitos, puede ser útil en la prevención del rechazo de injertos, conduciendo potencialmente a la reducción en el uso de fármacos inmunosupresores y mejora en la calidad de vida del paciente.

Se ha asociado una diversidad de enfermedades con la regulación de la apoptosis. Entre ellas están diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, y epilepsia, todas asociadas con apoptosis selectiva de las neuronas. Esta muerte neuronal parece estar asociada con susceptibilidad aumentada a la apoptosis en estas células.

Las células sanguíneas maduras derivan de precursores hematopoyéticos localizados en la médula ósea. La hematopoyesis, así como el mantenimiento de células sanguíneas maduras, está regulada por varios factores tróficos (eritropoyetina, factores estimulantes de colonias, citocinas). El equilibrio entre la producción de células hematopoyéticas y su eliminación se regula por la apoptosis. La pérdida de regulación por apoptosis puede asociarse con una diversidad de trastornos sanguíneos por ejemplo anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, linfocitopenia de linfocitos T CD4⁺ y deficiencia de G6PD.

En el infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares, el daño renal isquémico y riñón poliquístico las células que rodean la zona isquémica se eliminan mediante apoptosis.

Existen pruebas que muestran que la apoptosis está regulada positivamente en una diversidad de células, por ejemplo neuronas, miocitos, linfocitos, hepatocitos, y que el envejecimiento potencia la apoptosis en condiciones fisiológicas que provocan la disfunción de la homeostasis, tales como tensión oxidativa, glucosilación y daño de ADN.

La apoptosis se ha descrito en células inflamatorias (eosinófilos, neutrófilos, linfocitos, macrófagos, mastocitos) que participan en los estadios tardíos y crónicos de la alergia (Sampson AP. 2000. Clin Exp Allergy. 30 Supl 1: 22-7; Haslett C. 1999. Am J Respir Crit Care Med. 160: 55-11). Por ejemplo, la muerte apoptótica de los eosinófilos se asocia con asma bronquial, rinitis alérgica y dermatitis atópica (Wooley KL *et al.* 1996. Am J Respir Crit Care Med; 154: 237-243; Boyce JA. Allergy Asthma Proc. 18: 293-300). La apoptosis de linfocitos puede inducirse por alérgenos, tales como *Olea europaea* y *Lolium perenne* induce (Guerra F *et al.* 1999. Hum Immunol; 60: 840-847).

Las enfermedades asociadas con la inhibición de la apoptosis incluyen las enfermedades en las que se produce una acumulación excesiva de células (enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunitarias). Aunque antes se creía que la acumulación excesiva de células en estas enfermedades se debía a un aumento de la proliferación celular, se cree ahora que se debe a una apoptosis defectuosa.

En tumores tanto sólidos como hematológicos, las células malignas muestran una respuesta anómala a inductores de apoptosis (Watson AJM. 1995. Gut 37: 165-167; Burch W. *et al.* 1992. Trends Pharmacol Sci 13: 245-251). En estas enfermedades los genes reguladores del ciclo tales como *p53*, *ras*, *c-myc* y *bcl-2* padecen mutaciones, inactivación o desregulaciones asociadas con degeneración maligna (Merritt AJ *et al.* 1994. Cancer Res 54: 614-617; Iwade Y *et al.* 1996. Int J Cancer 69: 236-240; Müllauer L *et al.* 1996. Hepatology 23: 840-847; Newcomb EW. 1995. Leuk Lymphoma 17: 211-221). Se considera que la expresión de *bcl-2* es un factor predictivo para peor pronóstico en cáncer de próstata y colónico y en neuroblastoma (Thompson CB. 1995. Science 267: 1456-1462). Se ha mostrado que varias terapias antineoplásicas inducen apoptosis en células tumorales (para revisiones véase: Sun SY *et al.* 2004. J Natl Cancer Inst. 96: 662-672; Schulze-Bergkamen H y Krammer PH. 2004. Semin Oncol. 31: 90-119; Abend M. 2003. Int J Radiat Biol. 79: 927-941).

Los defectos en la apoptosis pueden conducir a enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso (Carson DA. y Rebeiro JM. 1993. Lancet. 341: 1251-1254. Aringer M. *et al.* 1994. Arthritis Rheum. 37: 1423-1430), artritis reumatoide (Liu H. y Pope RM. 2003. Curr Opin Pharmacol. 3: 317-22.) y miastenia grave (Masunaga A. *et al.* 1994. Immunol Lett. 39: 169-172.).

Hay varias maneras en las que los patógenos interfieren con la apoptosis. Por ejemplo los adenovirus y virus de Epstein-Barr (asociados con varios tumores malignos linfoides y epiteliales) promueven la expresión del oncogén Bcl-2 (Thompson CB. 1995. Science 267: 1456-1462; Marshall WL. *et al.* 1999. J Virol. 73: 5181-5185), la viruela vacuna codifica un inhibidor de proteasa que inactiva caspasas (Deveraux QL, *et al.* 1999. J Clin Immunol. 19: 388-98.); la clamidia interfiere con la liberación de citocromo c mitocondrial al citosol (Fan T. *et al.* 1998. J Exp Med. 187: 487-496).

En enfermedades cutáneas hiperproliferativas inflamatorias crónicas tales como psoriasis, una tasa anormalmente baja de la apoptosis contribuye al desarrollo de hiperplasia epidérmica. Se ha mostrado que los queratinocitos responden a una diversidad de factores de crecimiento externos e internos, incluyendo algunas citocinas proinflamatorias que pueden suprimir la apoptosis de queratinocitos, tales como IL-15 (Ruckert R. *et al.* 2000. J Immunol. 165: 2240-2250).

Actina y movilidad celular

La actina es ubicua en la naturaleza, comprendiendo el citoesqueleto y proporcionando movilidad en todos los tipos de células. El citoesqueleto de actina celular se organiza en una diversidad de ensamblajes espacial y temporalmente controlados de filamentos de actina. Los filamentos de actina se polimerizan a partir de G-actina monomérica en lamelipodios y filopodios en la periferia celular. Estos filamentos de actina recién polimerizados son altamente dinámicos y se renuevan rápidamente. Los filamentos de actina hallados en el resto de las células tienen su origen en el lamelipodio y en pequeñas rugosidades de la membrana que aparecen por todas las lamelas. Los filamentos de actina se organizan en diversas disposiciones tales como fibras de tensión, redes de lamelipodios, haces de filopodios, arcos dorsales, haces cóncavos o convexos periféricos así como disposiciones geodésicas

(Small, *et al.* Trends in Cell Biol 2002; 12: 112-20). La organización de cada uno de estos ensamblajes se controla y estabiliza por conjuntos específicos de proteínas asociadas con actina, confiriéndoles diferentes funciones. Una organización asimétrica y polarizada de las diferentes disposiciones de actina en células es fundamental para la migración, crecimiento, división, diferenciación y defensa celular (Hilpela *et al.*, Mol Cell Biol 2003; 14: 3242-53).

La movilidad celular depende de la dinámica cíclica de la polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina. La movilidad celular implica protrusión de un frente celular y retracción consecuente de la parte posterior. La protrusión se basa en el crecimiento hacia delante, cíclico, o polimerización de filamentos de actina en lamelipodios y filopodios. La retracción, por otro lado, se basa en la interacción de filamentos de actina preformados con miosina II en haces contráctiles. Los estudios microscópicos han mostrado un continuo de flujo retrogrado de actina detrás de los lamelipodios, lo que indica que una proporción de filamentos generados en el lamelipodio contribuye a la red de actina que compone el resto del citoesqueleto de actina. Por lo tanto, los filamentos de actina se generan en los lamelipodios, se desprenden de sus proteínas asociadas a media que se incorporan en el citoesqueleto de actina y después adquieren otras proteínas asociadas con actina, particularmente proteínas contráctiles tales como miosina II, haciéndose haces contráctiles en preparación para la retracción de las protrusiones celulares.

El cambio de forma de la célula y su movilidad están implicados en acontecimientos patológicos, tales como metástasis de cáncer, enfermedad inflamatoria, enfermedad neurodegenerativa y similares. Se han identificado proteínas asociadas con la movilidad celular en la patogénesis de varias enfermedades, tales como Síndrome de Wiscott-Aldrich (proteína WAS). La presentación clásica del Síndrome de Wiscott-Aldrich incluye síntomas tales como eccema, trombocitopenia y susceptibilidad a infecciones.

Se sabe que un número grande y creciente de proteínas regulan y modulan el estado del citoesqueleto de actina, y algunas parecen tener funciones parcialmente solapantes. Estas incluyen las proteínas de unión a actina e integrina tales como filamina, talina, complejo Arp 2/3, α -actinina, proteínas de corte de filamentos y proteínas de recubrimiento de extremos en lengüeta (para revisión, véase Brakebusch *et al.*, EMBO Journal, 2003; 22: 2324-33). Además, existen proteínas de diferentes rutas de señalización corriente arriba que conducen a cambios en el citoesqueleto de actina y la morfología y el comportamiento celular tales como la GTPasas relacionadas con Ras pequeñas, por ejemplo, Rac, Rho y Cdc42. Además de estas GTPasas pequeñas, se sabe que las fosfoinositidas y el calcio regulan la dinámica de la actina y la migración celular.

En la actualidad, están disponibles muy pocos inhibidores específicos de la movilidad celular, incluso aunque existe un gran potencial para dichos fármacos como un complemento de terapias existentes para enfermedad inflamatoria, cáncer, enfermedad neurodegenerativa y similares. Por ejemplo, el cambio de forma de la célula y su movilidad están implicados en dos etapas limitantes de la velocidad en la progresión del cáncer: angiogénesis (es decir, reclutamiento de vasos sanguíneos) y metástasis (es decir, propagación de un tumor de una localización en el cuerpo a otras localizaciones), en la extravasación de linfocitos de elementos vasculares en enfermedad inflamatoria y en la progresión invasiva de muchos parásitos celulares en tejido hospedador infectado. En combinación con inhibidores del crecimiento celular, el tratamiento con inhibidores de la movilidad celular específicos tienen el potencial de proporcionar un tratamiento más eficaz de enfermedades de movilidad y proliferación celulares tales como enfermedad inflamatoria, cáncer, infecciones y similares, análogo al enfoque de múltiples fármacos para el tratamiento de la infección por VIH y SIDA.

Se sabe que varios compuestos que se dirigen a la actina directamente son eficaces en la modulación de la movilidad celular. Los compuestos mejor conocidos son las citocalasinas, que son desestabilizadores permeables para la célula de filamentos de actina, y faloidina que es un estabilizador impermeable para la célula de filamentos de actina (J. A. Cooper, J. Cell Biol, 105 (1987)). Además, las latrunculinas son disruptores permeables para células de filamentos de actina (I. Spector, Science, 219, 493 (1983)). El jasplakinólido es un estabilizador permeable para la célula de filamentos de actina (M. R. Bubb *et al.*, Chem., 269, 14869 (1994)). Se conocen varios compuestos que se dirigen a proteínas corriente arriba del citoesqueleto de actina, tales como el inhibidor de Rho-quinasa Y-27632 (M. Uehata *et al.*, Nature, 389, 990 (1997)) e inhibidores de quinasa de cadena ligera de miosina, tales como ML-g (M. Saitoh *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 140, 280 (1986)). Recientemente, se ha descubierto un dímero peptídico cíclico que inhibe la actividad de N-WASP, una proteína implicada en la nucleación de actina mediada por Cdc42 por el complejo de Arp2/3 (J. R. Peterson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10624 (2001)). No obstante, hay una escasez de compuestos disponibles que afectan a la dinámica de actina y la movilidad celular.

RNasa6PL humana

La anomalías del brazo largo del cromosoma 6 en seres humanos se asocian con varias neoplasias sólidas incluyendo carcinoma del colon y el recto (Honchel R, *et al.* 1996. Cancer Res. 56:145-9), mama (Devilee *et al.* 1991. Oncogene 6: 1705-1711; Theile *et al.* 1996. Oncogene 13:677-685; Chappell *et al.* 1997. Br.J.Cancer 75:1324-1329), estómago (Queimado *et al.* 1995. Genes Chromosomes Cancer 14: 28-34), hígado (DeSouza *et al.* 1995. Oncogene 10: 1725-1729), riñón (Morita *et al.* 1991. Cancer Res. 51: 5817-5820), melanoma (Millikin *et al.* 1991. Cancer Res. 51: 5449-5443), ovario (Saito *et al.* 1992. Cancer Res. 52: 5815-5817; Foulkes *et al.* 1993. Br.J.Cancer 67: 551-559; Cooke *et al.* 1996. Genes Chromosomes Cancer 15: 223-233; Orphanos *et al.* 1995. Br.J.Cancer 71: 290-293; Tibiletti *et al.* 1996. Cancer Res. 56:4493-4498) y útero (Tibiletti *et al.* 1997. Br.J.Cancer 75: 1831-1835). El

cromosoma 6q27 se ha clonado y secuenciado. El gen de RNasa6PL, que tiene alta homología con una familia de genes de RNasa citoplasmática altamente conservados de plantas a seres humanos, se localiza en este cromosoma.

Se ha considerado que la delección de una región del cromosoma 6 en seres humanos (6q27) está asociado con varios tumores malignos humanos (Cooke *et al.* 1996. Genes Chromosomes Cancer 15:223-233; Saito *et al.* 1992. Cancer Res 52:5815-5817). Se ha descubierto que esta región contiene el gen supresor de tumores potencial RNasa6PL que comparte homología con la familia de RNasa T₂ (Trubia *et al.* 1997. Genomics 42: 342-344; Acquati *et al.* 2001, Meth. Mol Biol 160: 87-101 y Oncogene 2001; 22: 980-88). La secuencia del gen de RNasa6PL se ha identificado en el proyecto del genoma humano. Sin embargo, no se ha aislado ni purificado ninguna proteína de RNasa6PL humana, y no se ha demostrado ninguna actividad antitumoral y antimetastásica de una RNasa T2 humana.

Se ha mostrado que la RNasa T2 de levadura (RNasa B1) posee actividad de unión a actina crucial para la inhibición del crecimiento de tubos polínicos (Roiz, L, *et al.*, en preparación). Se apreciará que una proteína RNasa T2 humana que tiene actividad de unión a actina, antitumoral y antimetastásica, similar a la descubierta en otras RNasas T2, proporcionaría una ventaja terapéutica sobre las proteínas de RNasa T2 ajenas, ya que se espera que dicha proteína nativa se tolere mejor por el hospedador.

Hay por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida y sería altamente ventajoso tener una ribonucleasa humana aislada, recombinante, de la familia T2 que tenga actividad de unión a actina, que tenga utilidad potencial en el tratamiento y prevención de una enfermedad asociada a la movilidad celular tal como enfermedad inflamatoria, cáncer, enfermedad neurodegenerativa y enfermedad infecciosa.

La publicación de base de datos Uniprot (en línea): 2.5/44.5 del 13 de septiembre de 2004 desvela una RNasa T2 o una RNasa 6 PL de *Homo sapiens*.

Aquati Francesco *et al* se refiere a la clonación y caracterización de un gen supresor de tumores de clase II e inductor de senescencia en el carcinoma ovárico en la región del cromosoma 6q27, 22 de febrero de 2001.

El documento WO 01/15531 se refiere a métodos y composiciones para inhibir la proliferación de células de mamífero.

La proteína de ribonucleasa aislada de la familia T2 como se expone en SEC ID N°: 4 de la presente invención se define en la reivindicación 1, la composición farmacéutica de la presente invención se define en la reivindicación 4, y el artículo de fabricación de la presente invención se define en la reivindicación 10.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona una proteína de ribonucleasa aislada de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido heterólogo que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 85 % homólogo de SEC ID N°: 4 y que tiene una actividad ribonucleasa T2 y un segundo polinucleótido que alberga un promotor heterólogo para dirigir una expresión del polipéptido en un sistema de expresión heterólogo.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona una célula modificada genéticamente que comprende un polinucleótido heterólogo que comprende un primer polinucleótido que codifica un polipéptido que es al menos 85 % homólogo de SEC ID N°: 4 y que tiene una actividad ribonucleasa T2 y un segundo polinucleótido que alberga un promotor heterólogo para dirigir una expresión del polipéptido en un sistema de expresión heterólogo.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para prevenir, inhibir o invertir en un sujeto mamífero que lo necesite, un proceso asociado con células de proliferación anómala seleccionado del grupo que consiste en proliferación, desarrollo, diferenciación, transformación, tumorigénesis, crecimiento tumoral, colonización y angiogénesis, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de ribonucleasa de la familia T2, teniendo dicha proteína de ribonucleasa una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2, invirtiendo de este modo en el sujeto mamífero el proceso asociado con células de proliferación anómala.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona una ribonucleasa aislada de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 que está sustancialmente desprovista de actividad ribonucleasa y que tiene una actividad de unión a actina.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, la proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de

aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo* con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para preparar un medicamento útil en la prevención, inhibición y/o inversión de la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala que comprende combinar la proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo* con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporcionan métodos para (i) tratar un tumor en un sujeto; (ii) prevenir, inhibir y/o invertir el desarrollo de un tumor en un sujeto; (iii) prevenir, inhibir y/o invertir la transformación de un tumor benigno a un tumor maligno en un sujeto; (iv) prevenir, inhibir y/o invertir la angiogénesis tumoral en un sujeto; (v) reducir el número de tumores individuales en un sujeto; (vi) reducir el tamaño tumoral en un sujeto; (vii) reducir un número de tumores malignos en un sujeto; y (viii) prevenir, inhibir y/o invertir la transformación de un tejido en un tumor en un sujeto, efectuándose cada uno de los métodos administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*.

20 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita posteriormente, la proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 carece sustancialmente de actividad ribonucleolítica. Como se usa en el presente documento la frase "carece sustancialmente de actividad ribonucleolítica" se refiere a (i) una proteína de ribonucleasa inactivada (bien natural o bien recombinante) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 que tiene actividad ribonucleolítica de 0-10 % en comparación con una ribonucleasa similar, no inactivada; y/o (ii) una proteína de ribonucleasa mutante recombinante (natural o inducida por el hombre) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 que tiene actividad ribonucleolítica del 0-10 % en comparación con una ribonucleasa similar, no mutante. La inactivación de la actividad ribonucleolítica de la ribonucleasa de la proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 puede efectuarse por un proceso seleccionado del grupo que consiste en hervir, inactivar por autoclave y desnaturalizar químicamente.

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

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

40 De acuerdo con un aspecto más de la presente divulgación, se proporcionan métodos para tratar o prevenir enfermedades o afecciones caracterizadas por: (i) movilidad celular excesiva; o (ii) acumulación anómala de células en un sujeto que lo necesite. Cada uno de los métodos se efectúa administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*.

De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la enfermedad o afección caracterizada por movilidad celular excesiva se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurodegenerativa y un cáncer.

50 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la enfermedad o afección, caracterizada por movilidad celular excesiva es un cáncer.

55 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la administración al sujeto de la cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo* se efectúa por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en administración oral, administración intravenosa, administración subcutánea, administración sistémica, administración tópica, administración transmucosa, administración parenteral, administración rectal e inhalación.

60 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporcionan métodos para (i) inhibir la movilidad de una célula; (ii) inhibir el ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina en una célula; y (iii) potenciar la apoptosis de una célula. Cada uno de los métodos se efectúa proporcionando a la célula una concentración eficaz de una proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*.

De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la proteína de ribonucleasa es una proteína de ribonucleasa humana de la familia T2.

5 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la proteína de ribonucleasa es como se expone en SEC ID N°: 4

10 De acuerdo con características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 es una proteína recombinante, expresada en un sistema de expresión heterólogo. El sistema heterólogo puede ser un sistema de expresión bacteriana, sistema de expresión de levaduras y sistema de expresión de células superiores.

De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones descritas preferidas, la actividad ribonucleasa de la proteína de ribonucleasa es termoestable.

15 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 está sustancialmente desprovista de actividad ribonucleasa.

20 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la proteína de ribonucleasa se caracteriza por actividad de unión a actina.

De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, una actividad ribonucleasa de la proteína de ribonucleasa es termoestable.

25 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, una actividad de unión a actina de la proteína de ribonucleasa es termoestable.

De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el polinucleótido expresable se selecciona con capacidad para integración estable en un genoma de la célula o de una célula del sujeto.

30 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la célula es una célula cancerosa.

35 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la aportación se efectúa *in vitro* o *in vivo*.

40 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para aislar una proteína de ribonucleasa termoestable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*. El método comprende las etapas de: desnaturalizar por calor una muestra que comprende células que expresan una proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo* para obtener una muestra desnaturalizada por calor, aislar un sobrenadante de la muestra desnaturalizada por calor; identificar una fracción del sobrenadante que tiene una proteína de ribonucleasa termoestable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*; y purificar la fracción que tiene la proteína de ribonucleasa termoestable que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo* del sobrenadante hasta una pureza sustancial.

50 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la desnaturalización por calor se efectúa por una temperatura de al menos 90 °C, durante al menos 10 minutos.

55 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la identificación de la fracción se efectúa por control de la actividad ribonucleolítica y/o electroforesis en gel.

De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la purificación de la fracción se efectúa por cromatografía en columna.

60 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para inactivar una actividad ribonucleasa, manteniendo aún una actividad de unión a actina de una proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*, efectuándose el método sometiendo la ribonucleasa a condiciones desnaturalizantes suficientes para inactivar sustancialmente la actividad ribonucleasa, manteniendo aún la actividad de unión actina.

65

De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la inactivación de la actividad ribonucleasa se efectúa por inactivación por autoclave y/o desnaturalización química.

5 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la ribonucleasa es una ribonucleasa recombinante.

De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la ribonucleasa está sustancialmente desprovista de actividad ribonucleasa y tiene una actividad de unión a actina.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un método para preparar un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección caracterizada por movilidad celular excesiva que comprende combinar una proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*, o un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método para preparar un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección caracterizada por acumulación anómala de células, combinando el medicamento una proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*, o un polinucleótido que la codifica y es capaz de expresarla *in vivo*, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 De acuerdo con características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, la proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 es una proteína recombinante, expresada en un sistema de expresión heterólogo. El sistema de expresión heterólogo puede ser un sistema de expresión bacteriana, un sistema de expresión de levaduras y un sistema de expresión de células superiores.

25 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la proteína de ribonucleasa que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 está sustancialmente desprovista de actividad ribonucleasa.

30 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas el trastorno o enfermedad proliferativo celular se selecciona del grupo que consiste en papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt, artritis, artritis reumatoide, retinopatía diabética, angiogénesis, reestenosis, reestenosis en endoprótesis y vitreorretinopatía proliferativa por reestenosis de injerto vascular, enfermedad proliferativa inflamatoria crónica, dermatofibroma y psoriasis.

35 De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas la administración al sujeto de dicha cantidad terapéuticamente eficaz de dicha ribonucleasa T2 o dicho polinucleótido se efectúa por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en administración oral, administración intravenosa, administración subcutánea, administración sistémica, administración tópica, administración transmucosa, administración parenteral, administración rectal e inhalación.

40 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación, se proporcionan métodos para potenciar un tratamiento de un cáncer, comprendiendo la potenciación administrar a un sujeto que lo necesite, en combinación con dicho tratamiento del cáncer, una proteína de ribonucleasa que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que la codifique y sea capaz de expresarla *in vivo*. Los tratamientos pueden ser quimioterapia, radioterapia, fototerapia y terapia fotodinámica, cirugía, terapia nutricional, terapia ablativa, radioterapia y quimioterapia combinadas, braquiterapia, terapia de haces de protones, inmunoterapia, terapia celular y terapia radioquirúrgica de haces de fotones.

55 Breve descripción de los dibujos

La divulgación se describe en el presente documento, solamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles particulares mostrados son como ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente divulgación solamente, y se presentan con la intención de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se realiza ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle de lo que es necesario para un entendimiento fundamental de la invención, haciendo la descripción tomada con los dibujos evidente para los expertos en la materia cómo pueden realizarse las varias formas de la invención en la práctica.

En los dibujos:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La FIGURA 15 ilustra el efecto del periodo de exposición a RNasa B1 en la clonogenicidad de células HT29. Se preincubaron muestras repetidas de células con medio de cultivo que contenía RNasa B1 10^{-6} M durante 48 horas y después se dejó colonizar en medio de cultivo que contenía la misma concentración de RNasa B1, o en medio sin RNasa B1. La colonización se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 7 días. Cada tratamiento contenía números iniciales diferentes de células por pocillo. Las colonias se contaron después de la fijación y visualización en azul de metileno. Las células preincubadas y colonizadas en medio de cultivo sin RNasa B1 actuaron como un control.

Las FIGURAS 16a-c ilustran el efecto de la RNasa B1 en la capacidad de colonización de células HT29. Se preincubaron células de control (Figura 16a) 48 horas en medio de cultivo sin RNasa B1 y después se tripsinizaron e incubaron con el mismo medio de cultivo en placas de microtitulación de 96 para colonización. La Figura 16b representa células que se preincubaron durante 48 horas en medio de cultivo que contenía RNasa B1 10^{-6} M y después se permitió que colonizaran en medio de cultivo sin RNasa B1. La Figura 16c representa

células que se preincubaron y después colonizaron en medio de cultivo que contenía RNasa B1 10^{-6} M. Las colonias celulares se visualizaron usando tinción con azul de metileno.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las FIGURAS 32a-h son microfotografías que ilustran la formación de tubos de HUVEC en Matrigel en presencia o ausencia de angiogenina 1 µg/ml, y en presencia o ausencia de RNasas (2 µM cada una). Figura 32a - ausencia de angiogenina y RNasa (Control); Figura 32b - Angiogenina (Control Positivo); Figura 32c - RNasa B1 (Control Negativo); Figura 32d - RNasa B1 + angiogenina; Figura 32e - RNasa T2 (Control Negativo); Figura 32f - RNasa T2 + angiogenina; Figura 32g - RNasa I (Control Negativo); Figura 32h - RNasa I + angiogenina.

Obsérvese la inhibición superior de la formación de tubo endotelial por RNasa B1 de *Aspergillus niger* (Figuras 32d), en comparación con RNasa T2 de *Aspergillus oryzae* (Figura 32f).

FIGURAS 33a-d son fotografías que ilustran el efecto de la RNasa B1 en el melanoma B16F1 en un experimento ip/ip en ratones BDF1 (negro) y Balb/c (blanco). Se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) 2×10^6 células de melanoma B16F1 y después de 24 horas y 5 días se inyectó a los ratones adicionalmente i.p. bien RNasa B1 (5 mg/ratón en 100 μ l de PBS) o PBS. La presencia de los tumores se evaluó 14 días después de la inyección de células de melanoma. Figura 33a - Balb/c a los que se inyectaron células de melanoma solamente; Figura 33b - Balb/c a los que se inyectaron células de melanoma y RNasa B1; Figura 33c - BDF1 a los que se inyectaron solamente en células de melanoma; Figura 33d - BDF1 a las que se inyectó células de melanoma y RNasa B1. Obsérvese los tumores negros típicos altamente desarrollados en los modelos de ratón de melanoma (Figuras 33a y c, flechas), en comparación con tumores considerablemente más pequeños en ratones tratados con RNasa B1 (Figuras 33b y d, flechas).

Las FIGURAS 34a-e ilustran el efecto de la RNasa B1 en la reducción del desarrollo de focos de melanoma B16F10 formados en los pulmones de ratones balb/c, a los que se habían implantado 5×10^5 (Figuras 34a-c) o 5×10^6 (Figuras 34d-e) células/ratón. Las Figuras 34a-b son microfotografías de los pulmones de los ratones a los que se implantó B16F10 después de tratamiento con RNasa B1 (10 mg/ratón, tres veces, cada cuatro días, comenzando 24 horas después de la inyección de las células) o PBS. Figura 34a - PBS; Figura 34b - RNasa B1. Obsérvese la reducción significativa en los focos de melanoma y metástasis después del tratamiento con RNasa B1 (Figura 34b, flechas) en comparación con la inyección de PBS (Figura 34a, flechas). Las Figuras 34c-e son gráficas que representan una determinación cuantitativa del número de metástasis por pulmón (Figura 34c), el peso del pulmón (Figura 34d) y el diámetro de metástasis medio (Figura 34e). Obsérvese la reducción significativa en el número de metástasis/pulmón (76 %, $P < 0,001$, Figura 34c), el peso del pulmón medio (25 %, $P < 0,01$, Figura 34d) y el diámetro de metástasis medio (25 %, $P < 0,001$, Figura 34e) en los ratones tratados con RNasa B1 en comparación con ratones a los que se inyectó PBS.

La FIGURA 35 ilustra el efecto de RNasa B1 en el crecimiento tumoral de células de melanoma humano en ratones desnudos. Se inyectaron células de melanoma A375SM (5×10^5) por vía subcutánea en ratones desnudos ($n = 5$) y tres días después, a los animales a los que se habían inyectado las células tumorales se les inyectaron por vía intraperitoneal posteriormente 1 mg de RNasa B1/ratones o PBS (control). Se inyectó a los animales durante 30 días (cada dos días, 3 días a la semana) y las dimensiones tumorales se registraron en los tiempos indicados. Se muestran los volúmenes tumorales como se expresa en mm^3 como se calcula a partir de la ecuación de $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2) / 2$. Obsérvese que aunque los ratones a los que se inyectó PBS el volumen tumoral aumentó drásticamente y alcanzó el tamaño de 800 mm^3 en un periodo de 30 días, en ratones tratados con RNasa B1 el volumen tumoral permaneció relativamente bajo y no excedió los 180 mm^3 a los treinta días después de inyecciones de células de melanoma.

Las FIGURAS 36a-b ilustran el efecto de RNasa B1 en el tamaño tumoral en xenoinjertos de ratones desnudos derivados de HT-29 en un experimento s.c./i.v. Se indujeron tumores en ratones usando células HT-29 (3×10^6 por ratón) y los ratones se sometieron adicionalmente a RNasa B1 (2 inyecciones que contenían 5 mg de RNasa B1 cada una en 100 μ l de PBS) o inyecciones de PBS (control). Figura 36a - una visión general de tumores en PBS (control, flecha amarilla) o tratados con RNasa B1 (flecha azul). Obsérvese la reducción significativa en el tamaño del tumor en los ratones tratados con RNasa B1 (flecha azul) en comparación con los ratones a los que se inyectó PBS (flecha amarilla); Figura 36b - es una gráfica de barras que representa el tamaño tumoral en ratones tratados con PBS o RNasa B1 ($n = 5$). Obsérvese la reducción media del 60 % en el tamaño tumoral después de tratamiento con RNasa B1.

La FIGURA 37 es una fotografía que ilustra la inhibición *in vivo* de angiogénesis por RNasa B1. Se implantaron por vía subcutánea espumas de gel impregnadas con angiogenina 100 ng/esponja en ambos laterales de un ratón desnudo y después de 48 horas se inyectó por vía intraperitoneal a los ratones en ambos laterales del peritoneo (7 veces, cada dos días), en cada uno un tratamiento diferente; en un lateral RNasa B1 (RNasa B1 250 μ M en 100 μ l) y en el otro lateral PBS. Obsérvese la angiogénesis significativa en el lado de inyección de PBS (región rodeada con una flecha, angiogenina) en comparación con la angiogénesis insignificante en el lateral de inyección de RNasa B1 (región rodeada con una flecha, Angiogenina y RNasa B1), lo que indica inhibición mediada por RNasa B1 del desarrollo inducido por angiogenina de vasos sanguíneos.

La FIGURA 38 es una gráfica de barras que ilustra el efecto de RNasa B1 en la inhibición de la invasión de células A375SM. Se trataron células A375SM en presencia o ausencia de RNasa B1 y después de 22 horas se contó el número de células que invadían el filtro recubierto con Matrigel. Obsérvese el efecto dependiente de la dosis de la RNasa B1 en la inhibición de la invasión de A375SM del filtro recubierto con Matrigel. Mientras que en células A375SM no tratadas (control) 1216 ± 68 células penetraron en los filtros recubiertos con Matrigel, 725 ± 59 o 211 ± 14 células A375SM que se trataron con RNasa B1 1 o 10 μ M penetraron en los filtros recubiertos con Matrigel. * = $P < 0,01$; ** = $P < 0,001$.

Las FIGURAS 39a-b son gráficas de barras que ilustran xenoinjertos de ratones desnudos derivados de HT-29 en el modelo de sc/ip. Se inyectó RNasa B1 a las concentraciones indicadas comenzando desde 24 horas después de la implantación de las células (10^6 células/ratón) y cada dos días. Se midió el tamaño tumoral 30 días después del inicio del tratamiento con RNasa B1. Obsérvese la reducción significativa (hasta el 60 %) en el tamaño tumoral después del tratamiento con RNasa B1 a una amplia serie de dosis, 0,001-1 mg/inyección (Figura 39a) y 1-5 mg/inyección (Figura 39b) en los dos experimentos posteriores ($N = 6$ en cada caso), lo que

demuestra los efectos preventivos (Figura 39a) y terapéuticos (Figura 39b) del tratamiento con RNasa B1. Cont. = ratones con HT-29 implantadas a los que se inyectó PBS.

Las FIGURAS 40a-c son microfotografías de secciones transversales del peritoneo de ratones desnudos con HT-29 implantadas en el modelo de s.c./i.p. en presencia o ausencia de RNasa B1. Figura 40a - tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E). Obsérvese el peritoneo fino (flecha) que cubre el músculo; Figuras 40b-c - Inmunotinción del peritoneo tomado de un ratón tratado con RNasa B1 (Figura 40b) o ratón tratado con PBS (Figura 40c), usando anti RNasa B1 de conejo y anti conejo de cabra conjugado con FITC. Obsérvese la fluorescencia verde que demuestra la acumulación de RNasa B1 en el peritoneo del ratón tratado con RNasa B1 pero no el ratón tratado con PBS.

Las FIGURAS 41a-c son microfotografías de secciones transversales de tumores derivados de HT-29 del modelo de ratones desnudos s.c./i.p. Figura 41a - tinción de H y E; Figuras 41b-c-Inmunotinción de un vaso sanguíneo de un tumor derivado de un ratón tratado con RNasa B1 (Figura 41b) o tratado con PBS (Figura 41c), usando anti RNasa B1 de conejo y anti conejo de cabra conjugado con FITC. Las flechas indican vasos sanguíneos. Obsérvese la acumulación de RNasa B1 en la membrana basal.

Las FIGURAS 42a-b son secciones de histopatología representativas de tejido de cáncer de colon que ilustran el efecto de RNasa B1 en la expresión de CD31 en tumores colónicos inducidos por DMH. Se tiñeron secciones tumorales de ratas tratadas con dimetilhidracina (DMH) (Figura 42a) o de ratas tratadas con DMH y RNasa B1 (Figura 42b) con un anticuerpo anti CD31 (anticuerpo sc-8306 Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA). Obsérvese la presencia de un gran número de vasos sanguíneos grandes en los tumores de ratas tratadas con DMH (Figura 42a) y el tamaño y número significativamente menor de vasos sanguíneos en ratas tratadas con DMH-RNasa B1 (Figura 42b). Aumento x 200. Barra de tamaño = 100 μ m.

Las FIGURAS 43a-b son microfotografías de secciones de histopatología representativas de tumores en ratones desnudos que muestran el efecto proapoptótico de RNasa B1 en el tamaño tumoral y la apoptosis en células de melanoma de ratón. Se cultivaron células de melanoma derivadas de B16F1 de ratón (2×10^6 células/ratón) en la cavidad intraperitoneal de ratones BDF1 y Balb/c. Los ratones tratados con RNasa B1 recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 5 mg de RNasa B1 en 100 μ l de PBS, 24 horas y 5 días después de la inyección con las células de melanoma. Los ratones de control no tratados recibieron inyecciones de PBS. Después de 14 días, los ratones se sacrificaron y se prepararon muestras para análisis. Se tiñeron secciones transversales de parafina con respecto a apoptosis usando el kit Klenow-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA). Obsérvese la predominancia de núcleos celulares apoptóticos (tinción marrón) en los tumores tratados con RNasa B1 (Figura 43b), en comparación con los núcleos con división activa (tinción verde) en los controles no tratados (Figura 43a).

Las FIGURAS 44a-b son microfotografías de secciones de tumor de colon representativas que ilustran el efecto de la RNasa B1 en la tasa de apoptosis en tumores colónicos inducidos por DMH. Se fijaron secciones de tumores de colon de ratas tratadas con dimetilhidracina (DMH) y se incluyeron en parafina, y se ensayaron con respecto a apoptosis por el ensayo de marcaje de extremos de muescas de dUTP mediado por desoxinucleótido transferasa (TUNEL) usando el Klenow-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA). Las células apoptóticas se tiñeron y visualizaron (tinción marrón) con anticuerpos antidigoxigenina conjugados con peroxidasa. Figura 44a - rata tratada con DMH; Figura 44b - rata tratada con RNasa B1-DMH. Obsérvese que aunque no se observan células positivas para TUNEL en secciones tumorales de ratas tratadas con DMH (Figura 44a), se observa un gran número de células positivas para TUNEL (es decir, apoptóticas) en secciones tumorales de ratas tratadas con RNasa B1-DMH (Figura 44b). Tamaño de la barra = 100 μ m.

Las FIGURAS 45a-d son secciones de histopatología representativas de tumores en ratones desnudos que muestran el efecto proapoptótico de RNasa B1 en el tamaño tumoral y apoptosis en xenoinjertos de cáncer de colon humano. Se inyectaron células cancerosas HT29 ($2,5 \times 10^6$ células/ratón) en la cadera izquierda de ratones desnudos. Los ratones tratados con RNasa B1 (n = 5) recibieron 3 inyecciones intravenosas de 5 mg de RNasa B1 cada 5 días, comenzando 24 horas después de la inyección de células cancerosas (Figura 45b y d). Los ratones de control (n = 5) se dejaron sin tratar (Figuras 45a y c). Se tiñeron secciones de parafina de tumores por Hematoxilina y Eosina (H y E) para evaluación histológica (Figuras 45a-b) y con el kit Klenow-FragE1 (Oncogene, Cambridge, MA, Figuras 45c-d) para apoptosis. Los núcleos vitales y en división activa se tiñen en verde brillante, mientras que los núcleos apoptóticos se tiñen en marrón. Obsérvese el citoplasma y los núcleos condensados (Figura 45b) y la alta proporción de las células apoptóticas (Figura 45d) en los tumores de ratones tratados con RNasa B1, en comparación con la actividad mitótica de apariencia vital normal (Figura 45a) (Figura 45c) en los tumores de controles no tratados.

La FIGURA 46 es una gráfica que ilustra los efectos del Taxol y la RNasa B1 en el volumen relativo de tumores inducidos por LS174T. Se inyectaron s.c. a los ratones desnudos Balb/c nu/nu (Charles River, Wilmington, MA) células cancerosas LS174T y 10-13 días después de la inyección de las células (cuando los tumores eran palpables) los ratones se trataron con inyecciones i.p. de los tratamientos indicados durante 5 días consecutivos de 7 días durante un periodo de 3 semanas. Control: PBS o propilenglicol + etanol; RNasa B1: RNasa B1 50 mg/kg (1000 μ g/inyección); RNasa B1 + Taxol: RNasa B1 50 mg/kg y Taxol 5 mg/kg; Taxol: Taxol 5 mg/kg (100 μ g/inyección). Obsérvese el efecto significativo en el volumen tumoral relativo (VTR) en los ratones tratados con RNasa B1 en comparación con ratones tratados con Taxol, y la inhibición significativa no predicha del crecimiento tumoral en ratones tratados con el tratamiento combinado de RNasa B1 y Taxol.

Las FIGURAS 47a-b son transferencia de Western (Figura 47a) y tinción de proteínas con SDS-PAGE (Figura 47b) de actina y proteínas de unión a actina que ilustran la capacidad de la RNasa B1 para unirse con la actina *in vitro*. Se procesaron actina y proteína de unión a actina en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de

nitrocelulosa. La membrana se incubó con actina y después con anti actina seguido de IgM de cabra anti ratón con jugado con peroxidasa [Kit de Actina (Ab-1), CAT N° CP01-1EA (Oncogene)]. Se detectaron señales usando el sistema de detección ECL (Pierce CAT N° 24080). Carril 1 - RNasa B1, carril 2-Angiogenina, carril 3 - RNasa I de *E. coli* I, carril 4 - actina. Obsérvese la fuerte intensidad de banda en los carriles 1 y 4 que indican la fuerte asociación de la RNasa B1 con la actina.

La FIGURA 48 es una gráfica de barras que ilustra un efecto dependiente de dosis de la RNasa B1 en la inhibición de la liberación de MMP-2 total por células de cáncer de melanoma A375SM. Se cultivaron células A375SM en medio esencial mínimo de Eagle Completo (CMEM) en presencia o ausencia de RNasa B1 1 o 10 μ M y el nivel de MMP-2 en el medio se midió usando ELISA [kit de inmunoensayo de MMP-2 Quantikine (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)] y se expresa como mg de MMP-2/10⁶ células. Obsérvese el efecto inhibidor máximo obtenido en presencia de RNasa B1 10 μ M.

Las FIGURAS 49a-b son citogramas de la actividad Colagenasa de MMP-2 que ilustran el efecto del tratamiento con RNasa B1 en la liberación de MMP-2 en células A375SM (Figura 49a) o HUVEC (Figura 49b). El sobrenadante de células tratadas en presencia o ausencia de diversas concentraciones de RNasa B1 se cargó en geles de SDS que contenían gelatina y después de la electroforesis los geles se trataron con Triton y se tiñeron con Azul de Coomassie. La presencia de actividad Colagenasa de MMP-2 se ve como una banda blanca en el gel azul que refleja la degradación de gelatina por la actividad colagenasa de MMP-2 de 72 kDa. Obsérvese las bandas intensas en células A375SM en ausencia (Figura 49a, control) o presencia de RNasa B1 1 μ M y la reducción significativa en la intensidad de banda después del tratamiento de células A375SM con RNasa B1 5 y 10 μ M (Figura 49a). Obsérvese también la reducción dependiente de dosis en la intensidad de banda del MMP-2 de 72 kDa en presencia de RNasa B1 1 y 10 μ M en células HUVEC (Figura 49b), así como la reducción de la intensidad de banda del MMP-9 (Figura 49b, flecha); sueros que contienen medio CMEM (medio esencial mínimo de Eagle Completo) = control positivo.

Las FIGURAS 50a-t son microfotografías confocales que ilustran la localización celular de RNasa B1 en células HUVEC tratadas con RNasa B1. Las células HUVEC se trataron con RNasa B1 0,4 mg/ml (es decir 10 μ M) y después de 48 horas las células se sometieron a inmunotinción usando los anticuerpos de RNasa B1 y CD31. Se muestran los resultados de focos digitales en serie realizados por la microscopía confocal. Todos los cortes se realizaron en el mismo punto temporal y muestran diferentes áreas en las células tratadas. CD31 = rojo, RNasa B1 = verde. Obsérvese que la RNasa B1 penetra gradualmente en la membrana celular (como se detecta por el marcador rojo de CD31 que se expresa solamente en la membrana de células HUVEC) y entra en la célula.

Las FIGURAS 51a-c son fotomicrografías confocales que ilustran la localización celular de RNasa B1 en células A375SM tratadas con RNasa B1. Las células A375SM se trataron con RNasa B1 0,4 mg/ml (es decir, 10 μ M) y la localización celular de la RNasa B1 se detectó después de 2 (Figura 51a), 4 (Figura 51b) u 8 (Figura 51c) horas usando inmunotinción de RNasa B1 y microscopía confocal. Obsérvese la penetración gradual de RNasa B1 en la membrana celular (Figura 51a, 2 horas), citoplasma celular (Figura 51b, 4 horas) y núcleos celulares (Figura 51c, 8 horas). Obsérvese también el redondeo inducido por RNasa B1 de las células después de 4 horas (Figura 51b) y las características apoptóticas de las células de melanoma A375SM después de 8 horas (Figura 51c).

La FIGURA 52 es una imagen de gel de agarosa que ilustra la amplificación de una RNasa T2 de ADN genómico de *A. niger*. Se sometió ADN genómico preparado a partir de *A. niger* a amplificación por PCR usando los cebadores de PCR degradados directo (5'-TTYTGGAAGCAGGATGGAAY-3', SEC ID Nº: 1, para los aminoácidos F107-N112) e inverso (5'-CCYTTIACRTTAAATARTARTATA-3', SEC ID Nº: 2, para los aminoácidos Y200-K206)] diseñados de acuerdo con los aminoácidos F107-N112 e Y200-K206 hallados idénticos en RNasa B1 y RNasa M de *A. saitoi* (GenBank Nº de referencia P19791, SEC ID Nº: 3). Obsérvese la presencia de un producto de PCR de 400 pb que refleja la secuencia codificante de RNasa T2 de *A. niger*.

La FIGURA 53 es la secuencia de nucleótidos del producto de PCR de 300 pb preparado a partir del ADN genómico de *A. niger* (como en la Figura 52). Obsérvese la fase abierta de lectura de la secuencia de aminoácidos que es idéntica a F107-K206 de RNasa M, excepto que e RNasa B1 E123 (encontrada) reemplaza D123 de RNasa M de *A. saitoi*.

La FIGURA 54 es una ilustración esquemática de la estructura genómica de RNasa extracelular humana (RNasa6PL) localizada en el cromosoma 6q27. Se muestran los límites exón-intrón de los 9 exones (cuadrados negros) con la posición de los exones en la secuencia genómica (números negros) y la longitud de los exones (números rojos). Obsérvese que de 28.751 pb del gen completo, solamente 719 pb (dispuestos en 9 exones) forman la fase abierta de lectura.

Las FIGURAS 55a-b ilustran la presencia de ADNc de RNasa6PL recombinante (Figura 55a) y proteína (Figura 55b) en *P. pastoris*. La secuencia codificante de RNasa6PL se clonó en el vector pPIC9K que se usó para transformar células de levadura. Figura 55a - análisis de PCR del ADNc de inserto clonado. Obsérvese la presencia de un fragmento de 750 pb que indica la presencia del ADNc de RNasa6PL. Figura 55b - análisis de tinción de plata de proteínas de levadura recombinantes. Obsérvese la presencia de una banda proteica de 27 kDa en una de las colonias de levadura (carril 1) y la ausencia de dicha proteína en las otras colonias de levadura que no expresan la proteína recombinante (carriles 2-6). El carril 7 fue un control negativo (una colonia transfectada con un vector sin el inserto de RNasa6PL).

La FIGURA 56 es un análisis de tinción de plata de RNasa6PL recombinante. La proteína recombinante de la colonia de levadura positiva se pasó a través de una columna de Q Sepharose en un Fast FPLC y la proteína eluida se cargó en un SDS-PAGE. Obsérvese la proteína purificada de 27 kDa obtenida (Carril 1). Carril 2: marcadores moleculares proteicos.

Las FIGURAS 57a-b ilustran la termoestabilidad (Figura 57a) y actividad (Figura 57b) de la proteína de RNasa6PL humana recombinante (RNasa T2 de *P. pastoris*). Figura 57a - es un gel de SDS-PAGE de proteínas. Obsérvese la presencia de una banda proteica de 27 kDa (flecha) a diversas temperaturas de 55 a 100 °C. Figura 57b - es una fotografía del ensayo de agarosa de la actividad RNasa de RNasa T2 humana recombinante incubada a temperaturas crecientes. Se aplicaron puntualmente alícuotas de muestra (5 µl) de RNasa T2 recombinante humana de medio de cultivo de *P. pastoris* en una placa que contenía ARN 0,1 % y agarosa 0,8 % en tampón de acetato 20 mM y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se visualizó la actividad RNasa tiñendo con azul de toluidina 0,02 % (p/v) en agua. Obsérvese la persistencia de la actividad RNasa termoestable durante la serie completa de temperaturas de 55-100 °C. La RNasa T2 de *A. niger* (RNasa B1) actuó como un control positivo de la actividad RNasa (C).

La FIGURA 58 es un histograma que demuestra la actividad de inhibición del tubo polínico de lirios de la RNasa T2 humana recombinante. Se complementaron cultivos de polen de anteras de lirio (*L. longiflorum*) con dehiscencia (concentración de proteína final = 1 µM) con RNasa T2 humana recombinante (RNasa6PL), RNasa T2 de *A. niger* (RNasa B1), RNasa T2 humana recombinante inactivada por calor enzimáticamente (EI-RNasa6PL), RNasa T2 de *A. niger* inactivada por calor enzimáticamente (EI-RNasa B1), proteínas de medio de cultivo de levadura transformadas purificadas (plásmido pPIC9K solamente) (proteínas de levadura), y tampón solamente (control). Después de la incubación (2 horas, 25 °C) en la oscuridad, se midió la longitud del tubo polínico (mm) de forma microscópica usando un ocular de microscopio. Obsérvese la inhibición significativa (45 % del control de proteína de levadura) con RNasa T2 humana recombinante (RNasa6PL), que permanece fuertemente activa incluso después de la inactivación por calor de la actividad enzimática RNasa (42 % de la actividad de proteína de levadura, RNasa6PL).

Las FIGURAS 59a-l son microfotografías que muestran el efecto inhibitorio de la RNasa T2 humana en la formación de tubos en células endoteliales de cordón umbilical humano. Se sembraron células del cordón endoteliales de la vena umbilical humana recién aisladas (HUVEC) a una densidad de 14.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con Matrigel™ sin crecimiento en medios complementados en presencia o ausencia de factores de crecimiento [angiogenina (1 µg/ml) o bFGF (1 µg/ml)], y RNasa T2 de *A. niger* (RNasa B1, 10 µg/ml), RNasa T2 humana recombinante (RNasa6PL, 10 µg/ml), medio de cultivo de levadura de control (plásmido pPIC9K solamente, Control de Levadura) o PBS, como se indica en las Figuras. Se evaluó el crecimiento de los tubos, y las placas se fotografiaron después de incubación durante una noche. Se realizaron tres determinaciones individuales para cada tratamiento. Figura 59a - control (sin factores de crecimiento y RNasa); Figura 59b - angiogenina; Figura 59c - RNasa B1; Figura 59d - Angiogenina + RNasa B1; Figura 59e - RNasa6PL; Figura 59f - Angiogenina + RNasa6PL; Figura 59g - control de levadura; Figura 59h - Angiogenina + control de levadura; Figura 59i - bFGF; Figura 59j - bFGF + RNasa B1; Figura 59k - bFGF + RNasa6PL; Figura 59l - bFGF + control de levadura; Obsérvese la inhibición superior de la formación del tubo endotelial por RNasa T2 humana recombinante (RNasa6PL, Figuras 59f y k), en comparación con RNasa T2 de *A. niger* (RNasa B1, Figuras 59d y j, respectivamente).

La FIGURA 60 es la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos traducida del gen de RNasa6PL sintético usado en la clonación y expresión de RNasa T2 humana.

La FIGURA 61 es un alineamiento de secuencia múltiple ClustalW de nucleasa T2 humana con otros miembros de la familia T2 de diverso origen filogenético.

La FIGURA 62 es un alineamiento de BLAST de la secuencia de aminoácidos de la RNasa6PL sintética (SEC ID N°: 4), como en la Figura 60, con la secuencia de aminoácidos de los miembros de la familia de RNasa T2 que tienen la homología más cercana a RNasa6PL humana.

Las FIGURAS 63a-o son microfotografías que muestran el efecto inhibitorio de la RNasa T2 humana en la formación de tubos en células endoteliales del cordón umbilical humano. Se sembraron células del cordón endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) recién aisladas a una densidad de 14.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos recubierta con Matrigel™ sin crecimiento en medios que contenían FCS y ECGF, complementados con factores de crecimiento adicionales [angiogenina 1 µg/ml (FIGURAS 63a-e), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (FIGURAS 63f-j) o VEGF recombinante (FIGURAS 63k-o)], y RNasa T2 humana recombinante (RNasa6PL, 10 µg/ml) o PBS, como se indica en las figuras. Se evaluó el crecimiento del tubo, y se fotografiaron las placas de incubación durante una noche. Se realizaron tres determinaciones individuales para cada tratamiento. FIGURAS 63a, f y k -control (con factores de crecimiento adicionales, sin RNasa6PL); FIGURAS 63b, g y l - factores de crecimiento adicionales y RNasa 6PL 0,5 µM; FIGURAS 63c, h y m - factores de crecimiento adicionales y RNasa 6PL 1,0 µM; RNasa B1; FIGURAS 63d, i y n - factores de crecimiento adicionales y RNasa 6PL 5 µM; FIGURAS 63e, j y o - factores de crecimiento adicionales y RNasa 6PL 10 µM. Obsérvese la inhibición superior de la formación de tubo endotelial por RNasa T2 humana recombinante (FIGURAS 63b-e, g-j y l-o) en presencia de factores proangiogénicos, a todas las concentraciones ensayadas.

La FIGURA 64 es una gráfica que ilustra los efectos del Taxol y la RNasa T2 humana en el volumen de tumores inducidos por LS174T. Se inyectó s.c. a ratones desnudos CD-1 nu/nu (Charles River, Wilmington, MA) células cancerosas LS174T y dos semanas después de la inyección celular (cuando los tumores eran palpables, 80-100 mm³; 10-13 días después de la implantación) los ratones se trataron con inyecciones de RNasa 6PL i.p. y/o Taxol i.v. de los tratamientos indicados durante un periodo de 3 a 4 semanas, según se indica. RNasa 6PL: RNasa 6PL 0,5 mg/kg (10 µg/ratón en 100 µl); Taxol: Taxol 25 mg/kg (500 µg/ratón en 100 µl). Los regímenes de tratamiento fueron: 6PL (cuadros rojos); RNasa 6PL solamente 2qX12; 6PL-PBS-6PL (cuadros azules); RNasa

6PL 2qX4, PBS 2qX3, RNasa 6PL 2qX5; 6PL-Tax-6PL (cuadrados púrpura): RNasa 6PL 2qX4, Taxol 2qX3, RNasa 6PL 2qX5; PBS-Tax-PBS (triángulos verdes): PBS 2qX4, Taxol 2qX3, PBS 2qX5; PBS (rombos abiertos): PBS 2qX12. Obsérvese el efecto significativo en el volumen tumoral (expresado en mm³) en los ratones tratados con RNasa 6PL en comparación con los ratones no tratados, y la inhibición sinérgica no predicha del crecimiento tumoral en ratones tratados con el tratamiento combinado de RNasa 6PL y Taxol.

Las FIGURAS 65 a-d es una microfotografía que muestra el efecto de la RNasa B1 de *A. niger* en la distribución de orgánulos en tubos polínicos de lirios cultivados *in vitro*. Se germinaron granos de polen de *L. longiflorum* cv Osnat como en la FIGURAS 9a y b anteriormente en el presente documento, se expusieron a RNasa B1 de *A. niger* 1 µM durante 2 horas en la oscuridad (FIGURAS 65a y 65c) y se tiñeron con yodo (IKI) con respecto a amiloplastos (FIGURAS 65a y 65b) o DiOC₆ con respecto a mitocondrias (FIGURAS 65c y 65d). Los controles no recibieron RNasa B1. Obsérvese la acumulación de orgánulos hacia el extremo de la punta del tubo polínico en el polen tratado con RNasa (FIGURAS 65a y 65c). Barra de escala = 10 µm.

Las FIGURAS 66a y b son ensayos de SDS-PAGE y transferencia por ranuras que ilustran la actividad de unión a actina de la RNasa6PL humana. La Figura 66a muestra una separación en gel de SDS-Tricina del complejo de RNasa6PL humana con G-actina (después de una incubación de 30 minutos y reticulación). El carril 1 es marcadores de tamaño de PM, el carril 2 es actina (PM 42 kDa), el carril 3 es RNasa6PL humana (PM 27-30 kDa), y el carril 4 es el complejo de RNasa 6PL-actina. Obsérvese los complejos de alto peso molecular de RNasa 6PL-actina en el carril 4, que indican la alta avidez de la unión con actina de RNasa 6PL. La Figura 66b muestra una transferencia por ranuras de RNasa 6PL humana, RNasa B1 y G-actina (control positivo) en nitrocelulosa, después de la incubación con G-actina 5 µg/ml y detección con mAb anti actina, visualizada por quimioluminiscencia con un anticuerpo secundario anti IgM conjugado con HRP (Sigma Chemicals, St Louis MO). Obsérvese la detección de actina en las ranuras tanto de RNasa 6PL como de RNasa B1.

Las FIGURAS 67a y b ilustran la purificación de RNasa 6PL por cromatografía de afinidad en Concanavalina A. La Figura 67a es una gráfica que muestra la distribución de proteína (D.O 280 nm, cuadrados rellenos) y la actividad catalítica RNasa (triángulos rellenos) en las fracciones eluidas con α-manopiranosido 0,5 M de la columna de Sepharose ConA, después de la unión de Sepharose ConA y RNasa 6PL. Se recogieron las fracciones 48 a 61. La Figura 67b es una separación de SDS-PAGE al 12,5 % de las proteínas en las fracciones agrupadas (carril 3) y el sobrenadante no unido (carril 2) de la columna de Sepharose ConA. El carril 1 es de marcadores de peso molecular.

La FIGURA 68 es un histograma que ilustra el efecto de la RNasa T2 de diverso origen en la clonogenicidad de células cancerosas humanas. Se incubaron células cancerosas de colon humano (HT-29) 48 horas con y/o sin RNasa B1 de *A. niger* 10⁻⁶ M, RNasa 6PL humana o RNasa I de *E. coli*. Se preincubaron células de control 48 horas en medio de cultivo sin RNasa T2. Después todas las células se tripsinizaron e incubaron con el mismo medio de cultivo en placas de microtitulación de 96 pocillos para colonización. La clonogenicidad se ensayó a 1000 células/pocillo, además en presencia o ausencia de RNasa 1 µM durante 5 días. Se puntuaron los pocillos individuales con respecto a generación de colonias. Se realizaron seis determinaciones para cada línea celular. Obsérvese la fuerte inhibición de la formación de clones por RNasa T2 bacteriana, de levadura y humana.

Las FIGURAS 69a y b son histogramas que ilustran la inhibición eficaz del crecimiento tumoral de Cáncer de Colon Humano por RNasa T2 de diverso origen. Se inyectaron a ratones desnudos CD-1 nu/nu (Charles River, Wilmington, MA) por vía subcutánea células cancerosas LS174T. Después de la implantación de las células cancerosas, cuando los tumores fueron palpables (después de aproximadamente 14 días), se inyectó a los ratones i.p. PBS o RNasa B de *A. niger* (Figura 69a) o RNasa T2 6PL humana (Figura 69b) (0,5 mg/kg en 100 µl) cada dos días. El volumen tumoral se controló tres veces por semana. Los ratones se sacrificaron a los 30-42 días, y se evaluaron los tumores. Se calcula el volumen tumoral relativo en relación con tumores en el tratamiento inicial. Obsérvese el efecto significativo en el volumen tumoral relativo (expresado en mm³) en los ratones tratados con RNasa T2 en comparación con los ratones no tratados.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación es de una RNasa T2 humana recombinante clonada que tiene actividad de unión a actina y de nuevos métodos para la purificación de RNasa T2. Además, la presente invención enseña el uso de una RNasa T2 humana o un polinucleótido que la codifica para inhibir el crecimiento y proliferación de tumores sólidos y modular la movilidad celular, de este modo previniendo, inhibiendo y/o invirtiendo la proliferación, colonización, diferenciación, desarrollo de células con proliferación anómala, inflamación y/o infección en un sujeto. La presente invención enseña además composiciones farmacéuticas que contienen, como un principio activo, una ribonucleasa humana recombinante de la familia T2 que tiene actividad de unión a actina o un polinucleótido que la codifica.

El uso de ribonucleasas con actividad citotóxica para inhibir la proliferación de células tumorales no es nuevo y se ha demostrado previamente en la técnica. Se ha mostrado que una ribonucleasa en la familia A que se conoce comercialmente como ONCONASA inhibe la proliferación celular en tejido tumoral en ensayos clínicos. También se ha demostrado que varias otras RNasas de la superfamilia de RNasa A tienen actividad citotóxica además de su actividad ribonucleolítica. Se ha mostrado que la toxicidad de la onconasa y otras variantes de RNasa A citotóxica dependen de su capacidad para evadir la proteína inhibidora de ribonucleasa citosólica (RI) y degradar el ARN celular (Haigis *et al.*, Nuc Acid Res 2003; 31: 1024-33).

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

Las ribonucleasas de la familia T2 se caracterizan por sus características moleculares únicas. Una comparación entre los miembros de RNasa de las familias A y T2 se resume a continuación en la Tabla 2 (la localización de aminoácidos está después de RNasa A y RNasa T2 en las familias A y T2, respectivamente).

TABLA 2

Característica	RNasa A	RNasa T2
Masa molecular	11-14 kDa (con la excepción de RNasa BS)	36 kDa.
Temperatura óptima para la actividad RNasa:	37 °C	50-60 °C
pH óptimo para la actividad RNasa:	6,5-8	3,5-5
Glucosilación:	No glucosilado	12-25 % de la masa molecular total.
Especificidad de base:	Específico de bases pirimidínicas.	No específico con preferencia por ácido adenílico.
Enlaces disulfuro:	<u>Cuatro:</u> Común: Cys28-84, Cys40-96, Cys58-110. En RNasas pancreáticas el cuarto enlace S-S está localizado entre Cys65-72, formando un bucle que contiene Glu69 y Asn71, que son parte del sitio de unión de nucleótidos. En la ONCONASA y la lectina de rana toro Cys87-Cys104 forman un bucle COOH terminal, que se localiza cerca del sitio activo. Las angiogeninas tienen solamente 3 enlaces disulfuro.	<u>Cinco:</u> Cys3-20, Cys10-53, Cys19-120, Cys63-112 y Cys182-213.
Mecanismo de la actividad RNasa:	<u>Sitio activo</u> <u>Dos etapas en la escisión de ARN</u> (i) His12 actúa como una base general y retira un protón del grupo de 2'-hidroxilo del ARN. His119 actúa como un ácido general, donando un protón del O 5' del nucleótido saliente. (ii) Los nucleótidos 2'3'-cíclicos resultantes se hidrolizan, invirtiéndose los papeles de His12 e His119. Lys41 estabiliza el estado de transición pentavalente. <u>Sitios de unión al sustrato:</u> Gln11 y Phe120 forman enlaces de hidrógeno con el sustrato. EN ONCONASA y lectina de rana toro Glu11 forma un enlace H con el fosfato del sustrato. Gln96, Asn71, Glu111 de los que Asn71 es el más conservado, podrían catalizar la escisión del ARN.	<u>Sitio activo</u> La catálisis de ARN es similar a la de RNasa A. His46 e His109 actúan como catalizadores de ácido y base generales. Glu105 y Lys108 podrían desempeñar un papel en la polarización del enlace P=O del sustrato o en la estabilización del estado de transición pentavalente. <u>Sitios de unión a sustrato:</u> His104 (En plantas es Tyr o Asp) podría actuar como el receptor de fosfato del sustrato. Hay dos sitios de reconocimiento: el sitio principal (B1) contiene Tyr57, Trp49 y Asp51. Asp51 es responsable del reconocimiento de la base adenina. Un sitio menor (B2) contiene Phe101, Gln95, Asn94, Ser93, Pro92 y Gln32.

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

Como se ha descubierto por los inventores de la presente invención y como se detalla adicionalmente posteriormente en el presente documento en los Ejemplos 1, 2, 6, 16 y 20, la RNasa B1 y RNasa6PL humana, de la familia de ribonucleasa T2, bien ribonucleolíticamente activa o bien ribonucleolíticamente no activa, se unen específicamente con actina en tubos polínicos en elongación para inhibir de este modo la elongación de los tubos polínicos y también con la actina de células de mamífero.

Se sabe que la actina forma filamentos que son componentes citoesqueléticos esenciales de las células, activos tanto en el mantenimiento de la estructura celular como en el soporte del transporte intracelular de orgánulos. Como resultado, los filamentos de actina son cruciales para muchos procesos celulares durante el ciclo de vida de células normales y anómalas, incluyendo la movilidad, proliferación, colonización, diferenciación, transformación y supervivencia de una diversidad de células de origen mesodérmico, neuroectodérmico, ectodérmico y/o endodérmico, incluyendo fibroblastos, células del sistema inmunitario, células del sistema nervioso, células de músculo cardíaco, células de músculo esquelético, células endoteliales vasculares, células endoteliales del músculo liso vascular y células implicadas en la reparación de lesiones tisulares y otros aspectos del desarrollo incluyendo formación de tejidos. Numerosos estudios han mostrado que la actina también participa en diversos procesos celulares que controlan la generación de células cancerosas (Jordan, M. A. y Wilson, L. 1998. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 123-130; Jammy, P. A. y Chaponnier, C. 1995. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 111-117; Sigmond, S. H. 1996. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 66-73; Tapon, N. *et al.* 1997. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 86-92). Por lo tanto, por ejemplo, los filamentos de actina participan en la proliferación de células anómalas (Assoian, R. K. y Zhu, X. 1997. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 93-98). Se han descubierto células malignas más sensibles a la citocalasina B que las células normales (Hemstreet G. P. *et al.* 1996. *J. Cell Biochem.* 25S: 197-204).

Ya que la actina es una proteína altamente conservada, que mantiene un alto nivel de homología entre organismos distantes en la evolución se ha planteado la hipótesis de que la actividad de unión a actina de la RNasa B1, que inhibe la elongación de los tubos polínicos puede utilizarse, sin limitación por esta teoría, para unirse específicamente a actina de células de mamífero, para inhibir de este modo la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de las mismas.

Al reducir la presente invención a la práctica y como se describe adicionalmente en el Ejemplo 2 y 5 de la sección de Ejemplos, la RNasa B1 exógena se une específicamente con actina de membrana y provoca un trastorno de la red de actina celular. Como se muestra en los Ejemplos 3-5, se ha investigado adicionalmente el efecto de la RNasa B1 y la RNasa6PL en células cancerosas de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Como se demuestra claramente en los mismos, la RNasa B1 (i) reduce sustancialmente el crecimiento, proliferación y/o colonización de células de adenocarcinoma que han crecido en cultivo; y (ii) reduce el número de focos de criptas aberrantes (ACF), reduce el número y tamaño de los tumores, interfiere con la angiogénesis tumoral, reduce la malignidad de tumores y la transición de adenoma a adenocarcinoma en un modelo de rata de carcinoma de colon, de una manera preventiva y/o terapéutica, mientras que no tiene ningún efecto secundario aparente en el tejido sano en el colon o en otra parte. Se ha descubierto que la RNasa6PL humana tiene termoestabilidad similar (Figura 57), y ha mostrado una actividad similar en la inhibición de la formación de tubos polínicos (Figura 58) y la angiogénesis de células HUVE (Figura 59) sola, y en presencia de diversos factores proangiogénicos (Figura 63). Además, se ha mostrado que la RNasa6PL humana, como la RNasa B1, conserva la actividad de unión a actina, inhibidora de tubos polínicos y antiangiogénica incluso después de la inactivación de la actividad ribonucleolítica (Figura 58).

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o se puede practicar o llevar a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es para el fin de describir y no debería interpretarse como limitante. Además, debe entenderse que la presente invención no se ciñe a, o se limita por, ninguna teoría o hipótesis que se indique en el presente documento.

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

El gen de RNasa6PL ha sido un gen candidato a supresor de tumores y metástasis desde el descubrimiento de la correlación entre las mutaciones en la región cromosómica 6q27 y la mayor incidencia de cánceres (tales como cáncer ovárico espontáneo) en sujeto humanos. Varios estudios han indicado la clonación del gen de RNasa6PL, y la transfección en células de una diversidad de líneas celulares cancerosas (véase Acquati, *et al.*, *Oncogene* 2001; 22: 980-88, Liu *et al.*, *BMC Genet.* 2002; 3: 20; y Liu *et al.*, *Oncogene*, 2002; 21:387-99). Sin embargo, la expresión heteróloga del gen de RNasa6PL humana, sin aislamiento de una proteína recombinante, ha producido resultados conflictivos, controvertidos. Aunque Acquati *et al.* (*Oncogene* 2001; 22: 980-88) indicó supresión de la tumorigenicidad en células tumorales ováricas e inducción de senescencia en una línea celular inmortalizada por

RNasa6PL transfectada, no se observó supresión del crecimiento de células de cáncer ovárico con transfección de RNasa6PL por Liu *et al* (Oncogene, 2002; 21:387-99). Por lo tanto, Liu *et al* concluyeron que “Los ensayos clonogénicos proporcionan... apoyo a la idea de que es poco probable que este gen sea un gen supresor de tumores potencial”.

Al reducir la presente invención a la práctica, los inventores han clonado, por primera vez, una secuencia codificante de proteína del gen de RNasa6PL humana que comprende una fase abierta de lectura de 719 pb del gen *RNasa6PL*, y han tenido éxito en la expresión de un sistema de expresión heterólogo (*P. pastoris*), el polipéptido codificado por la secuencia codificante de RNasa6PL. El polipéptido expresado, que tiene el peso molecular esperado, se secretó al medio de cultivo, se aisló y se purificó del mismo en un proceso de purificación nuevo. Por lo tanto, los presentes inventores, por primera vez, han clonado, expresado y purificado RNasa6PL humana recombinante, un miembro nuevo de la familia de RNasa T2 (Ejemplo 19). La RNasa6PL humana purificada mostró actividad y termoestabilidad muy similares a las de la RNasa B1 (Ejemplo 20). También muestra un pH (4-5) y temperatura (50 °C) óptimos similares. Por lo tanto, la RNasa6PL humana, un miembro de la familia T2 de RNasas, puede usarse en aplicaciones terapéuticas y clínicas de forma similar a otras RNasas T2 que tienen actividad de unión a actina, sin embargo, sin las desventajas de otras RNasas T2 ajenas.

La comparación del polipéptido de RNasa6PL codificado por la secuencia codificante de RNasa6PL clonada con la secuencia de aminoácidos de las proteínas de RNasa T2 de otras diversas especies, reveló una arquitectura similar pero homología de secuencia variante con muchas de las otras RNasas T2 (Figuras 60-62). La homología más cercana se encontró con la proteína de RNasa T2 de *Mus musculus*, Blast 82 % GeneBank (Figura 62).

Como se usa en el presente documento, el término homología se define como la identidad y similitud de secuencia combinada, entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

Al reducir la presente invención a la práctica, los inventores han revelado una actividad de unión a actina previamente no desvelada de miembros de la familia de RNasa T2, separada e independiente de la actividad catalítica ribonucleolítica de las proteínas (véase Ejemplo 6 y Figura 31, posteriormente en el presente documento). La actividad de unión a actina de la RNasa T2 se ha cuantificado *in vitro* (véase Ejemplo 3, Figura 11 posteriormente en el presente documento), y se ha localizado en la superficie celular en diversos modelos de crecimiento, movilidad y proliferación celular (véase Ejemplo 3, Figuras 12a-12c, y Ejemplo 5, Figuras 29 y 30 posteriormente en el presente documento). Además, la actividad de unión a actina de RNasa T2 se correlaciona con la alteración de la organización de los filamentos de actina en protrusiones celulares, y fuerte inhibición del crecimiento del tubo (véase Ejemplo 3, Figuras 9a y 9b, y Ejemplo 5, Figuras 28a y 28b posteriormente en el presente documento) y la angiogénesis (véase Ejemplo 4, Figuras 24a-24c y 26c posteriormente en el presente documento). Resultados adicionales revelaron que la actividad de unión a actina de RNasa T2, alteración de las protrusiones celulares e inhibición de la movilidad se correlacionan adicionalmente con una inhibición significativa del crecimiento tumoral (véase Ejemplos 4, Figuras 22-24 posteriormente en el presente documento) y prevención de tumores malignos (véase Ejemplo 4, Figura 26 posteriormente en el presente documento) en tumores tanto de nueva proliferación como establecidos, bien desarrollados. Los análisis microhistopatológicos y basados en ADN (TUNEL) de los tumores tratados con RNasa T2 han revelado un efecto proapoptótico fuerte de la RNasa T2 que tiene una actividad de unión a actina, asociada con la inhibición del crecimiento, proliferación y crecimiento metastásico del tumor, y reducción del volumen tumoral (véase Ejemplo 14, Figuras 43a-43b, 44a-44b y 45a-45b posteriormente en el presente documento). Como se ha detallado en la sección de Antecedentes anteriormente en el presente documento, el ensamblaje y desensamblaje dinámico de los filamentos de actina en la superficie celular está altamente regulado y es crítico para todos los aspectos de la movilidad, crecimiento y desarrollo celular de células tanto normales como anómalas.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala en un sujeto. El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se efectúa administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de ribonucleasa de la familia T2, teniendo dicha proteína de ribonucleasa una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* dicha proteína de ribonucleasa de la familia T2, bien por sí solo o como un principio activo de una composición farmacéutica.

En una realización, la proteína de ribonucleasa es una proteína de ribonucleasa humana de la familia T2. En una realización preferida, la proteína de ribonucleasa es al menos 85 %, preferentemente 88 %, más preferentemente 90 %, aún más preferentemente 93 %, aún más preferentemente 95 %, aún más preferentemente 98 % y más preferentemente 100 % homóloga de SEC ID N°: 4. En una realización preferida adicional, la proteína de ribonucleasa es como se expone en SEC ID N°: 4.

Al reducir la presente invención a la práctica, se ha descubierto, por primera vez, que la exposición de células de proliferación anómala, tales como tumores, xenoinjertos y metástasis (véase Ejemplo 10 y 14 y Figuras 43-45) a una ribonucleasa de la familia T2, potenció los procesos apoptóticos en las células. Los efectos proapoptóticos de la RNasa T2 se correlacionaron con la supresión del crecimiento y proliferación tumorales y metastásicos vistos en los Ejemplos 10 y 14. Se apreciará que las enfermedades asociadas con la inhibición de la apoptosis incluyen las

enfermedades en las que se produce una acumulación excesiva de células (enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunitarias).

En tumores tanto sólidos como hematológicos, las células malignas muestran una respuesta anómala a inductores de apoptosis (Watson AJM. 1995. *Gut* 37: 165-167; Burch W. *et al.* 1992. *Trends Pharmacol Sci* 13: 245-251). En estas enfermedades los genes reguladores del ciclo tales como *p53*, *ras*, *c-myc* y *bcl-2* padecen mutaciones, inactivación o desregulaciones asociadas con degeneración maligna (Merritt AJ *et al.* 1994. *Cancer Res* 54: 614-617; Iwadata Y *et al.* 1996. *Int J Cancer* 69: 236-240; Müllauer L *et al.* 1996. *Hepatology* 23: 840-847; Newcomb EW. 1995. *Leuk Lymphoma* 17: 211-221). Se considera que la expresión de *bcl-2* es un factor predictivo para peor pronóstico en cáncer de próstata y colónico y en neuroblastoma (Thompson CB. 1995. *Science* 267: 1456-1462). Se ha mostrado que varias terapias antineoplásicas inducen apoptosis en células tumorales (para revisiones véase: Sun SY *et al.* 2004. *J Natl Cancer Inst.* 96: 662-672; Schulze-Bergkamen H y Krammer PH. 2004. *Semin Oncol.* 31: 90-119; Abend M. 2003. *Int J Radiat Biol.* 79: 927-941).

Los defectos en la apoptosis pueden conducir a enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso (Carson DA. y Rebeiro JM. 1993. *Lancet.* 341: 1251-1254. Aringer M. *et al.* 1994. *Arthritis Rheum.* 37: 1423-1430), artritis reumatoide (Liu H. y Pope RM. 2003. *Curr Opin Pharmacol.* 3: 317-22) y miastenia grave (Masunnaga A. *et al.* 1994. *Immunol Lett.* 39: 169-172). También se ha mostrado que los patógenos, tales como adenovirus, VEB, viruela vacuna y clamidia (Thompson CB. 1995. *Science* 267: 1456-1462; Marshall WL. *et al.* 1999. *J Virol.* 73: 5181-5185; Deveraux QL, *et al.* 1999. *J Clin Immunol.* 19: 388-98, Fan T. *et al.* 1998. *J Exp Med.* 187: 487-496) interfieren con la apoptosis celular. En enfermedades cutáneas hiperproliferativas inflamatorias crónicas tales como psoriasis, una tasa anormalmente baja de apoptosis contribuye a desarrollo de hiperplasia epidérmica. Se sabe que los queratinocitos responden a una diversidad de factores de crecimiento externos e internos, incluyendo algunas citocinas proinflamatorias que pueden suprimir la apoptosis de queratinocitos, tales como IL-15 (Ruckert R. *et al.* 2000. *J Immunol.* 165: 2240-2250).

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para potenciar la apoptosis de una célula, comprendiendo el método proporcionar a la célula una concentración eficaz de una proteína de ribonucleasa de la familia T2, teniendo dicha proteína de ribonucleasa una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* dicha proteína de ribonucleasa de la familia T2, potenciando de este modo la apoptosis. La potenciación de la apoptosis de una célula por el método de la presente divulgación puede aplicarse de forma clínica, en el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas con la apoptosis, tales como las enfermedades neoplásicas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades hiperproliferativas y enfermedades infecciosas descritas anteriormente en el presente documento. La administración de una ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2 para potenciar la apoptosis en células de un sujeto que lo necesite puede efectuarse por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La detección de apoptosis potenciada, y el control de cambios en el nivel de apoptosis en células o tejidos o muestras tisulares después de la exposición a RNasa T2, puede efectuarse por medios citológicos, patológicos y bioquímicos (por ejemplo, el ensayo TUNEL descrito posteriormente en el presente documento) conocidos en la técnica, como se describe posteriormente en el presente documento. La ribonucleasa de la familia T2 que tiene una actividad de unión a actina puede ser una RNasa T2 recombinante, expresada en un sistema de expresión heterólogo. Mientras que se ha mostrado que el carácter de unión a actina y terapéutico de las ribonucleasas de la familia T2 que tienen actividad de unión a actina es separado e independiente de la actividad ribonucleolítica, en una realización la RNasa T2 está desprovista de actividad ribonucleolítica. La cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2 puede administrarse a las células objeto que lo necesiten, bien por sí solas o como un principio activo de una composición farmacéutica.

Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para preparar un medicamento útil en la prevención, inhibición y/o inversión de la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala que comprende la etapa de combinar una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que tiene y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, se proporciona un método para preparar un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección caracterizada por movilidad celular excesiva y/o acumulación anómala de células. El método se efectúa combinando una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al

menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Se identifica preferentemente que el medicamento proporciona un tratamiento para un trastorno o enfermedad proliferativo específico, tal como un cáncer específico. Dicha identificación puede realizarse de forma impresa, por ejemplo, en un recipiente que contiene el medicamento o en un folleto, como se conoce bien en la técnica.

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

- 15 La RNasa T2 puede derivar de una fuente nativa, como se ejemplifica adicionalmente en el Ejemplo 1 a continuación o, como alternativa puede producirse como una proteína recombinante usando un polinucleótido apropiado (véase Tabla 3 posteriormente y las siguientes descripciones) y sistema de expresión, como se detalla en el Ejemplo 19. La expresión y purificación de proteínas recombinantes se conoce bien en la técnica y puede efectuarse por una cualquiera de una pluralidad de técnicas alternativas descritas en detalle en uno cualquiera de varios libros de texto y libros de protocolos de laboratorio, incluyendo, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998).

TABLA 3

Fuente	Nombre (Prot)	Nombre (Gen)	Referencia o referencias	Nº de referencia de GeneBank
<i>Bacterias</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>		Locus RNI Favre, D. <i>et al.</i> 1993. J. Bacteriol. 175: 3710-3722.	Q07465
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Rnasa HI0526	Locus RN26 Fleischmann, R. D., <i>et al.</i> 1995. Science 269: 496-512.	P44012
	<i>Escherichia coli</i>	Rnasa I	Locus RNI Meador, J. III. y Kennell, D. 1990. Gene 95: 1-7. Oshima, T., <i>et al.</i> 1996. DNA Res. 3: 137-155. Henikoff, S. y Henikoff, J. G. 1994. Genomics 19: 97-107.	P21338
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Rnasa T2	rnt B Kawata Y. <i>et al.</i> 1988. Eur J. Biochem 176(3): 683-97. Kawata Y. <i>et al.</i> 1990. Eur J. Biochem 187: 255-62. Ozeki K, <i>et al.</i> 1991. Curr Genet. 19: 367-73.	P10281

Fuente		Nombre (Prot)	Nombre (Gen)	Referencia o referencias	Nº de referencia de GeneBank
Hongos	<i>Rhizopus niveus</i>	Rnasa Rh		Horiuchi, H. <i>et al.</i> 1988. J. Biochem. 103: 408-418. Kurihara, H. <i>et al.</i> 1992. FEBS Lett. 306: 189-192. Kurihara, H. <i>et al.</i> 1996. J. Mol. Biol. 255: 310-320. Ohgi, K. <i>et al.</i> 1991. J. Biochem. 109: 776-785.	P08056
	<i>Trichoderma viride</i>	Rnasa Trv		Inada, Y. <i>et al.</i> 1991. J. Biochem. 110 (6), 896-904.	P24657
	<i>Lentinula edodes</i> (hongo shiitake)	Rnasa Irp		Kobayashi, H. <i>et al.</i> 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 2003-2010.	AAB24971
	<i>L. edodes</i>	Rnasa Le2		Kobayashi, H. <i>et al.</i> 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 2003-2010. Shimada, H. <i>et al.</i> 1991. Agaric. Biol. Chem. 55: 1167-1169.	P81296
	<i>Irpex lacteus</i>	Rnasa Irpl		Watanabe, H., <i>et al.</i> 1995. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 2097-2103.	AAB35880
	<i>Physarum polycephalum</i>	Rnasa Phyb		Inokuchi, N. <i>et al.</i> 1993. J. Biochem. 113: 425-432.	P81477
Plantas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNS2	Locus RNS2	Green, P. J. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5118-5122.	P42814
	<i>A. thaliana</i>	Rnasa 3	Locus RNS3	Bariola, P. A., <i>et al.</i> 1994. Plant J. 6: 673-685.	P42815
	<i>A. thaliana</i>	Rnasa 1	Locus RNS1	Bariola, P. A., <i>et al.</i> 1994. Plant J. 6: 673-685.	P42813
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate cultivado)	Rnasa LE	RNALE	Kock, M. <i>et al.</i> 1995. Plant Mol. Biol. 27: 477-485. Jost, W. <i>et al.</i> 1991. Eur. J. Biochem. 198: 1-6.	P80022
	<i>L. esculentum</i>	Rnasa LX	RNLX	Kock, M., <i>et al.</i> 1995. Plant Mol. Biol. 27: 477-485. Löffler, A., <i>et al.</i> 1993. Eur. J. Biochem. 214: 627-633.	P80196
	<i>Nicotiana glauca</i> (tabaco)	S-Rnasa	S	Anderson, M. A., <i>et al.</i> 1986. Nature 321: 38-44. Matton, D. P. <i>et al.</i> 1995. Plant Mol. Biol. 28: 847-858. McClure, B. A. <i>et al.</i> 1989. Nature 342: 95-97.	P04002

Fuente		Nombre (Prot)	Nombre (Gen)	Referencia o referencias	Nº de referencia de GeneBank
	<i>Malus domestica</i> (manzano)	S-Rnasas	S	Sassa, H., <i>et al.</i> 1996. Mol. Gen. Genet. 250: 547-557.	
	<i>Pyrus pyrifolia</i> (pera Japonesa)	S-Rnasas	S	Norioka, N., <i>et al.</i> 1996. J. Biochem. 120; 335-345.	
	<i>Momordica charantia</i> (melón amargo)	Rnasa MC	Locus RNMC	Blaxter, M. L., <i>et al.</i> 1996. Mol. Biochem. Parasitol. 77: 77-93. Ide, H. <i>et al.</i> 1991. FEBS Lett. 284: 161-164. Ide, H. <i>et al.</i> 1991. FEBS Lett. 289: 126.	P23540
Animales	<i>Gallus gallus</i> (pollo)	Rnasa CL1		Uchida, T. <i>et al.</i> 1996. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 1982-1988.	JC5126
	<i>Rana catesbeiana</i> (rana toro)	Rnasa RCL2		Yagi, H. <i>et al.</i> 1995. Biol. Pharm. Bull. 18: 219-222. Liao, Y. D. <i>et al.</i> 1996. Protein Expr Purif. 7: 194-202. Liao YD, <i>et al.</i> 1994. Eur J Biochem. 222: 215-20. Liao, Y. D. <i>et al.</i> 1998. J. Biol. Chem. 273: 6395-401	PC2347
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Rnasa DM	DmRNasa	Lankenau, D. H. <i>et al.</i> 1990. Chromosoma 99: 111-117. Hime, G., <i>et al.</i> 1995. Gene 158: 203-207.	X15066
	<i>Crassostera gigus</i> (ostra del pacífico)	Rnasa Oy	Locus JX0295	Watanabe, H. <i>et al.</i> 1993. J. Biochem. 114: 800-807.	JX029
	<i>Todarodes pacificus</i> (pota Japonesa)	Rnasa Tp		Kusano, A. <i>et al.</i> 1998. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 87-94.	PMID 9501521
	<i>Homo sapiens</i>	Rnasa 6 precurs.	RNasa6PL	Trubia, M. <i>et al.</i> 1997. Genomics 42: 342-344.	NP003721

Para algunas aplicaciones puede ser beneficioso usar una ribonucleasa que sustancialmente carece de actividad ribonucleolítica, que puede tener o provocar efectos secundarios indeseados. Como se usa en el presente documento la frase “sustancialmente carece de actividad ribonucleolítica” se refiere a (i) una ribonucleasa inactivada (bien natural o bien recombinante) de la familia T2 que tiene 0-10 % de actividad ribonucleolítica en comparación con una ribonucleasa similar, no inactivada; y/o (ii) una ribonucleasa mutante recombinante (aislado natural o inducido por el hombre) de la familia T2 que tiene 0-10 % de actividad ribonucleolítica en comparación con una ribonucleasa similar, no mutante. La inactivación de la actividad ribonucleolítica de la ribonucleasa de la familia T2 puede efectuarse por un proceso seleccionado del grupo que consiste en inactivación por autoclave y desnaturalización o inactivación química.

Como se usa en el presente documento, la expresión “inactivación por autoclave” se define como exposición, en un autoclave, a vapor supercalentado calentado a aproximadamente 121 °C a condiciones de alta presión (por ejemplo, 103,42 kPa), durante al menos 20 minutos. Puede efectuarse desnaturalización química mediante exposición a extremos de pH y agentes químicos que provocan una alteración en las cadenas laterales de aminoácidos y/o la

estructura de enlace químico de la ribonucleasa de la familia T2, tal como yodoacetilación, como se describe en detalle posteriormente en el presente documento (Ejemplo 6).

Como se detalla adicionalmente en los Ejemplos 2, 6 y 20 posteriores, se ha mostrado por los inventores de la presente invención que la inhibición de la movilidad celular, la inhibición de la apoptosis, las actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo de RNasa B1 y RNasa6PL no dependen de su actividad ribonucleolítica, ya que la RNasa B1 y RNasa6PL hervidas, inactivadas por autoclave e inactivadas químicamente (acetiladas), que tienen poca (10 %) o sustancialmente ninguna (0-10 %) actividad ribonucleolítica conservaron sustancialmente todas sus actividades de unión a actina y antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo. Además, se han presentado pruebas concluyentes con respecto a la disociación de actividades ribonucleolíticas y antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo en RNasa6PL por Acquati *et al* (Int J Oncol. 2005; 26: 1159-68), que recientemente han mostrado que la supresión mediada por RNasa6PL de tumorigénesis y metástasis no se vio afectada por una mutación puntual doble dirigida a los sitios catalíticos de la ribonucleasa.

Por lo tanto, una proteína de RNasa T2 de acuerdo con la presente divulgación puede utilizarse tanto en una forma nativa, ribonucleolítica activa, como, como alternativa, en una forma silenciosa, o ribonucleolítica reprimida, que no tiene (0 %) o tiene poca (hasta el 10 %) actividad ribonucleolítica, pero que conserva sus otras actividades. Como tal, se entiende que la expresión "RNasas T2" abarca todas las formas antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación, antiangiogénicas y/o antidesarrollo de la proteína, independientemente de otras actividades de la misma. Por lo tanto, en una realización, la RNasa T2 de la presente invención está sustancialmente desprovista de actividad ribonucleasa pero tiene una actividad de unión a actina. En una realización preferida la actividad de unión a actina de la RNasa T2 es termoestable. Además, se proporciona un método para inactivar una actividad ribonucleasa, pero manteniendo una actividad de unión a actina de una ribonucleasa de la familia T2. El método se efectúa sometiendo la ribonucleasa a condiciones de desnaturalización suficientes para inactivar sustancialmente la actividad ribonucleasa, pero manteniendo la actividad de unión a actina (tal como las condiciones de desnaturalización descritas anteriormente en el presente documento).

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

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

Al reducir la presente invención a la práctica, se ha descubierto, por primera vez, que muchas ribonucleasas de la familia T2, derivadas de organismos de diversos origen filogenético de bacterias a levaduras (Ejemplo 16, Figura 47a-47b) tienen actividad de unión a actina, que se correlaciona con el carácter terapéutico y de inhibición de la movilidad celular, proliferación de células anómalas y apoptosis. Por lo tanto, una proteína de RNasa T2 también puede aislarse o purificarse por métodos bien conocidos en la técnica a partir de organismos que se sabe que expresan esta proteína. Dichos organismos incluyen, por ejemplo, *Aeromonas hydrophila*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus niveus*, *Trichoderma viride*, *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus*, *Physarum polycephalum*, *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glauca*, *Malus domestica*, *Pyrus pyrifolia*, *Momordica charantia*, *Gallus gallus*, *Rana catesbeiana*, *Drosophila melanogaster*, *Crassostrea gigas*, *Todarodes pacificus* y *Homo sapiens*. Se anticipa, sin embargo, que otros organismos que aún no se conoce que produzcan RNasa T2, una vez descubiertos como tales, también podrían usarse como una fuente para RNasa T2.

Se apreciará que algunos usos terapéuticos y de diagnóstico de las ribonucleasas T2 de la presente invención requerirán RNasas T2 purificadas. Por lo tanto, son ventajosos métodos sencillos, baratos de purificación de RNasas T2. Al reducir la presente invención a la práctica, se ha descubierto que la ribonucleasa recombinante de la familia T2 puede aislarse y purificarse mediante hervor, fraccionamiento por cromatografía en columna (véase Ejemplo 19, Figura 55 posteriormente en el presente documento), y ensayando las fracciones recogidas con respecto a actividad ribonucleolítica. Por lo tanto, también se proporciona un método nuevo para aislar proteína de ribonucleasa T2, comprendiendo el método desnaturalizar por calor una muestra que contiene T2 que comprende células que expresan una proteína de ribonucleasa T2, separando el sobrenadante, preferentemente por centrifugación, fraccionar el sobrenadante, identificar una fracción del sobrenadante que tiene una proteína de ribonucleasa T2 y purificar la fracción de RNasa T2 hasta pureza sustancial. En una realización, el fraccionamiento del sobrenadante se efectúa por cromatografía en columna, por ejemplo, Q SEPHAROSE, columna de Sepharose ConA que los inventores usan en lugar de la Q Sepharose usada en el pasado u otros medios de separación de proteínas bien

conocidos por los expertos habituales en la materia. La identificación de las fracciones que portan RNasa T2 puede realizarse de acuerdo con características físicas (tales como movilidad electroforética) y criterios funcionales (actividad ribonucleolítica, actividad de unión a actina). Se conocen bien en la técnica métodos para la evaluación física y funcional de la RNasa purificada, como se describe posteriormente en el presente documento.

Como alternativa y preferentemente una proteína de RNasa T2 puede producirse de forma recombinante expresando un polinucleótido que la codifica, usando un sistema de vector de expresión apropiado. En una realización, el sistema de expresión es un sistema de expresión heterólogo seleccionado de un sistema de expresión bacteriano, de levadura o de células superiores, en el que los sistemas de expresión de células superiores incluyen sistemas de expresión animales o vegetales. Preferentemente, se selecciona un sistema de expresión que proporciona modificaciones postraduccionales adecuadas. Los sistemas de vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, células de mamífero infectadas con un virus (por ejemplo, adenovirus, retrovirus, virus del herpes simple, virus de viruela aviar); células de insecto infectadas con un virus (por ejemplo, baculovirus); plantas modificadas genéticamente o células vegetales transformadas con un plásmido, un virus vegetal o un *Agrobacterium*; microorganismos transformados tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico. En una realización preferida el sistema de expresión es el plásmido pPIC9K de *P. pastoris* adecuado para la expresión de la RNasa6PL humana, que, como otros miembros de la familia de RNasa T2, es una proteína glucosilada, debido a la glucosilación de proteínas expresadas en las células de *P. pastoris* transformadas. Sin embargo, se apreciará que, como se detalla posteriormente en el presente documento, la RNasa B1 desglucosilada conserva el carácter inhibitorio y de unión a actina. Los elementos de control de la expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificaciones dependiendo del sistema de vector-hospedador utilizado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Una RNasa T2 producida de forma recombinante puede purificarse a partir de células hospedadoras por los métodos descritos posteriormente en el presente documento, o por cromatografía de afinidad, electroforesis, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), inmunoprecipitación, sedimentación o cualquier otro método conocido en la técnica.

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

Un polinucleótido de acuerdo con la presente divulgación puede codificar una proteína de RNasa T2 nativa, cuya expresión en este contexto describe una RNasa T2 que tiene actividades tanto antiproliferativa como ribonucleolítica, o, como alternativa, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede codificar un mutante de RNasa T2 silencioso o reprimido, que no tiene o tiene poca actividad ribonucleolítica, para expresarse (por ejemplo, transcribirse y traducirse) *in vivo* en una proteína que sustancialmente no tiene actividad ribonucleolítica.

Como tal, el término "polinucleótido" cuando se usa en el presente documento en el contexto de RNasas T2 en general, o en el contexto de cualquier RNasa T2 específica, se refiere a cualquier secuencia polinucleotídica que codifique una RNasa T2 activa en la prevención, inhibición y/o inversión de la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala, que tienen o están sustancialmente desprovistas de actividad ribonucleolítica. Pueden obtenerse polinucleótidos que codifican una RNasa T2 desprovista de actividad ribonucleolítica usando técnicas de biología molecular conocidas, tales como mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida y técnicas de evolución potenciada. La mutagénesis dirigida a sitios puede emplearse fácilmente debido a que los restos de aminoácidos esenciales para la actividad ribonucleolítica de RNasas T2 se han reconocido (véase Kusano *et al.*, 1998. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 87-94, y Tabla 3 anterior).

Se apreciará que la regulación aberrante o excesiva o insuficiente de la función de actina y distribución de actina intracelular y movilidad celular puede conducir a funciones celulares alteradas, que a su vez pueden conducir a trastornos celulares (o empeorar trastornos celulares existentes). Como se usa en el presente documento, un "trastorno celular" incluye un trastorno, enfermedad o afección caracterizado por capacidad celular aberrante o insuficiente para moverse o migrar de forma apropiada en respuesta a ciertos estímulos (por ejemplo daño tisular), o incapacidad para regular apropiadamente la función y distribución de actina dentro de la célula.

Al reducir la presente invención a la práctica, se ha mostrado, por primera vez, que la RNasa T2 no solamente inhibe la movilidad celular, el ensamblaje y reensamblaje de filamentos de actina, la formación de tubos y la proliferación celular *in vivo*, sino que también puede inhibir directamente la movilidad e invasividad de células cancerosas, como se mide *in vitro* (Ejemplo 12, Tabla 5). Por lo tanto, las RNasas T2 que tienen actividad de unión a actina de la presente invención, y composiciones que las comprenden, pueden actuar como nuevos agentes terapéuticos para controlar los trastornos celulares relacionados con la movilidad, incluyendo el cáncer (por ejemplo angiogénesis tumoral y metástasis), regulación inmunitaria, enfermedad neurodegenerativa e inflamatoria. Adicionalmente, las RNasas T2 que tienen actividad de unión a actina pueden actuar como nuevos agentes terapéuticos para aliviar ciertos trastornos y afecciones celulares mediante su capacidad para migrar y para regular la respuesta a lesión tisular.

Por lo tanto, de acuerdo con la presente divulgación se proporciona un método para inhibir la movilidad de una célula. El método se efectúa proporcionando a la célula una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2. Además se proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad o afección caracterizada por movilidad celular excesiva en un sujeto que lo necesite. El método se efectúa administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2.

La alteración del ensamblaje y desensamblaje de actina afecta a la movilidad, desarrollo, crecimiento, proliferación y reproducción celular. Por lo tanto, las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse para tratar afecciones, síndromes o enfermedades caracterizados por la acumulación anómala de células. Las enfermedades o afecciones caracterizadas por la acumulación anómala de células incluyen, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Además, las composiciones y métodos de la presente invención pueden usarse para inhibir el ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina en una célula, efectuado proporcionando a la célula una proteína de ribonucleasa de la familia T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la proteína de ribonucleasa de la familia T2.

Por lo tanto, la presente divulgación puede usarse para tratar afecciones, síndromes o enfermedades caracterizados por células de proliferación anómala, tales como células cancerosas u otras, tales como, pero sin limitación, un cáncer maligno o no maligno incluyendo cáncer del tracto biliar; cáncer cerebral; cáncer de mama; cáncer del cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; linfomas; cáncer de pulmón (por ejemplo de células pequeñas y de células no pequeñas); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer ovárico; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer cutáneo; cáncer testicular; cáncer tiroideo; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas, papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt, artritis, artritis reumatoide, retinopatía diabética, angiogénesis, reestenosis, reestenosis en endoprótesis, reestenosis de injerto vascular, vitreorretinopatía proliferativa, enfermedad proliferativa inflamatoria crónica, dermatofibroma y psoriasis.

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

La proteína de RNasa T2 que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4 de la presente divulgación puede usarse en el tratamiento preventivo de un sujeto en riesgo de tener un cáncer. Un “sujeto en riesgo de tener un cáncer” como se usa en el presente documento es un sujeto que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer y sujetos expuestos a agentes cancerígenos tales como tabaco, amianto u otras toxinas químicas, o un sujeto que se ha tratado previamente para cáncer y está en remisión aparente. Cuando un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer se expone a la RNasa T2 de la presente invención, el sujeto puede ser capaz de evitar que cualquier cáncer que se forme se convierta en metastásico.

La RNasa T2 de la presente divulgación también es útil para tratar y/o prevenir trastornos asociados con inflamación en un sujeto. Las células inmunitarias o hematopoyéticas expuestas a RNasas T2 que tienen una actividad de unión a actina tendrían una capacidad reducida para migrar. Por lo tanto, las RNasas T2 que tienen actividad de unión a actina son útiles para prevenir la inflamación asociada con migración de células inmunitarias y para tratar y prevenir trastornos inflamatorios y enfermedades isquémicas.

Los trastornos inflamatorios y enfermedades isquémicas se caracterizan por inflamación asociada con migración de neutrófilos a regiones tisulares locales que se han dañado o tienen migración y activación de neutrófilos inducidas de otro modo. Aunque sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la acumulación excesiva de neutrófilos resultante de la migración de neutrófilos al sitio de lesión, provoca la liberación de factores tóxicos que dañan al tejido circundante. Cuando la enfermedad inflamatoria es un ictus agudo un tejido que con frecuencia se daña por la estimulación de neutrófilos es el cerebro. A medida que se acumulan neutrófilos activos en el cerebro se desarrolla un infarto.

Una "enfermedad o afección inflamatoria" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier afección caracterizada por inflamación local en un sitio de lesión o infección e incluye enfermedades autoinmunitarias, ciertas formas de estados inflamatorios infecciosos, actividad de neutrófilos indeseable, característica de trasplantes de órganos u otros implantes y prácticamente cualquier otra afección caracterizada por acumulación de neutrófilos no deseada en un sitio tisular local. Estas afecciones incluyen pero sin limitación meningitis, edema cerebral, artritis, nefritis, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, pancreatitis, miositis, neuritis, enfermedades de tejido conectivo, flebitis, arteritis, vasculitis, alergia, anafilaxis, erliquiosis, gota, trasplantes de órganos y/o colitis ulcerosa. Una "enfermedad o afección isquémica" como se usa en el presente documento se refiere a una afección caracterizada por inflamación local resultante de la interrupción en el aporte sanguíneo a un tejido debido a un bloqueo o una hemorragia del vaso sanguíneo responsable de proporcionar sangre al tejido tal como se ve para infarto de miocardio o cerebral. Un ataque isquémico cerebral o isquemia cerebral es una forma de afección isquémica en la que se bloquea el aporte sanguíneo al cerebro. Esta interrupción en el aporte sanguíneo al cerebro puede resultar de una diversidad de causas, incluyendo un bloqueo intrínseco u oclusión del vaso sanguíneo en sí mismo, una fuente de oclusión originada de forma remota, presión de perfusión reducida o viscosidad de la sangre aumentada que da como resultado un flujo sanguíneo cerebral inadecuado, o un vaso sanguíneo roto en el espacio subaracnoideo o tejido intracerebral.

En algunos aspectos de la invención la RNasa T2 de la presente divulgación se proporciona en una cantidad eficaz para prevenir la migración de una célula tumoral a través de una barrera. La invasión y metástasis del cáncer es un proceso complejo que implica cambios en las propiedades de adhesión celular que permiten que una célula transformada invada y migre a través de la matriz extracelular (ECM) y adquiera propiedades de crecimiento independiente de anclaje (Liotta, L. A., *et al.*, Cell 1991 64: 327-336). Algunos de estos cambios se producen en adhesiones focales, que son puntos de contacto de célula/ECM que contienen moléculas de señalización asociadas a membrana, citoesqueléticas e intracelulares. La enfermedad metastásica se produce cuando los focos diseminados de células tumorales siembran un tejido que soporta su crecimiento y propagación, y esta propagación secundaria de células tumorales es responsable de la morbilidad y mortalidad asociada con la mayoría de los cánceres. Por lo tanto, el término "metástasis" como se usa en el presente documento se refiere a la invasión y migración de células tumorales lejos del sitio tumoral primario.

La RNasa T2 o el polinucleótido que la codifica de la presente divulgación pueden usarse para ensayar células con respecto a sensibilidad a la inhibición de la movilidad celular, por ejemplo, en el ensayo de su capacidad para cruzar una barrera. Preferentemente se evita que las células tumorales crucen una barrera. La barrera para las células tumorales puede ser una barrera artificial *in vitro* o una barrera natural *in vivo*. Las barreras *in vitro* incluyen pero sin limitación membranas recubiertas de matriz extracelular, tales como Matrigel. Por lo tanto, la RNasa T2 puede proporcionarse a células que después pueden ensayarse con respecto a su capacidad para inhibir la invasión de células tumorales en un sistema de ensayo de invasión de Matrigel como se describe en detalle en Parish, C. R., *et al.*, "A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells" Int. J. Cancer (1992) 52: 378-383. El Matrigel es una membrana basal reconstituida que contiene colágeno de tipo IV, laminina, heparán sulfato, proteoglucanos tales como perlecano, que se unen con y localizan bFGF, vitronectina así como factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), activador de plasminógeno tisular (tPA) y la serpina conocida como inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Otros ensayos *in vitro* e *in vivo* para metástasis se han descrito en la técnica anterior, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.935.850, expedida el 10 de agosto de 1999. Una barrera *in vivo* se refiere a una barrera celular presente en el cuerpo de un sujeto.

Cualquier ribonucleasa de la familia T2 que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID Nº: 4 que tenga las actividades de unión a actina, antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo descritas en el presente documento y ejemplificadas en la sección de Ejemplos a continuación puede usarse como un agente terapéutico de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. De forma similar, cualquier polinucleótido que codifica una ribonucleasa de la familia T2 que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID Nº: 4 que tenga las actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo descritas en el presente documento puede usarse como un agente terapéutico de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Se ha proporcionado una lista no exhaustiva de ribonucleasas de la familia T2 en la Tabla 3, anterior. Como se ejemplifica adicionalmente por los Ejemplos a continuación, la RNasa B1 y RNasa6PL, que son miembros de la familia T2, tienen actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo como se determinó por ensayos *in vivo* e *in vitro*. Además, se ha mostrado que la RNasa B1 y RNasa6PL se unen con actina incluso cuando se tratan para hacer que no tengan actividad ribonucleasa. Por lo tanto, la presente invención proporciona tres ensayos diferentes con los que un experto en la materia podría ensayar una ribonucleasa dada con respecto a sus actividades de unión a actina, antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo, estos son un ensayo *in vitro* para determinar el efecto de la ribonucleasa ensayada en células cancerosas, ensayo *in vivo* para determinar el efecto de la ribonucleasa ensayada en el desarrollo de tumores, y otro ensayo *in vitro* para determinar la capacidad de la ribonucleasa ensayada para unirse con actina celular y/o libre. Sin limitar la presente invención a ninguna teoría, se cree que una capacidad de una ribonucleasa para unirse a actina es indicativa de que dicha ribonucleasa tiene actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo.

Una ribonucleasa de acuerdo con la presente divulgación puede administrarse a un organismo, tal como un ser humano o cualquier otro mamífero, por sí sola, o en una composición farmacéutica en la que se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

- 5 Como se usa en el presente documento, una “composición farmacéutica” o “medicamento” se refiere a una preparación de una o más de las ribonucleasas o polinucleótidos que las codifican como se describe en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- 10 En el presente documento el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
- 15 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos adicionales, tales como, pero sin limitación, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, anestésicos, agentes terapéuticos de cáncer y similares además del principio activo principal. Se presenta posteriormente en el presente documento una descripción detallada de agentes adicionales usados habitualmente adecuados para su uso con las composiciones de la presente invención.
- 20 Pueden prepararse composiciones farmacéuticas de la presente divulgación por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización convencionales.
- 25 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente divulgación pueden formularse por lo tanto usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.
- 30 Al reducir la presente invención a la práctica, se revelaron efectos terapéuticos significativos de la ribonucleasa de la familia T2 que tenía una actividad de unión a actina usando una amplia diversidad de medios de administración, en diversos modelos de proliferación y acumulación de células anómalas. Se descubrió que la administración intraperitoneal, que proporcionaba una captación y distribución sistémica rápida de la RNasa T2, era eficaz en la supresión del crecimiento y desarrollo tumoral en tumores subcutáneos en ratones desnudos (Ejemplos 9 y 13, Figuras 35, 39a-b y 64) y tumores intraperitoneales (Ejemplo 8, Figuras 33a-d). También se descubrió que la administración intravenosa, que proporcionaba una captación sistémica aún más rápida de la RNasa T2, era eficaz en la supresión y el tratamiento de xenoinjertos subcutáneos (Ejemplo 13, Figuras 36a-b), y propagación metastásica remota (pulmonar) de tumores intravenosos (Ejemplo 8, Figuras 34a-e). Se ha descubierto que la administración directa de, y preincubación de células con la RNasa T2 es eficaz en la prevención del crecimiento tumoral en carcinoma de mama (Ejemplo 12, Tabla 6), carcinoma de colon (Ejemplo 12, Tabla 6), melanoma (Ejemplo 12, Figura 38), angiogénesis inducida por factor angiogénico, *in vivo*, y densidad de microvasos (Ejemplo 10, Figura 37) y la formación de tubos celulares en células tanto vegetales (Ejemplo 1, Figuras 8 y 9, Figuras 65a-d) como HUVE humanas (Ejemplo 7, Figuras 32a-h, 59a-1 y 63a-o). Se ha descubierto que la administración oral de RNasa T2 en forma de microcápsulas es eficaz en la reducción del crecimiento tumoral, proliferación, tamaño tumoral, vascularización tumoral y el número de focos de criptas aberrantes (Ejemplo 4, Figuras 23a-33c, 24a-24d y 25a-25c) cuando se administran pronto en la inducción de tumor de colon (modelo DMH). La administración oral similar de RNasa T2 a animales que albergan tumores ya bien desarrollados redujo el grado de vascularización y malignidad de los tumores cancerosos de colon en ratas (Ejemplo 4, Fig. 27c), a pesar de la exposición de la RNasa a procesos digestivos y el supuesto suministro de dosis bajas por vía intrainestinal. Se apreciará que se conocen bien en la técnica métodos de encapsulación que proporcionan liberación intestinal eficaz de composiciones, y se espera que el uso de estas aumente la eficacia de la administración oral de RNasa T2 en casos de tumores ya establecidos.
- 50 Por lo tanto, efectuar la administración de la composición farmacéutica de la presente divulgación incluye un vehículo farmacéutico adecuado y una cantidad eficaz de una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica, y se administra, por ejemplo, por vía tópica, por vía intraocular, por vía parenteral, por vía oral, por vía intranasal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea o por cualquier otro medio eficaz mediante métodos bien conocidos en la técnica.
- 55 Para inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea, puede formularse una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Por ejemplo, una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz de una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica puede administrarse por vía sistémica a la circulación sanguínea para tratar un cáncer o tumor que no puede alcanzarse directamente o aislarse anatómicamente. Una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz
- 60
- 65

de una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica puede inyectarse directamente en un tejido canceroso o tumoral diana por una aguja en cantidades eficaces para tratar las células tumorales del tejido diana.

Para la administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera para permear en la formulación. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica.

Para la administración oral, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse fácilmente combinando una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para su ingesta oral por un paciente. Pueden realizarse preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carboximetilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

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

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

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

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

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

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

La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse para administración parenteral, por ejemplo por inyección de embolada o infusión continua. Una composición para inyección puede presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, opcionalmente con un

conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o de dispersión.

- 5 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica pueden prepararse como suspensiones de inyección oleosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias, que
- 10 aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.
- 15 Como alternativa, una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica pueden estar en una forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, sin pirógenos, antes de su uso.

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

20

Además, un cáncer o tumor presentes en una cavidad corporal, tal como en el ojo, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, (por ejemplo, la vejiga urinaria), sistema pulmonar y bronquial y similares, puede recibir una composición fisiológicamente apropiada (por ejemplo, una solución tal como una solución salina o tampón fosfato,

25 una suspensión o una emulsión, que es estéril) que contiene una cantidad eficaz de una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica mediante inyección directa con una aguja o mediante un catéter u otro tubo de suministro situado en el órgano hueco aquejado de cáncer o tumor. Puede usarse cualquier dispositivo de captura de imágenes eficaz tal como rayos X, ecografía o sistema de visualización de fibra óptica para localizar el tejido diana y dirigir la aguja o tubo de catéter en proximidad al mismo.

30

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

35

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

40

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

45

50

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

55

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

60

Por ejemplo, una RNasa T2 o un polinucleótido que la codifica pueden fusionarse con anticuerpos de proteína de membrana específicos o ligandos para dirigirse a tejidos o células específicos como se ha descrito previamente en la técnica. Se apreciará a este respecto que la fusión de RNasa T2 de la superfamilia de ribonucleasa A con

65

anticuerpos para el receptor de transferrina o para el antígeno de linfocitos T CD5 conduce a la inhibición de la síntesis proteica en células tumorales que porta un receptor específico para cada una de las toxinas anteriores (Rybak, M. *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207 y Newton DL, *et al.*, 1997, Protein Eng. 10(4): 463-70).

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

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

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

Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección para tratar, la dosificación también puede ser una única administración de una composición de liberación lenta, con un ciclo de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la cura o se consigue una disminución de la patología.

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

Al reducir la presente invención a la práctica, se ha descubierto sorprendentemente que la administración de la RNasa T2 que tiene una actividad de unión a actina tiene un efecto sinérgico en la eficacia antitumoral del tratamiento con TAXOL (Ejemplo 15, Figura 46). De forma similar, la administración de RNasa6PL humana recombinante que tiene actividad de unión a actina tiene un efecto sinérgico en la eficacia antitumoral del tratamiento con TAXOL de xenoinjertos de LS174T humanos en ratones (Figura 64). Por lo tanto, la RNasa T2 o el polinucleótido que la codifica de la presente invención puede usarse para tratar enfermedades o afecciones asociadas con movilidad celular aberrante solamente o en combinación con otro régimen terapéutico establecido o experimental para dichos trastornos. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención se proporcionan métodos para potenciar el tratamiento terapéutico de un cáncer. Los métodos se efectúan administrando a un sujeto que lo necesite, en combinación con el tratamiento terapéutico, una ribonucleasa de la familia T2 que tenga una secuencia de aminoácidos al menos 85 % homóloga de SEC ID N°: 4, o un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* la ribonucleasa. Se apreciará que dicha actividad sinérgica del tratamiento con RNasa T2 con métodos o composiciones terapéuticas adicionales tiene el potencial de reducir significativamente las dosis clínicas eficaces de dichos tratamientos, produciendo de este modo los efectos secundarios negativos con frecuencia devastadores y el alto coste del tratamiento.

El régimen terapéutico para el tratamiento de cáncer adecuado para combinación con la RNasa T2 de la presente invención o el polinucleótido que la codifica incluye, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia, fototerapia y terapia fotodinámica, cirugía, terapia nutricional, terapia ablativa, radioterapia y quimioterapia combinadas, braquiterapia, terapia de haces de protones, inmunoterapia, terapia celular y terapia radioquirúrgica de haces de fotones.

Los fármacos antineoplásicos que pueden coadministrarse con los compuestos de la invención incluyen, pero sin limitación, Acivicina; Aclarubicina; Clorhidrato de Acodazol; Acronina; Adriamicina; Adozelesina; Aldesleuquina; Altretamina; Ambomicina; Acetato de Ametrantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramycin; Asparaginasa; Asperlina; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; Clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesina; Sulfato de Bleomicina; Brequinar Sódico; Bropirimina; Busulfán; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimero; Carboplatino; Carmustina; Clorhidrato de Carubicina; Carzelesina; Cedefingol; Clorambucilo; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Mesilato de Crisnatol; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbacina; Dactinomicina; Clorhidrato de Daunorrubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; Mesilato de Dezaguanina; Diazicuona; Docetaxel; Doxorubicina; Clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; Citrato de Droloxifeno; Propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; Clorhidrato de Eflornitina; Elsamitruina; Enloplatino; Enpromato; Epiropidina; Clorhidrato de Epirubicina; Erbulozol; Clorhidrato de Esorubicina; Estramustina; Fosfato Sódico de Estramustina; Etanidazol; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; Clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; Fosfato de Fludarabina; Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina Sódica; Gemcitabina; Clorhidrato de Gemcitabina; Hidroxiurea; Clorhidrato de Idarubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-I a; Interferón

Gamma- I b; Iproplatino; Clorhidrato de Irinotecán; Acetato de Lanreotida; Letrozol; Acetato de Leuprolide; Clorhidrato de Liarozol; Lometrexol Sódico; Lomustina; Clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocól; Maitansina; Clorhidrato de Mecloretamina; Acetato de Megestrol; Acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato Sódico; Metoprina; Meturedepa; Mitindomida; Mitocarcina; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina; Mitosper; Mitotano; Clorhidrato de Mitoxantrona; Ácido Mifofenólico; Nocodazol; Nogalamina; Ormaplatino; Oxisurán; Paclitaxel; Pegaspargasa; Peliomicina; Pentamustina; Sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobromán; Píposulfán; Clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; Porfímero Sódico; Porfíromicina; Prednimustina; Clorhidrato de Procarbina; Puomicina; Clorhidrato de Puomicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safingol; Clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Esparfosato Sódico; Esparsomicina; Clorhidrato de Espirogermanio; Espiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; Sulofenur; Talisomicina; Taxol; Tecogalán Sódico; Tegafur; Clorhidrato de Teloxantrona; Temoporfina; Tenipósido; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; Clorhidrato de Topotecán; Citrato de Toremifeno; Acetato de Trestolona; Fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Glucuronato de Trimetrexato; Triptorelina; Clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracilo; Uredopa; Vapreotida; Verteporfina; Sulfato de Vinblastina; Sulfato de Vincristina; Vindesina; Sulfato de Vindesina; Sulfato de Vinepidina; Sulfato de Vinglicinato; Sulfato de Vinleurosina; Tartrato de Vinorelbina; Sulfato de Vinrosidina; Sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zinplatino; Zinostatina; Clorhidrato de Zorubicina. Los agentes antineoplásicos adicionales incluyen los desvelados en el Capítulo 52, Agentes Antineoplásicos (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner) y la introducción del mismo, 1202-1263, de Goodman y Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Octava Edición, 1990, McGraw-Hill, Inc. (Health Professions Division).

Los fármacos antiinflamatorios que pueden administrarse en combinación con la RNasa T2 o el polinucleótido que la codifica de la presente invención incluyen pero sin limitación Alclofenac; Dipropionato de Alclometasona; Acetonida de Algestona; Alfa Amilasa; Amcinafal; Amcinafida; Amfenac Sódico; Clorhidrato de Amiprilosa; Anakinra; Anilolac; Anitrazafeno; Apazona; Balsalazida Disódica; Bendazac; Benoxaprofeno; Clorhidrato de Bencidamina; Bromelinas; Broperamol; Budesonida; Carprofeno; Cicloprofeno; Cintazona; Cliprofeno; Propionato de Clobetasol; Butirato de Clobetasona; Clopirac; Propionato de Cloticasona; Acetato de Cormetasona; Cortodoxona; Deflazacort; Desonida; Desoximetasona; Dipropionato de Dexametasona; Diclofenac Potásico; Diclofenac Sódico; Diacetato de Diflorasona; Diflumidona Sódica; Diflunisal; Difluprednato; Diftalona; Dimetil Sulfóxido; Drocinonida; Endrisona; Enlimomab; Enolicam Sódico; Epirizol; Etodolac; Etofenamato; Felbinac; Fenamol; Fenbufeno; Fenclofenac; Fenclorac; Fendosal; Fenpipalona; Fentiazac; Flazalona; Fluazacort; Ácido Flufenámico; Flumizol; Acetato de Flunisolida; Flunixin; Meglumina de Flunixin; Butilo de Fluocortina; Acetato de Fluorometolona; Flucuzona; Flurbiprofeno; Fluretofenol; Propionato de Fluticasona; Furaprofeno; Furobufeno; Halcinonida; Propionato de Halobetasol; Acetato de Halopredona; Ibufenac; Ibuprofeno; Ibuprofeno de Aluminio; Ibuprofeno Piconol; Ilonidap; Indometacina; Indometacina Sódica; Indoprofeno; Indoxol; Intrazol; Acetato de Isoflupredona; Isoxepac; Isoxicam; Ketoprofeno; Clorhidrato de Lofemizol; Lomoxicam; Etabonato de Loteprednol; Meclofenamato Sódico; Ácido Meclofenámico; Dibutirato de Meclorisona; Ácido Mefenámico; Mesalamina; Meseclazona; Suleptanato de Metilprednisolona; Momiflumato; Nabumetona; Naproxeno; Naproxeno Sódico; Naproxol; Nimazona; Olsalazina Sódica; Orgoteína; Orpanoxina; Oxaprocina; Oxifenbutazona; Clorhidrato de Parailina; Polisulfato Sódico de Pentosán; Glicerato Sódico de Fenbutazona; Pírfenidona; Piroxicam; Cinamato de Piroxicam; Olamina de Piroxicam; Pírfprofeno; Prednazato; Prifelona; Ácido Prodólico; Procuzona; Proxazol; Citrato de Proxazol; Rimexolona; Romazarit; Salcolex; Salnacedina; Salsalato; Cloruro de Sanguinario; Seclazona; Sermetacina; Sudoxicam; Sulindac; Suprofenol; Talmetacina; Talniflumato; Talosalato; Tebulfonac; Tenidap; Tenidap Sódico; Tenoxicam; Tesicam; Tesimida; Tetridamina; Tiopinac; Pivalato de Tixocortol; Tolmetina; Tolmetina Sódica; Triclonida; Triflumidato; Zidometacina; Zomepirac Sódico.

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

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

Recientemente, Acquati *et al* han mostrado que la transfección de ADNc de RNasa 6PL en líneas celulares de tumor ovárico HEY4 y SG10G suprime la tumorigenicidad en ratones desnudos, y además que los clones de HEY4 y clones de una línea celular inmortalizada de *Xeroderma pigmentosum* SV40, transfectada con un ADNc de RNasa 6PL, desarrolla un proceso de senescencia notable durante el crecimiento *in vitro* (Aquati *et al*. Oncogene. 2001 22; 20(8): 980-8), demostrando de este modo la viabilidad de dicha modificación genética con RNasa T2.

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

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

Como se usa en el presente documento las frases "terapia génica" o "terapia genética" se usan de forma intercambiable y se refieren a un método de terapia en el que una modificación genética estable o transitoria de una célula o células proliferativas tales como una célula cancerosa, conduce a la inhibición de la proliferación de esta célula. Puede emplearse uno cualquiera de los polinucleótidos identificados en la Tabla 3 por su número de referencia de Gene Bank, y SEC ID N°: 3 de acuerdo con la presente invención como un polinucleótido que codifica una RNasa T2. Además, también pueden emplearse polinucleótidos 40 % o más homólogos y/o que hibridan en condiciones de hibridación suaves y/o rigurosas con los polinucleótidos enumerados como un polinucleótido que codifica una RNasa T2, siempre que la proteína codificada por el mismo se caracterice como una RNasa T2 y muestre las actividades deseadas. Además, se apreciará que partes, quimeras mutantes o alelos de dichos polinucleótidos también pueden emplearse como un polinucleótido que codifica una RNasa T2 de acuerdo con la presente invención, de nuevo, siempre que dichas partes, quimeras mutantes o alelos de dichos polinucleótidos codifiquen una RNasa T2 que muestre las actividades deseadas.

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

Un polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede fusionarse, en fase, con cualquier otra proteína que codifique un polipéptido para codificar una proteína fusionada usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede fusionarse con una secuencia líder o un péptido señal para secreción. De forma similar una proteína de RNasa T2 puede fusionarse (conjugarse) con otras proteínas usando métodos bien conocidos en la técnica. Se conocen muchos métodos en la técnica para conjugar o fusionar (acoplar) moléculas de diferentes tipos, incluyendo proteínas. Estos métodos pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación para acoplar una RNasa T2 con otras moléculas tales como ligandos o anticuerpos para ayudar de este modo a la dirección y unión de la RNasa T2 a tipos celulares específicos. Cualquier par de proteínas puede conjugarse o fusionarse entre sí usando cualquier método de conjugación conocido por un experto en la materia. Las proteínas pueden conjugarse usando un ácido 3-(2-piridilditio)propiónico N-hidroxisuccinimida éster (también denominado N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato) ("SDPD") (Sigma, Cat. N° P-3415), un procedimiento de conjugación de glutaraldehído o un procedimiento de conjugación de carbodiimida.

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

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

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

Los promotores/potenciadores que pueden usarse para controlar la expresión de RNasa T2 dentro de tejidos o células diana incluyen, pero sin limitación, el promotor de RB nativo, el promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV) (Karasuyama, H., *et al.*, 1989, J. Exp. Med., 169: 13), el promotor de β -actina humana (Gunning, P., *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4831-4835), el promotor inducible por glucocorticoides presente en la repetición terminal larga de virus de tumor mamario de ratón (HHTV LTR) (Klessig, D. F., *et al.*, 1984, Mol. Cell Biol., 4: 1354-1362), las secuencias de repeticiones terminales largas de virus de leucemia murina de Moloney (MULV LTR) (Weiss, R., *et al.*, 1985, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York), el promotor de región temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (VSR) (Yamamoto *et al.*, 1980, Cell 22: 787-797), el

promotor/potenciador de timidina quinasa del virus del herpes simple (VHS) (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296: 39-42), el promotor de adenovirus (Yamada *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82(11): 3567-71), y el promotor de LAT del virus del herpes simple (Wolfe, J. H., *et al.*, 1992, Nature Genetics, 1: 379-384).

Los vectores de expresión compatibles con células hospedadoras humanas para su uso en terapia génica de células tumorales o cancerosas incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores virales de herpes y virus de viruela aviar no replicativos, como se desvela, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.174.993.

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

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

Una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz de un vector de expresión puede administrarse de forma sistémica a la circulación sanguínea para tratar un cáncer o tumor que no puede alcanzarse directamente o aislarse anatómicamente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han definido anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones posterior encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN moleculares, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley y Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en las mismas se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

Caracterización de RNasa B1 de Aspergillus niger y su efecto inhibidor en el crecimiento del tubo polínico en árboles frutales

Materiales y métodos

Preparación y purificación de RNasa extracelular de A. niger:

Se cultivó *Aspergillus niger* B1 (CMI CC 324626) en cultivo líquido que contenía harina de trigo 1 % (p/v) y sulfato de amonio 0,05 % (p/v). La mezcla se ajustó a pH 3,5 con ácido clorhídrico y se esterilizó por autoclave. Se suspendió un inóculo de aproximadamente 10⁶ esporas en 100 ml de medio y se incubó a 30 °C en un agitador orbital, a 200 rpm durante 100 horas. El medio de cultivo se pasó a través de una membrana de 0,2 µm y se dializó tres veces frente a 10 volúmenes de acetato sódico 2 mM pH 6. Se cargaron dos litros de solución dializada en una columna de

Fractogel EMD-TMAE 650 (M) 26/10 (Merck), equilibrada con acetato sódico 20 mM pH 6. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 500 ml de cloruro sódico 0-1,0 M en el mismo tampón, usando un sistema de cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) (Pharmacia) con un caudal de 5 ml·min⁻¹. Las fracciones que mostraban la mayor actividad RNasa se agruparon y se dializaron frente a acetato sódico 2 mM pH 6, y se cargó una alícuota de 50 ml en una columna de MONO-Q 5/5 HR (Pharmacia), equilibrada con acetato sódico 20 mM pH 6. La elución se realizó como con la columna de EMD-TMAE, excepto que se usaron solamente 10 ml de un gradiente salino de 0-1,0 M, a un caudal de 1 ml·min⁻¹. Se usó RNasa B1 de *A. niger* purificada para determinar la secuencia genómica completa (SEC ID N°: 15) para RNasa B1, y la región codificante más corta correspondiente a la proteína B1 codificada (SEC ID N° 16).

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

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

Ensayos de RNasa:

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

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

La actividad específica de la RNasa se evalúa por un ensayo cuantitativo: se ensayan volúmenes crecientes de solución de reserva de RNasa T2, de concentración proteica conocida, de forma espectrofotométrica con respecto a actividad ribonucleolítica como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y los valores resultantes se expresan como unidades de actividad RNasa por mg o µg de proteína.

El efecto de RNasa B1 en el crecimiento del tubo polínico:

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

El efecto del tratamiento con RNasa B1 en el crecimiento del tubo polínico también se ensayó *in vivo*. Se pulverizaron flores intactas de melocotón y en mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco cv. Murcott) en los estadios tempranos de la antesis con RNasa B1 100 unidades·ml⁻¹ en tampón de citrato 20 mM a pH 3,5. En cada especie se pulverizaron flores adicionales en el mismo estadio, en ramas diferentes solamente con tampón o se dejaron sin tratar como controles. Después de la exposición a polinización abierta durante 48 horas, los estilos se fijaron en ácido acético y etanol 3:1 (en volumen) durante 24 horas, se lavaron con agua destilada y se empaparon durante

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

El efecto de la RNasa B1 en la fructificación:

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

Resultados experimentales

Purificación y caracterización de RNasa B1:

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

La purificación de RNasa B1 incluía tres etapas (Tabla 4). En una primera etapa se obtuvo un filtrado en bruto que contenía 1000 unidades·ml⁻¹ y 0,05 mg·ml⁻¹ de proteína. El filtrado en bruto se pasó a través de una columna de EMD-TMAE y las fracciones activas agrupadas (Figura 1, gráfica A) contenían proteína 0,1 mg·ml⁻¹, con una actividad RNasa de 40.000 unidades·ml⁻¹. En la etapa final, las fracciones agrupadas se pasaron a través de una columna de MONO-Q y se eluyó la fracción de RNasa activa (Figura 1, gráfica B). Esta fracción contenía una concentración de proteínas de 1,05 µg·ml⁻¹ y actividad RNasa de 543.000 unidades·ml⁻¹. Se observaron dos bandas proteicas principales, de 40 y 32 kDa, después de SDS-PAGE de la fracción de RNasa B1 purificada (Figura 2). Un gel de actividad RNasa mostró bandas activas correspondientes a las proteínas de 32 y 40 kDa. Cuando se sometió a PNGasa F, apareció una única banda proteica a 29 kDa. Se conservó la actividad RNasa después de digestión con PNGasa (no mostrado).

TABLA 4

Etapas de purificación	Unidades totales	Concentración proteica (mg/ml)	Recuperación (%)	Actividad específica (unidades/mg de proteína)
Filtrado en bruto	2.000.000	0,05	100	20.000
Columna de EMD-TMAE	1.120.000	0,1	56	400.000
Columna de MONO-Q	652.200	1,05	32,6	517.143

El efecto de la RNasa B1 en los tubos polínicos y la fructificación:

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

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

En nectarina cv. Fantasia, la RNasa B1 provocó una reducción en la fructificación (Tabla 5). En ramas que permanecían sin tratar o pulverizadas con tampón con triton X-100, la fructificación fue del 48,3 % y 36,3 %,

respectivamente. Parecía que el tampón de pH bajo tenía algún efecto inhibitor en la fructificación, sin embargo las ramas tratadas con 500 y 1000 unidades·ml⁻¹ de RNasa B1 fructificaron al 23,3 % y 18,4 %, respectivamente, lo que indica un efecto de reducción significativo de la RNasa, de una manera dependiente de dosis.

5

TABLA 5

Tratamiento	Flores (número total)	Fructificación (%)
Control sin tratar	169	48,3 a*
Tampón de control	143	36,3 ab
RNasa B1 500 unidades/ml	148	23,3 bc
RNasa B1 1000 unidades/ml	106	18,4 c
* los valores que no comparten una letra común son significativamente diferentes a P = 0,05.		

10

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

15

Se purificó RNasa B1 extracelular de *Aspergillus niger* (RNasa B1) hasta su homogeneidad. Se descubrió que contenía dos formas de glucoproteínas de 30 y 40 kDa, que compartían un núcleo proteico de 29 kDa. La actividad RNasa óptima se observó a una temperatura de 60 °C y un pH de 3,5. En melocotón (*Prunus persica* cv. Almog) y mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco cv. Murcott) la enzima inhibió la germinación del polen y el crecimiento del tubo *in vitro* así como *in vivo*. En experimentos de campo, la RNasa provocó una reducción de la fructificación de nectarina (*Prunus persica* var. nectarina Fantasia) e inhibió el desarrollo embrionario normal.

20

Ejemplo 2

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

25

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

Materiales y métodos experimentales

30

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

35

Se permitió que las anteras de lirio (*Lilium grandiflorum* L. cv. Osnat) experimentaran dehiscencia durante 24 horas a temperatura ambiente y después se usaron nuevas o se almacenaron a -20 °C. Se produjo RNasa B1 y se purificó a partir de filtrado de medio de cultivo de *Aspergillus niger* como se ha descrito en el Ejemplo 1. El polen se germinó *in vitro* en cultivos acuosos de 100 µl cada uno, que contenían sacarosa al 7 %, CaNO₃ 1,27 mM, H₃BO₃ 0,16 mM, K₂NO₃ 1 mM y KH₂PO₄ 3 mM en agua (Yokota y Shimmen 1994). Algunos cultivos se complementaron con RNasa B1 que tenía 100 unidades/ml de actividad RNasa hasta una concentración de proteína final de 16 µg/ml. Los cultivos adicionales se complementaron con RNasa que se había hervido previamente durante 30 minutos lo que produjo la pérdida del 50 % de actividad, o con RNasa inactivada por autoclave que carecía de ninguna actividad catalítica. Después de 2 horas de incubación a 25 °C en oscuridad, se midió la longitud del tubo polínico bajo el micrómetro ocular del microscopio. Los tubos polínicos se tiñeron con IKI (I₂ 0,3 % y KI 1,5 % en agua) para detectar cuerpos de almidón (amiloplastos) o con DiO₆ para detectar mitocondrias.

40

45

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

50

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

55

Se germinó polen *in vitro* en cultivos acuosos con o sin RNasa. Después de la incubación de una noche, los tubos polínicos se sedimentaron suavemente y el medio de cultivo se reemplazó con faloidina marcada con

tetrametilrodamina B isotiocianato (TRITC) 10^{-6} M (Sigma) en tampón PBST (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM y Tween-20 0,02 %). Para observaciones *in vivo*, se emascularon flores de lirio cv. Stargazer en el momento de aparición de la antesis y se inyectaron 0,5 ml de un medio de cultivo que contenía 100 unidades/ml de RNasa a través del estigma en el canal estilar. Las flores en las que se inyectó medio de cultivo sin RNasa se usaron como un control. Los líquidos se absorbieron en el tejido estilar durante 5 horas a 25 °C, después de lo cual los estigmas se polinizaron a mano por polen de lirio cv. Osnat. Después de 48 horas de incubación a 25 °C, cada pistilo se cortó longitudinalmente y los tubos polínicos se escindieron cuidadosamente y se retiraron a solución de TRITC-TBST y se incubaron durante 1 hora. La incisión en el estigma no afectó a los tubos polínicos, ya que sus protoplastos vitales se localizaron en la parte distal, protegida por tapones callosos. En los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* los tubos polínicos teñidos se aclararon en TBS (TBST sin Tween-20), se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se observaron con un microscopio óptico epifluorescente (Olympus BX40 equipado con una lámpara de mercurio USH-102D).

Unión de actina con RNasa B1:

Se cuantificó la interacción entre RNasa B1 y actina de un modo modificado de Simm (Simm, F. C. *et al.*, 1987. Eur. J. Biochem. 166: 49-54). Se polimerizó actina globular (G-) de músculo de Conejo (Sigma Co.) a actina filamentosa (F-) en Tampón F (Tris 10 mM pH 8, ATP 0,1 mM, CaCl_2 0,2 mM, KCl 0,1 M y MgCl_2 2 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron muestras de 50 μl que contenían cada una una F-actina 30 μM durante una noche a 4 °C con RNasa B1 1-33 μM . Como control, cada concentración de RNasa se incubó con tampón F solamente. Las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 40 minutos y se determinó la actividad RNasa del sobrenadante (Roiz, L., Goren, R. y Shoseyov, O. 1995, Physiol. Plant. 94: 585-590.).

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

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

Resultados experimentales

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

La tinción de almidón mostró que se observaban amiloplastos de la muestra de control que se extendían a lo largo del tubo polínico, excepto en la zona de la punta (Figuras 8a y 65b). Por otro lado, en tubos polínicos tratados con RNasa se acumulaban cuerpos teñidos con IKI en la zona de la punta (Figuras 8b y 65a). La tensión de DiO_6 mostró mitocondrias también ausentes de las puntas de los tubos polínicos de control, y que se acumulaban en la punta después del tratamiento con RNasa (Figuras 65c y d).

Las imágenes de video integrado de tubos polínicos con extensión activa presentaron las líneas de flujo citoplasmático (Figuras 9a y 9b). En la muestra de control era más habitual un movimiento longitudinal continuo característico del desarrollo del tubo polínico normal, como lo era el flujo acropetal en la periferia del tubo y flujo basipetal en el centro, formando un patrón de "fuente inversa" debajo de la zona de la punta (Figura 9a). La zona de la punta en sí misma se ocupó por cuerpos mucho más pequeños, principalmente partículas P, cuyo patrón de movimiento apenas se observaba. En tubos polínicos inhibidos por RNasa la alteración del ensamblaje de filamentos de actina era evidente. La punta de crecimiento atrofiado parecía hinchada, alcanzando partículas de almidón y lípidos bien visibles la zona de la punta (Figura 9b). No pudo detectarse movimiento continuo, sino que en su lugar imágenes irregulares extendidas indicaban cuerpos citoplasmáticos que rotaban aleatoriamente.

El efecto de la RNasa en la distribución de filamentos de actina se examinó en tubos polínicos de 1 hora *in vitro* y 48 horas *in vivo*. Los tubos polínicos *in vivo* alcanzaron aproximadamente 3-4 cm de longitud, y su tinción con TRITC-faloidina fue más intensiva que en los tubos *in vitro*. Sin embargo, el modo del efecto de la RNasa fue similar en ambos experimentos. En el control, se ensamblaron microfilamentos de actina longitudinalmente a lo largo del eje

del tubo, formando una red fina en la zona de la punta (Figura 10a). Por otro lado, en tubos polínicos tratados con RNasa se acumularon masas de F-actina en la pared celular de la punta (Figura 10b).

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

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

En este estudio se inhibió específicamente la germinación del polen y elongación de tubos de Lirio (*Lilium grandiflorum*) por RNasa B1 de *A. niger*. La RNasa hervida o esterilizada por autoclave, sin 90-100 % de la actividad catalítica original, mostró un efecto inhibitor similar. Los resultados demuestran que la RNasa de *A. niger* es una proteína que tiene una actividad de unión a actina claramente relacionada con el efecto inhibitor de la RNasa T2 en la elongación del tubo polínico. Esta actividad de unión a actina, que no está relacionada con la actividad catalítica de RNasa B1, deforma la disposición de los filamentos de actina del tubo polínico para alterar de este modo la corriente citoplasmática, movilidad y crecimiento celular.

Estos resultados muestran que la RNasa T2 es un inhibidor eficaz del crecimiento del tubo polínico, que interfiere con la estructura de la red citoesquelética de F-actina del tubo polínico. En tubos polínicos de control, imágenes de video, tinciones de yodo y DiOC₆ demostraron corriente citoplasmática normal a lo largo del tubo polínico y una localización intracelular aparente. La tinción con TRITC mostró filamentos de actina dispuestos en haces paralelos a lo largo del tubo y en una red delicada en la zona de la punta. Por el contrario, los tubos polínicos inhibidos por RNasa T2 se caracterizaron por pérdida de corriente citoplasmática dirigida y por un colapso abrupto de la red de F-actina hacia la punta.

Si la detención del crecimiento del tubo polínico era estrictamente un resultado de la degradación de ARN y agotamiento de la biosíntesis de proteínas, entonces la RNasa T2 inactivada que carecía de actividad RNasa sería ineficaz. Sin embargo, se descubrió que la RNasa T2 inhibía el crecimiento del tubo polínico independientemente de su actividad de RNasa. Además, en tubos polínicos con crecimiento activo, la adición de la RNasa T2 condujo a una alteración del movimiento de los orgánulos en algunos segundos, lo que sugiere una inhibición directa en lugar de una gradual de la síntesis proteica. Además, los tubos polínicos de lirios tratados con RNasa T2 mantuvieron una rotación intensa de los orgánulos durante varias horas, lo que indicaba ausencia de reducción de la viabilidad. Otros estudios que demostraban los efectos inhibidores de la alteración de filamentos de F-actina en células con crecimiento en la punta han indicado que la polimerización de actina normal es esencial para el crecimiento del tubo polínico. Por lo tanto, sin desear quedar limitado a una única hipótesis, estos resultados sugieren que la capacidad de la RNasa T2 para inhibir el crecimiento del tubo polínico mediante la modulación de F-actina (en lugar de mediante degradación de RNasa), es la principal causa para la inhibición del crecimiento del tubo polínico.

Ejemplo 3

El efecto de la RNasa B1 en células de cáncer de colon humano

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

Materiales y métodos experimentales y resultados

Cultivo celular:

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

Ensayo de viabilidad celular preliminar:

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

En todos los tratamientos el número total de células cultivadas durante 72 horas ($55-60 \times 10^5$) superó en aproximadamente el doble el número de células obtenida después de 48 horas de cultivo ($25-30 \times 10^5$) (Figura 13a).

La presencia de RNasa B1 en el medio de cultivo no tuvo un efecto significativo en el crecimiento celular. Sin embargo, se descubrió un efecto pequeño pero significativo de la RNasa B1 en el número de células muertas tanto a las 48 horas como a las 72 horas de incubación (Figura 13b).

Ensayo de clonogenicidad I:

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

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

Ensayo de clonogenicidad II:

La capacidad de las células tumorales para proliferar y colonizar se examinó en exposición breve frente a continua a RNasa B1. El experimento se realizó como se describe en el ensayo de Clonogenicidad I usando (i) células de control, (ii) células preincubadas con medio que contienen RNasa B1 10^{-6} M y después se permite que colonicen en medio de cultivo sin RNasa B1, y (iii) células preincubadas como en (ii) y después incubadas durante el ensayo de colonización en medio de cultivo que contiene RNasa B1 10^{-6} M. En estos experimentos las densidades iniciales variaron entre 250 y 1000 células por pocillo y el periodo de colonización fue de 7 días.

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

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

Ejemplo 4

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

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

Materiales y métodos experimentales

Se dividieron ratas macho de 4 semanas de edad derivadas de Charles-River en grupos de 6. En algunos grupos, se indujo que las ratas desarrollaran cáncer de colon por cinco inyecciones semanales de dimetilhidrazina (DMH). En este experimento, se examinaron dos modos de administración de RNasa B1. La RNasa B1 se aplicó directamente al colon por microbombas osmóticas, o se proporcionó por vía oral usando microcápsulas recubiertas de forma entérica. El conjunto completo de tratamientos que recibió cada grupo de ratas se describe por el esquema de la Figura 1. Durante el experimento, las ratas se pesaron semanalmente para controlar el efecto de la DMH y/o RNasa B1 en su velocidad de crecimiento. En grupos tratados con RNasa B1 se recogieron heces semanalmente de cada jaula y se secaron a 60 °C. Se molió una muestra de 250 mg de heces secas y se volvió a disolver en solución salina

tamponada con fosfato (PBS). Después de centrifugar, se examinó la actividad RNasa en la solución superior como se describe en Roiz *et al.* (Roiz, L. *et al.*, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125(1): 9-14. 2000).

Administración de RNasa B1 al colon mediante microbombas osmóticas:

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

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

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

Administración oral de RNasa B1:

Preparación de microcápsulas:

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

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

Administración oral de las microcápsulas de RNasa B1:

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

Resultados experimentales

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

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

Actividad RNasa en heces de las ratas:

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

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

El efecto de la RNasa B1 como un agente preventivo:

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

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

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

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

El efecto de la RNasa B1 como un agente terapéutico:

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

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

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

En ratas alimentadas con RNasa B1 encapsulada, el efecto del tratamiento fue menos significativo que el obtenido por bombas osmóticas (Figuras 27a-c). Este resultado puede explicarse suponiendo que una proporción muy

pequeña de la proteína alcanza el colon cuando se alimenta con RNasa B1 encapsulada. Como se ha mencionado antes, las microcápsulas pasan de hecho el estómago, pero aún tienen un largo camino a través del intestino delgado y el ciego. Se realizó por lo tanto un experimento para ensayar esta hipótesis usando microcápsulas de CAP cargadas con una proteína fluorescente y proporcionadas a las ratas. Las ratas se sacrificaron después de 6 horas y se observó el contenido de su tracto gastrointestinal con un microscopio fluorescente. Se descubrió que en el duodeno las microcápsulas comenzaban a disolverse. La disolución continuó adicionalmente en el íleon y el yeyuno. Cuando las microcápsulas alcanzaron el ciego, la mayoría de la fluorescencia se había difundido al contenido del ciego. Ya que las microcápsulas estaban dañadas, el efecto de RNasa B1 pudo reducirse debido a proteasas presentes en el intestino y el ciego.

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

Ejemplo 5

El efecto de la RNasa B1 en células de cáncer de colon HT-29 humanas in vitro, material y métodos experimentales

Condiciones de crecimiento celular:

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

Tinción directa para actina intracelular:

Las células se lavaron en PBS y se permeabilizaron en PBS que contenía Tween-20 0,02 % (PBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las células se tiñeron con respecto a actina con faloidina marcada con tetrametilrodamina B isotiocianato (TRITC) 10^{-6} M (Sigma) durante 1 hora y se dejó reposar en PBS durante una noche a 4 °C para retirar cualquier exceso de material de tinción. Las células se extendieron en agua en un portaobjetos de vidrio y se visualizaron usando Microscopía de Barrido con Láser Confocal (LSM) 510 (Zeiss).

Inmunotinción con respecto a actina de membrana:

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

Inmunotinción de RNasa B1 en la superficie celular:

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

Resultados experimentales

Tinción directa para actina intracelular:

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

Inmunotinción para actina de membrana:

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

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

Inmunotinción de RNasa B1 en la superficie celular:

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

Ejemplo 6

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

Materiales y métodos experimentales

Yodoacetilación de RNasa B1:

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

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

Se disolvió IAc-RNasa B1 liofilizada hasta una concentración final de 1 o 5 μ M en medio de cultivo de tubos polínicos de lirios que contenía sacarosa al 7 %, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1,27 mM, H_3BO_3 0,16 mM, KNO_3 1 mM y KH_2PO_4 3 mM en agua (Yokota, E. y Shimmen, T. 1994. Protoplasma 177: 153-162). Se germinaron granos de polen de lirio (*Lilium longiflorum*) *in vitro* en tubos que contenían 100 μ l de medio de cultivo, en presencia o ausencia de IAc-RNasa B1 10^{-6} M. Como controles adicionales, se germinó polen de lirio en las mismas concentraciones de RNasa B1 o BSA en medio de cultivo. Después de 1,5 horas de incubación a 25 °C en oscuridad, se midió la longitud del tubo polínico en cada tratamiento con microscopio óptico.

Resultados experimentales

Yodoacetilación de RNasa B1:

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

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

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

Ejemplo 7

Miembros de la familia de RNasa T2 muestran propiedades antiangiogénicas y antineoplásicas

Se ha mostrado que las ribonucleasas de la familia T2 comparten características fundamentales, por ejemplo homología completa del sitio activo catalítico, actividad RNasa óptima a alta temperatura y bajo pH, peso molecular al menos 24 kDa (dos veces el de la familia de RNasa A) y la presencia de cadenas de glucanos. Para determinar si los miembros de las proteínas de RNasa T2 tienen propiedades antiangiogénicas se empleó el ensayo de formación de tubos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), de la siguiente manera.

Materiales y métodos

Ensayo de formación de tubos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). En general, el experimento se realizó como se ha descrito previamente para RNasa B1 en Ponoe, M. L., 2001 (In vitro matrigel angiogenesis assays. En Murray, J. C. (ed.) Methods in molecular medicine: Angiogenesis protocols. Humana Press, Totowa, NJ, vol. 46, pp. 205-209). Brevemente, se mantuvieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) recién aisladas en medio M199 complementado con FCS 20 %, glutamina 1 %, solución antibiótica-antimicótica 1 %, ECGF 0,02 % y heparina 50 U/100 ml. Se recubrieron pocillos de placas de 96 pocillos con Matrigel sin factor del crecimiento (Ponoe ML. 2001. En: Murray JC, editor. Methods in molecular medicine. Vol. 46: Angiogenesis protocols. Totowa (NJ): Humana Press. p. 205-9) en medio M199 que contenía FCS 5 % y ECGF 0,005 %, complementado con angiogenina 1 µg/ml (para inducir la formación de tubos), y se sembraron en placas con 14.000 HUVEC por siembra/pocillo. Las diversas RNasas, es decir, RNasa B1 de *Aspergillus niger*, RNasa T2 de *Aspergillus oryzae* (Sigma, 29 kDa) o RNasa I de *E. coli* (Ambion, 27 kDa) se añadieron a una concentración final de 2 µM. Para los controles, las células se sembraron en las mismas condiciones, en ausencia o en presencia de cualquiera de las RNasas anteriores, pero en ausencia de angiogenina. La placa de 96 pocillos se incubó durante 24 horas a 37 °C en atmósfera humidificada y dióxido de carbono al 5 %. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento.

Resultados experimentales

La RNasa B1 muestra un efecto antiangiogénico significativo en la formación de tubos de HUVEC. La capacidad de diversas RNasas (es decir RNasa B1 de *Aspergillus niger*, RNasa T2 de *Aspergillus oryzae* y RNasa I de *E. coli*) se determinó usando el ensayo de formación de tubos de HUVEC (Figuras 32a-h). Como se muestra en las Figuras 32a-b aunque las HUVEC incubadas en medio en ausencia de angiogenina y RNasa (Control, Figura 32a), formaron solamente algunos tubos delicados en la superficie del Matrigel, en HUVEC incubadas en presencia de angiogenina (Control Positivo) aparecieron tubos masivos (Figura 32b). Además, aunque la RNasa B1 de *Aspergillus niger* y la RNasa T2 de *Aspergillus oryzae* no tuvieron ningún efecto en las células cuando se proporcionaron por sí solas (Control Negativo, Figuras 32c y 32e, respectivamente), estas RNasas claramente inhibieron la formación de tubos inducida por angiogenina (Figura 32d y 32f, respectivamente). Además, se descubrió que la RNasa T2 tenía un efecto inhibitor más débil que la RNasa B1 (compárese la Figura 32f con la Figura 32d). No obstante, se obtuvo una inhibición completa de la formación de tubos con RNasa B1 10 µM o RNasa T2 50 µM (datos no mostrados). Por otro lado, la RNasa I mostró un efecto inhibitor significativo en la formación de tubos en ausencia (Control Negativo, Figura 32g) o presencia de angiogenina (Figura 32h).

Por lo tanto, estos resultados demuestran claramente las propiedades antiangiogénicas de las RNasas T2 de fuentes altamente divergentes. Estos resultados son únicos para la presente invención ya que, hasta el momento, ninguna publicación ha mostrado o sugerido la actividad antiangiogénica de RNasas de diverso origen filogenético que pertenecen a la familia T2.

Ejemplo 8

La RNasa B1 inhibe el crecimiento de tumor inducido por células de melanoma B16F1 y B16F10

Para ensayar las propiedades antineoplásicas de RNasa B1, se generó un modelo de ratón de melanoma *in vivo*, de la siguiente manera.

Materiales y métodos experimentales

Ratones y células tumorales usadas para el modelo de ratón de melanoma intraperitoneal sistémico. Se usaron ratones CD BDF1 y Balb/c para la inducción de tumores. Se obtuvieron B16F1 de melanoma de ratón (metastásico bajo) de INSIGHT BIOPHARMACEUTICALS LTD. (Rehovot, Israel).

Generación de un modelo de ratón i.p. sistémico de melanoma. El modelo de ratón de melanomas se generó esencialmente como se ha descrito (Geran *et al.* 1972. Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. En: Cancer Chemotherapy Reports Parte 3 Vol 3 N° 2). Brevemente, se inyectaron 2×10^6 células de bajo potencial metastásico B16F1 en la cavidad intraperitoneal (i.p.) de cada ratón y se evaluó la presencia de tumores cancerosos el día 14 después de inyección de células de melanoma por una visión global de los exámenes de ratón y/o histopatología

Administración i.p. de RNasa B1 al modelo de ratón i.p. sistémico de melanoma. Veinticuatro horas y 5 días después de la inyección de células de melanoma B16F1 se inyectó RNasa B1 (5 mg/ratón en 100 µl de PBS) o PBS solo en la cavidad intraperitoneal.

5 *Ratones y células tumorales usadas para el modelo de ratón de melanoma intravenoso (i.v.) sistémico.* Se usaron ratones Balb/c para administraciones intravenosas de células de melanoma B16F10 de ratón (altamente metastásicas).

10 *Generación de un modelo de ratón i.v. sistémico de melanoma.* Se inyectaron células de melanoma B16F10 (5×10^5 o 5×10^6 células/ratón) en la vena lateral de la cola de ratones Balb/c y se evaluó la presencia de tumores cancerosos el día 14 después de inyección de células de melanoma por una visión general del ratón y/o exámenes histopatológicos.

15 *Administración i.v. de RNasa B1 a los modelos de ratón i.v. sistémicos de melanoma.* Se inyectó i.v. RNasa B1 (10 mg de RNasa B1 en 100 µl de PBS) o PBS en la vena lateral de la cola del modelo de ratón de melanoma comenzando 24 horas después de la inyección de células y en intervalos de cuatros días con un total de tres inyecciones. Al final del experimento, se retiraron los pulmones, se pesaron y se cuantificaron las metástasis superficiales.

20 *Resultados experimentales*

La RNasa B1 inhibe significativamente el crecimiento tumoral en modelos de ratones i.p. sistémicos de melanoma. El efecto de la RNasa B1 en el modelo de ratón de melanoma i.p./i.p. (es decir, inyección intraperitoneal tanto de células de melanoma como de RNasa B1) se puntuó 14 días después de la inyección de células de melanoma por observaciones de tumor cualitativas en la cavidad del abdomen de los ratones tratados. Como se muestra en las Figuras 33a y c, en ratones tanto BDF1 como Balb/c las células de melanoma indujeron tumores masivos que llenaban la cavidad abdominal y se extendían sobre el intestino. Por otro lado, en ratones tratados con RNasa B1 solo se observaron algunos tumores pequeños (Figuras 33b, d), lo que demuestra el efecto inhibitor del crecimiento tumoral de la RNasa B1. En este experimento la cantidad total de RNasa B1 fue de 10 mg/ratón. Se obtuvieron resultados similares cuando los ratones se trataron por una única inyección de 10 mg de RNasa B1 o por diez inyecciones diarias de 1 mg de RNasa B1 (datos no mostrados).

La RNasa B1 inhibe significativamente la metástasis/colonización y crecimiento de tumores de melanoma malignos altamente metastásicos en modelos de ratones i.v. sistémicos de melanoma. En el modelo de ratón de melanoma i.v./i.v. (es decir, inyección intravenosa tanto de células de melanoma como de RNasa B1) las células de melanoma inyectadas en la vena de la cola conducen al desarrollo de metástasis de pulmón en aproximadamente dos semanas. Como se muestra en las Figuras 34a-c, dos semanas después de la inyección de 5×10^5 células de melanoma B16F10 se observaron múltiples metástasis en los ratones con inyección de PBS (Figura 34a) en comparación con solamente algunas metástasis en los ratones tratados con RNasa (Figura 34b). Una determinación cuantitativa del número de metástasis reveló una reducción significativa del 76 % ($P < 0,001$, Figura 34c) en los ratones tratados con RNasa B1. Cuando se usó el embolado inicial de 5×10^6 células/ratón, las metástasis en los ratones con inyección de PBS eran muy intensas y demasiado densas para contarse (datos no mostrados). En estos ratones las mediciones del peso del pulmón (Figura 34d) y el tamaño del tumor (Figura 34e) revelaron reducciones significativas del 25 % en el peso del pulmón ($P < 0,01$, Figura 34d) y el tamaño del tumor ($P < 0,001$, Figura 34e) en los ratones tratados con RNasa B1 en comparación con los ratones tratados con PBS.

Estos resultados demuestran por lo tanto de forma convincente que la RNasa B1 puede usarse para inhibir eficazmente el crecimiento y la metástasis de tumores de melanoma maligno altamente metastásicos.

50 *Ejemplo 9*

La RNasa B1 inhibe el crecimiento tumoral, metástasis pulmonares y producción de MMP-2 en modelos de ratón de melanoma con inyección de A375SM

55 Para justificar adicionalmente la capacidad de la RNasa B1 para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos, se inyectó la RNasa B1 en células de melanoma A375SM, modelos de ratón inducidos, de la siguiente manera.

Materiales y métodos experimentales

60 *Ratones usados para generar un modelo de ratón de melanoma.* Se obtuvieron ratones desnudos Balb/c atímicos machos del Área de Producción Animal del Instituto Nacional del Cáncer, Instalación de Investigación del Cáncer de Frederick (Frederick, MD). Los ratones se alojaron en cabinas de flujo laminar en condiciones sin patógenos específicas y se usaron a las 7-9 semanas de edad.

65 *Células de melanoma.* La línea celular A375SM de melanoma humano altamente tumorigénico y metastásico se obtuvo del Centro del Cáncer MD Anderson, Houston, TX. Para preparar células tumorales para inoculación, las

células en fase de crecimiento exponencial se recogieron por exposición breve a una solución de tripsina 0,25 %/ácido etilendiamintetraacético 0,02 % (p/v). El matraz se golpeó fuertemente para desalojar las células y se añadió un medio complementado. La suspensión celular se pipeteó para producir una suspensión de células individuales. Las células se lavaron y resuspendieron en solución salina equilibrada de Hanks sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (HBSS) a la concentración celular deseada. La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de tripano, y se usaron solamente suspensiones de células individuales de > 90 % de viabilidad.

Generación de modelos de ratón de melanoma. Se produjeron tumores subcutáneos (s.c.) inyectando 10^5 células tumorales/0,1 ml de HBSS sobre la región escapular derecha de los ratones. El crecimiento de tumores subcutáneos se controló por el examen semanal de los ratones y la medición de los tumores con calibradores. Los ratones se sacrificaron 5 semanas después de la inyección de células de melanoma, y los tumores se congelaron en compuesto OCT (Sakura Fineter, Torrance, CA), o se fijaron en formalina y después se procesaron para inmunotinción y tinción de Hematoxilina y Eosina (H Y E).

Generación de metástasis de pulmón experimental. Para formar metástasis de pulmón se inyectaron 10^6 células tumorales en 0,1 ml de HBSS en la vena lateral de la cola (i.v.) de ratones desnudos. Los ratones se sacrificaron 60 días después de la inyección de células de melanoma y los pulmones se retiraron, se lavaron en agua y se fijaron con solución de Bouin durante 24 horas para facilitar el recuento de nódulos tumorales. El número de nódulos tumorales superficiales se contó bajo un microscopio de disección.

Administración de RNasa B1. Los ratones con inyecciones de células de melanoma tanto subcutáneas como intravenosas se trataron cada dos días con solución acuosa de RNasa B1 1 mg/100 μl o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) por inyección intraperitoneal (i.p.).

Análisis inmunohistoquímicos de CD31 y MMP-2. Se prepararon secciones de tejidos congelados a partir de xenoinjertos de tumor. Los portaobjetos de sección tisular se aclararon dos veces con PBS, y se bloqueó la peroxidasa endógena mediante el uso de peróxido de hidrógeno 3 % en PBS durante 12 minutos. Las muestras se lavaron después tres veces con PBS y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de bloqueo de proteínas consistente en PBS (pH 7,5) complementado con suero de caballo normal al 5 % y suero de cabra normal al 1 %. La solución de bloqueo en exceso se secó y las muestras se incubaron durante 18 horas a 4 °C con una dilución 1:100 de anticuerpo de rata monoclonal anti CD31 (1:800) o una dilución 1:200 de anti MMP-2 (PharMingen, San Diego, CA). Las muestras se aclararon después cuatro veces con PBS y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con la dilución apropiada de anti IgG1 de ratón, anti IgG de conejo o anti IgG de rata conjugado con peroxidasa. Los portaobjetos se aclararon con PBS y se incubaron durante 5 minutos con diaminobenzidina (Research Genetics, Huntsville, AL). Las secciones se lavaron después tres veces con agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina de Gill (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO). Para la cuantificación de la densidad de los microvasos (MVD), se contaron diez campos de las muestras teñidas con CD31 a un aumento 100 x. También se tiñeron secciones (de 4 μm de grosor) de tumores incluidos en parafina, fijados en formalina con H y E para un examen histológico rutinario.

Resultados experimentales

El tratamiento con RNasa B1 redujo significativamente el tamaño tumoral en ratones con inyección de células de melanoma A375SM. El efecto de la RNasa B1 en el crecimiento tumoral de células de melanoma humano se determinó en dos conjuntos de ratones desnudos. En el primer conjunto de ratones desnudos ($n = 5$), se inyectaron células de melanoma A375SM (5×10^5) por vía subcutánea y tres días después, se inyectó i.p. posteriormente cada dos días durante 30 días 1 mg de RNasa B1 o PBS de control a los animales a los que se habían inyectado células tumorales. Las células tumorales en los animales tratados con PBS crecieron progresivamente y produjeron tumores grandes que alcanzaban el tamaño de hasta 700 mm^3 de volumen medio (Figura 35, Control). Por el contrario, el tratamiento con RNasa B1 redujo el crecimiento tumoral hasta un máximo de 100 mm^3 de volumen medio durante los mismos periodos de tiempo (Figura 35, RNasa B1). En el segundo conjunto de ratones desnudos ($n = 8$) los ratones se inyectaron y se trataron exactamente como se ha descrito para el primer conjunto y mostraron exactamente los mismos efectos de la RNasa B1 en el crecimiento tumoral (datos no mostrados).

El tratamiento con RNasa B1 redujo significativamente la incidencia y número de metástasis pulmonares en ratones con inyección de células de melanoma A375SM. Para determinar el efecto de la RNasa B1 en metástasis de células de melanoma humano, se inyectaron 10^6 células A375SM por vía intravenosa en ratones desnudos para producir metástasis de pulmón experimental. Cinco días después, también se inyectó i.p. a animales a los que se habían inyectado células tumorales 1 mg de RNasa B1 o PBS de control cada dos días durante 60 días. Se descubrió que tanto la incidencia como el número de metástasis pulmonar de células A375SM se redujeron en ratones tratados con RNasa B1, en comparación con el grupo de control. En ratones de control, las células A375SM produjeron numerosas metástasis de pulmón (mediana, 65; intervalo, 16 a 200), mientras que el tratamiento con RNasa B1 inhibió significativamente la capacidad de las células A375SM para formar metástasis en ratones desnudos (mediana, 10; intervalo, 0 a 75; $P < 0,05$).

El tratamiento con RNasa B1 reduce la expresión de MMP-2 en modelos de ratón de melanoma A375SM. Para determinar si la RNasa B1 suprime la expresión de MMP-2 *in vivo*, se sometieron secciones tisulares de xenoinjertos de tumor a análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo específico de MMP-2. Se observó tinción de MMP-2 en tumores A375SM con inyección de control, pero se redujo significativamente en tumores tratados con RNasa B1 (datos no mostrados). Por lo tanto, la RNasa B1 inhibió significativamente la expresión de MMP-2 *in vivo* en células de melanoma.

En su conjunto, estos datos demuestran que el tratamiento de ratones con RNasa B1 conduce a la supresión del crecimiento tumoral y la metástasis, y a la inhibición de síntesis de factores de angiogénesis tales como MMP-2.

Ejemplo 10

La administración subcutánea local de RNasa B1 inhibe la angiogénesis

Ya que el MMP-2 es un factor angiogénico importante, los presentes inventores han determinado si la RNasa B1 podría afectar a la angiogénesis *in vivo*, de la siguiente manera.

Materiales y métodos experimentales

Inducción local de angiogénesis. Se implantaron por vía subcutánea espumas de gel impregnadas con 100 ng/esponja de angiogenina en ambos laterales de un ratón desnudo y después de 2 días se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal 7 veces, cada dos días, en un lateral RNasa B1 (RNasa B1 250 μ M en 100 μ l) y en el otro lateral PBS.

Tinción inmunofluorescente de CD31/PECAM-1. Se seccionaron muestras de ensayo de espuma de gel congeladas (obtenidas de Pharmacia y Upjohn, Peapack, NJ) (10-12 μ m), se montaron en portaobjetos con carga positiva y se secaron al aire durante 30 minutos. Las secciones se fijaron después durante 5 minutos en acetona fría seguido de una incubación de 5 minutos en una solución de acetona:cloroformo 1:1 y una incubación adicional de 5 minutos en acetona solamente. Las muestras se lavaron después tres veces con PBS, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución de bloqueo de proteínas que contenía gelatina de pescado al 4 % en PBS, y se incubaron durante 18 horas a 4 °C con una dilución 1:800 de anticuerpo anti CD31 de ratón monoclonal de rata (Pharmingen, San Diego, CA). Después de la incubación del anticuerpo los portaobjetos se aclararon tres veces con PBS (3 minutos cada uno) y se incubaron durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con una dilución 1:200 de un anticuerpo secundario de cabra anti rata conjugado con Alexa 594 de Cabra anti rata (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Las muestras se lavaron después tres veces con PBS (3 minutos cada una) y después se montaron con un medio de montaje Vectashield para fluorescencia con solución de Hoechst 33342, triclorhidrato, trihidrato 10 mg/ml en agua (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregón). Se realizó microscopía de inmunofluorescencia usando un microscopio Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Nueva York, NY) equipado con una lámpara de mercurio HBO de 100 W y conjuntos de filtros de Chroma, Inc. (Burlington, VT) para capturar individualmente imágenes fluorescentes rojas, verdes y azules. Las imágenes se capturaron usando una cámara 3CCD fría a color Hamamatsu C5810 (Hamamatsu, Japón) y se digitalizaron usando un software de captura de imágenes Optimas (Silver Springs, MD). Las imágenes se procesaron adicionalmente usando software Adobe PhotoShop (Adobe Systems, Mountain View, CA). Las células endoteliales se identificaron por fluorescencia roja.

Ensayo de TUNEL. Para el ensayo de marcaje de extremos de muescas de dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL), se usó un kit Klenow-FragEI (Oncogene Cambridge, MA). Las secciones (10 μ m) se desparafinizaron en xileno, seguido de rehidratación en soluciones de etanol graduales (etanol 100, 100, 95 y 70 % - 5 minutos cada una). Las preparaciones se sometieron a un tratamiento con proteinasa K durante 15 minutos, se lavaron exhaustivamente en PBS y se preincubaron a temperatura ambiente en un tampón de equilibrio proporcionado por el fabricante. Después de retirar por golpeo el exceso de líquido, se aplicaron desoxinucleótido transferasa terminal y digoxigenina-11-dUTP a las preparaciones. Los portaobjetos se incubaron a 37 °C durante 1 hora, se lavaron en tampón de lavado/parada precalentado a 37 °C durante 30 minutos, y después se lavaron tres veces en PBS. Se consiguió tinción específica mediante la adición de anticuerpo anti digoxigenina que portaba peroxidasa como el conjugado indicador. Después de contrateñir, los portaobjetos se montaron bajo un cubreobjetos de vidrio, y las células apoptóticas marrones se visualizaron por microscopía óptica.

Resultados experimentales

La RNasa B1 inhibe el desarrollo inducido por angiogenina de vasos sanguíneos. Para ensayar la capacidad de la RNasa B1 para inhibir la angiogénesis *in vivo*, se implantaron por vía subcutánea espumas de gel impregnadas con angiogenina en ambos laterales de un ratón desnudo, seguido de inyecciones i.p. de RNasa B1 o PBS. Como se muestra en la Figura 37, aunque el tratamiento con angiogenina-PBS dio como resultado un desarrollo masivo de vasos sanguíneos (Figura 37, Angiogenina), el tratamiento con angiogenina-RNasa B1 dio como resultado una reducción significativa en los vasos sanguíneos (Figura 37, Angiogenina y RNasa B1).

Estos resultados demuestran la capacidad de la RNasa B1 para inhibir la angiogénesis *in vivo*.

La RNasa B1 reduce la MVD tumoral en tumor inducido por A375SM. La neovascularización asociada con tumor como se indica por la densidad de microvasos (MVD) se determinó por inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti CD31. Se observó una reducción significativa en la MVD tumoral por cada campo después de tratamiento con RNasa B1 en comparación con tumores de control. El número medio de MVD fue de 12 ± 5 en tumores A375SM tratados con RNasa B1 en comparación con 43 ± 7 para tumores inducidos por A375SM no tratados, de control (datos no mostrados). Además, el número de células tumorales positivas para TUNEL estaba correlacionado de forma inversa con la MVD en los tumores estudiados. El número de células tumorales que experimentan apoptosis fue mayor en los animales tratados con RNasa B1 que en los tumores en ratones de control. Por lo tanto, el porcentaje de células apoptóticas fue de $31,2 \pm 7,3$ % en tumores de melanoma A375SM tratados con RNasa B1. Por el contrario, el porcentaje de células apoptóticas fue de $2,2 \pm 1,1$ % para tumores A375SM de control.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el tratamiento con RNasa B1 redujo significativamente la neovascularización asociada a tumor de melanoma y aumentó la apoptosis de células tumorales.

Ejemplo 11

La RNasa B1 reduce la densidad de microvasos en el modelo de DMH

Materiales y métodos experimentales

Ratas. Se obtuvieron ratas Wistar macho de 6 semanas de edad y que pesaban aproximadamente 160 g de la rata macho exogámica derivada de Charles River.

DMH - se obtuvo 1,2-dimetilhidracina (DMH) de Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos). La DMH se disolvió inmediatamente antes de su uso en una solución de EDTA al 1,5 % en PBS y el pH de la solución se llevó hasta pH 6,5.

Generación de modelos de DMH. Se inyectó DMH por vía intramuscular (i.m.) a ratas (40 mg/kg de peso corporal). En el momento de la inyección la rata pesaba 250 g.

Se indujeron tumores en ratas usando dimetilhidracina (DMH) administrada en inyecciones subcutáneas de DMH (15 mg/100 g de peso corporal), una vez a la semana durante 5 semanas. Los grupos de control recibieron inyecciones de PBS más el vehículo (EDTA).

Análisis de modelos de DMH. Las ratas se anestesiaron en primer lugar con éter y después se sacrificaron. De cada rata se escindió el colon y se contaron y midieron los focos de criptas aberrantes (ACF) o tumores. Los tumores de ratas de control y de tratadas con RNasa B1 se fijaron y se incluyeron en parafina y las secciones tumorales se analizaron adicionalmente por histopatología (tinción de H y E), inmunotinción con anticuerpo anti CD31 para control de los vasos sanguíneos o ensayo de TUNEL para apoptosis.

Tinción inmunofluorescente de CD31/PECAM-1. Se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 10, anteriormente en el presente documento. Brevemente, se sometieron secciones de parafina (10 μ m) de tumores generados en ratones tratados con DMH o DMH + RNasa B1 a inmunotinción de CD31 usando el anticuerpo PECAM-1 (H-300) (sc-8306, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA). Se contaron los vasos sanguíneos en secciones transversales tumorales medianas y se midieron sus diámetros. En cada tumor, se calculó la relación entre el área total del vaso sanguíneo y el área de sección tumoral. Los experimentos se repitieron dos veces y cada tratamiento se aplicó a de 6 a 10 ratas.

Resultados experimentales

La neovascularización asociada con tumor se redujo en ratones tratados con RNasa B1-DMH. La inmunotinción de CD31 reveló la presencia de vasos sanguíneos dentro del tumor y actuó como una base para el cálculo de la densidad de microvasos (MVD). Como se muestra en las Figuras 42a-b, se descubrió que la administración de RNasa B1 reducía significativamente el número de vasos sanguíneos (angiogénesis) por tumor.

Ejemplo 12

La RNasa B1 inhibe la invasividad/capacidad de colonización de células de melanoma, carcinoma de colon y mamario in vitro

Ya que se ha mostrado que la RNasa B1 afecta a la morfología de células cancerosas y la organización de actina los presentes inventores han examinado adicionalmente si la RNasa B1 también afecta a la movilidad celular, de la siguiente manera.

Material y métodos experimentales

Ensayo de invasión/colonización de carcinoma de colon (HT-29) o células de cáncer de mama (ZR-75-1). Se trataron células de cáncer de colon HT-29 o células ZR-75-1 en presencia o ausencia de RNasa B1 1 y 10 μ M durante 4 días. Se rehidrataron pocillos e insertos recubiertos con Matrigel de una cámara de invasión de 24 pocillos disponible en el mercado (Becton Dickinson, Bedford, MA) en 0,5 ml de medio sin suero durante una noche y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 0,5 ml de control de HT-29 (es decir, en ausencia de RNasa B1) o suspensiones celulares tratadas con RNasa B1 que contenían $2,5 \times 10^4$ células cada una en la parte superior de las cámaras y se añadieron 0,750 ml de medio DMEM que contenía FCS al 10 % a la cámara inferior. Las cámaras de invasión se incubaron durante 22 horas en un incubador de cultivo celular de 37 °C. Las células no invasoras en la superficie superior de la membrana del inserto se retiraron limpiando. Las células en la superficie inferior de la membrana se tiñeron con tinción de Diff-Quik™. Las membranas se fijaron y las células se contaron a aumento X 200 bajo un microscopio óptico. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Ensayo de invasión de filtro recubierto con Matrigel. Las células A375SM se trataron en presencia o ausencia de RNasa B1 y después de 22 horas se contó el número de células que invadían el filtro recubierto con Matrigel.

Liberación de MMP-2 de células A375SM. Se cultivaron células A375SM metastásicas (5×10^3) en medio esencial mínimo de Eagle Completo (CMEM), se sembraron en placas de seis pocillos y se permitió que se unieran durante 24 horas. Las células se trataron durante 4 días con RNasa B1 1 o 10 μ M, o PBS. Se descubrió que el tratamiento durante 4 días era óptimo para que la RNasa B1 afectara a la liberación de MMP-2. El día 5, se retiró el CMEM y se reemplazó con medio sin suero durante una noche. El sobrenadante se recogió y centrifugó y el medio se separó en alícuotas en muestras de 500 μ l y se almacenó a -20 °C. Se determinó el MMP-2 total por el kit de inmunoensayo de MMP-2 quantikine (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN). Las muestras se diluyeron 10 veces en un diluyente proporcionado por el kit. Se midió MMP-2 de acuerdo con las instrucciones del proveedor y los resultados se ajustaron de acuerdo con el número de células.

Actividad colagenasa de MMP-2 (Cimogramas). Se determinó la actividad de MMP-2 en geles impregnados con sustrato. Se sembraron células HUVEC o células A375SM metastásicas (5×10^3) en placas de seis pocillos y se permitió que se unieran durante 24 horas. Las células se trataron durante 4 días con RNasa B1 1-5 o 10 μ M, o PBS. Se descubrió que el tratamiento durante 4 días era óptimo para que la RNasa B1 afectara a la actividad de MMP-2. El día 5, se retiró CMEM y se reemplazó con medio sin suero durante una noche. El sobrenadante se recogió, el volumen se ajustó para el número de células, se cargó y se separó en geles de dodecilsulfato sódico impregnado con gelatina (1 mg/ml; Difco, Detroit, MI)/poliacrilamida al 8 % en condiciones no reductoras, seguido de 30 minutos de agitación en Triton X-100 2,5 % (BDH, Poole, Reino Unido). Después se incubaron los geles durante 16 horas a 37 °C en Tris 50 mM/l, NaCl 0,2 M/l, CaCl₂ 5 mmol/l (p/v) a pH 7,6. Al final de la incubación, los geles se tiñeron con Coomassie G 250 0,5 % (Bio-Rad, Richmond, CA) en metanol/ácido acético/H₂O (30:10:60). La presencia de actividad Colagenasa de MMP-2 se ve como una banda blanca en geles azules.

Resultados experimentales

La RNasa B1 reduce la invasividad de HT-29 o ZR-75-1 in vitro. Como se muestra en la Tabla 6, a continuación en el presente documento, las células HT-29 y ZR-75-1 fueron capaces de penetrar en los filtros recubiertos con Matrigel. Sorprendentemente, se descubrió que la RNasa B1 inhibía significativamente y de forma dependiente de dosis (1 y 10 μ M) la invasividad/capacidad de colonización de células de carcinoma de colon.

TABLA 6
El efecto de la RNasa B1 en la invasividad de HT-29 o ZR-75-1

Líneas celulares	Control	Concentración de RNasa B1	
		1 μ M	10 μ M
HT-29	963,7 \pm 95,7	623,3 \pm 104,2	223,7 \pm 13,1
ZR-75-1	1297,7 \pm 62,5	784,0 \pm 51,5	271,7 \pm 16,6

Tabla 6: el efecto de la RNasa B1 en la invasividad de células de cáncer de mama ZR-75-1 y cáncer de colon HT-29 a través de filtros recubiertos con Matrigel. En células HT-29 y ZR-75-1, la RNasa B1 a 1 μ M (P < 0,05 y P < 0,01, respectivamente) y 10 μ M (P < 0,01 y P < 0,001, respectivamente) inhibió la invasividad celular de una manera sensible a dosis.

La RNasa B1 reduce la invasividad de A375SM in vitro. Se trataron células A375SM en presencia o ausencia de RNasa B1 1 o 10 μ M y se midió el grado de invasividad celular en filtros recubiertos con Matrigel. Como se muestra en la Figura 38, se observó un efecto dependiente de la dosis significativo de la RNasa B1 y la inhibición de la invasividad de A375SM. Mientras que en células A375SM no tratadas (control) 1216 \pm 68 células penetraron en filtros recubiertos con Matrigel, 725 \pm 59 o 211 \pm 14 células A375SM tratadas con RNasa B1 1 o 10 μ M penetraron en los filtros recubiertos con Matrigel.

La RNasa B1 inhibe significativamente la secreción de MMP-2. El nivel de liberación de MMP-2 se determinó *in vitro* de células A375SM. Como se muestra en la Figura 48, se obtuvo un efecto dependiente de la dosis de RNasa B1 en

la inhibición de la liberación de MMP-2 total, observándose el efecto inhibitor máximo en presencia de RNasa B1 10 μ M.

La actividad colagenasa de MMP-2 se reduce después del tratamiento con RNasa B1. Se usaron Cimogramas del sobrenadante de células A375SM o HUVEC para determinar la actividad de MMP-2. Como se muestra en la Figura 49a-b, aunque las células no tratadas tanto A375SM (Figura 49a) como HUVEC (Figura 49b) muestran una fuerte actividad de MMP-2, las células tratadas con RNasa mostraron una reducción dependiente de la dosis en la intensidad de las bandas de la MMP-2 de 72 kDa, lo que sugiere una actividad de MMP-2 reducida. De forma similar, también se observó una reducción dependiente de la dosis en la actividad de MMP-9 en las células tratadas con RNasa B1 (Figura 49b).

En su conjunto, estos resultados demuestran claramente las características anti angiogénicas/antineoplásicas de RNasa B1.

Ejemplo 13

Las administraciones intravenosas e intraperitoneales de RNasa B1 reducen el tamaño tumoral en modelos de cáncer de colon HT-29

Materiales y métodos experimentales

Generación de un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon s.c./i.v. Se injertaron tumores de origen de cáncer de colon humano (HT-29) en ratones desnudos de 4-5 semanas de edad (CD-1 nu/nu) macho, que pesaban 18-20 gramos al comienzo del experimento. Se injertaron células HT-29 (2×10^6 /ratón) por vía subcutánea (s.c.) en los ratones, en la cadera izquierda. Se inyectó RNasa T2 (RNasa B1, 5 mg en 100 μ l de PBS) o solamente PBS por vía intravenosa (i.v.) en la vena de la cola 24 horas, 5 días y 10 días después de la administración de las células de cáncer de colon. Después de 15 días, los ratones se sacrificaron y los tumores o el área de inyección se evaluaron por examen histopatológico.

Se tiñeron secciones de parafina de tumores de control y tratados con RNasa T2 con hematoxilina y eosina (H y E) y con kit de Klenow-FragEI (Oncogene, Cambridge, MA) para pruebas de apoptosis.

Generación de un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon s.c./i.p. Las células de cáncer de colon (HT-29) y ratones desnudos (CD-1 nu/nu) fueron como para el modelo de s.c./i.v. El 1er día del experimento, las células se injertaron en las caderas izquierdas de los ratones (10^6 células/ratón). Se inyectó RNasa B1 en la cavidad peritoneal, comenzando desde el día 2 y cada dos días. Se realizaron dos experimentos. En el primer experimento, se aplicó RNasa B1 a dosis de 1 y 5 mg/inyección en 100 μ l de PBS. En el segundo experimento, se usaron dosis de RNasa B1 que variaron entre 0,01 y 1 mg/inyección. Se inyectó PBS solamente como control. Los tumores se escindieron el día 30 del experimento, para mediciones de tamaño y exámenes histopatológicos. El volumen tumoral se calculó usando la ecuación $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$.

Resultados experimentales

La administración intravenosa de RNasa B1 puede reducir eficazmente el peso tumoral. En ratones tratados con RNasa B1 se observó una reducción del 60 % en el peso tumoral en comparación con el control (Figuras 36a-b). Estos resultados muestran que la administración intravenosa de RNasa B1 es altamente eficaz en la inhibición del crecimiento de tumor de carcinoma de colon.

La administración intraperitoneal de RNasa B1 reduce eficazmente el tamaño tumoral. En el modelo de ratones sc/ip, la RNasa B1 inhibió significativamente el crecimiento de carcinoma derivado de HT-29 (Figuras 39a-b). A las dosis terapéuticas de 1 y 5 mg/inyección (50 y 250 mg/kg), el volumen tumoral se redujo en 44 % y 41 % respectivamente ($P < 0,05$, Figura 39b). A 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 y 1 mg/inyección (0,05, 0,5, 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente), el volumen tumoral se redujo en 3 %, 41,5 %, 34,4 %, 51,1 % y 62,2 % respectivamente (Figura 39a), en comparación con el control ($P < 0,05$). Estos resultados son coherentes con los experimentos *in vitro* previos con células HT-29, en los que la RNasa B1 a concentraciones que variaban entre 1 y 4 μ g/100 μ l (0,25-1 μ M) tuvieron un efecto inhibitor similar en la tasa de clonogenicidad. Por lo tanto, estos resultados demuestran el efecto preventivo (Figura 39a) así como el terapéutico (Figura 39b) de la RNasa B1 en el tamaño de tumor del colon.

La RNasa B1 se acumula en el peritoneo de los ratones tratados. Como se muestra en las Figuras 40a-c, la tinción inmunohistoquímica usando anti RNasa B1 de conejo y anti conejo de cabra conjugado con FITC reveló la presencia de RNasa B1 en los ratones tratados con RNasa B1 (Figura 40b) pero no los ratones tratados con PBS (Figura 40c). Además, la inmunotinción de RNasa B1 de las secciones transversales de los ratones tratados reveló la acumulación de RNasa B1 en la membrana basal del vaso sanguíneo tumoral (Figuras 41a-c). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la RNasa B1 entra en el peritoneo y después se desplaza hacia la membrana basal de vasos sanguíneos tumorales.

Cabe mencionar que en el modo intraperitoneal de administración parece no ser tóxico para los ratones desnudos, ya que el peso corporal y otros parámetros conductuales permanecen iguales a los de ratones no tratados en todo el experimento.

Ejemplo 14

La RNasa B1 potencia la apoptosis en modelos animales de cáncer

Materiales y métodos experimentales

Ensayo de TUNEL. Se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 10, anteriormente en el presente documento.

Modelos de melanoma de ratón. Se generaron modelos de melanoma de ratón inducido por B16F1 como se ha descrito en el Ejemplo 8, anteriormente en el presente documento.

Modelos de ratón de cáncer de colon. Se han descrito modelos de cáncer de colon DMH y HT-29 en los Ejemplos 11 y 13, anteriormente en el presente documento, respectivamente.

Resultados experimentales

La RNasa B1 potencia la apoptosis en tumores de células de melanoma inducidos por B16F1. Para determinar la tasa de apoptosis dentro de los tumores, se sometieron secciones tisulares de tumor de modelos de ratón de melanoma tratado con RNasa B1 o no tratado a un ensayo de TUNEL. Como se muestra en las Figuras 43a-b, en los ratones tratados con RNasa B1 la tasa de apoptosis aumentó significativamente en comparación con el modelo de ratón de melanoma no tratado.

Tasa de apoptosis potenciada en el modelo de rata de cáncer de colon DMH tratado con RNasa. Como se muestra en la Figura 44a, los tumores obtenidos del modelo de cáncer de colon DMH mostraron niveles insignificantes de apoptosis. Por otro lado, los tumores obtenidos de ratas tratadas con RNasa B1 mostraron un nivel significativo de apoptosis (Figura 44b). Cuando se contaron 10 campos microscópicos diferentes a aumento x 200 en tres secciones tisulares diferentes se descubrió que el número de células apoptóticas era de $2,01 \pm 0,2$ /campo microscópico en tumores de control, no tratados y 37 ± 5 /campo microscópico en tumores de los animales tratados con RNasa B1.

Alta proporción de células apoptóticas en ratones con carcinoma de colon HT-29 inducido que se trataron con RNasa B1. Como se muestra en las Figuras 45a-d, aunque los ratones con carcinoma de colon inducido por HT-29 no tratados mostraron núcleos con división activa y vitales (Figuras 45a y c), los ratones tratados con RNasa presentaron citoplasma y núcleos condensados (Figura 45b) y alta proporción de células apoptóticas (Figura 45d).

En su conjunto, estos resultados demuestran el efecto apoptótico significativo de la RNasa B1 en los diversos modelos animales con cáncer inducido, y sugieren el uso de RNasa B1 en el tratamiento de trastornos de apoptosis y acumulación anómala de las células, tales como cáncer y enfermedad inflamatoria/isquémica.

Ejemplo 15

La RNasa T2 y el Taxol muestran un efecto sinérgico en la inhibición del volumen tumoral relativo en modelos de xenoinjerto de cáncer de colon

Para ensayar si la RNasa T2 puede inhibir el crecimiento tumoral en tumores establecidos y para determinar si la RNasa T2 presenta un efecto aditivo sinérgico con taxol, se empleó un fármaco citotóxico para cáncer de colon común, RNasa B1 y RNasa 6PL humana junto con taxol en modelos de xenoinjerto de cáncer de colon, de la siguiente manera.

Materiales y métodos experimentales

(El siguiente protocolo está basado en Fujii T., *et al.* Anticancer Res. 2003 23: 2405-2412)

Animales. RNasa B1: ratones machos desnudos (Balb/c nu/nu), 7 semanas de edad, de 20 gramos de peso cada uno. RNasa 6PL: ratones macho CD-1 nu/nu desnudos (Charles River, Wilmington, MA), de 7-9 semanas de edad con una dieta normal a voluntad y en condiciones sin patógenos, con 30 g de peso cada uno.

Células cancerosas. Cáncer de colon humano LS174T. Se inyectaron por vía subcutánea células cancerosas LS174T [1×10^6 células por ratón (RNasa B1) o 5×10^5 células por ratón (RNasa6PL) por cada 100 ml de medio] en la cadera izquierda de los ratones desnudos, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Administración de RNasa B1. Comenzó cuando los tumores eran palpables (10-13 días después de la inyección de células), y consistió en inyecciones i.p. cada dos días durante tres semanas. Las dosis de RNasa B1 fueron de 10 y 1000 microgramos/100 µl/inyección (0,5 y 50 mg/kg, respectivamente).

Administración de RNasa6PL. Se iniciaron estudios 10-13 días después de la implantación, cuando los tumores fueron palpables (80-100 mm³) y los ratones se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos de tratamiento ($n=6$): Grupo 1: RNasa 6PL, 2qx12 inyectado i.p (0,5 mg/kg), Grupo 2: RNasa 6PL, 2qx4, seguido de PBS, 2qx3 y después, RNasa 6PL, 2qx5, Grupo 3: PBS, 2qx4, seguido de Taxol 2qx3 inyectado i.v. (25 mg/kg) y después, PBS, 2qx5, Grupo 4: RNasa 6PL, 2qx4 inyectado i.p (0,5 mg/kg), seguido de Taxol 2qx3 inyectado i.v. (25 mg/kg) y después RNasa 6PL, 2qx5. Los grupos de control de ratones con tumores recibieron cada dos días 100 µl de PBS i.p., doce veces.

El tratamiento comenzó cuando los tumores eran palpables (3-5 mm de diámetro). Tanto para RNasa B1 como para RNasa6PL, los tumores se midieron con calibradores en tres diámetros ortogonales tres veces por semana. El volumen tumoral se calculó como se describe por la fórmula para hemielipsoides $[(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2]$ y se presentó como valores medios. Los experimentos se terminaron después de 30 (RNasa B1) o 24 (RNasa 6PL) días de tratamientos iniciales, y todos los ratones se sacrificaron simultáneamente, se les hicieron autopsias y se recogieron sus tejidos tumorales. Para procedimientos inmunohistoquímicos y de tinción de H y E, se fijó una parte del tumor en formalina y se incluyó en parafina.

Preparación y administración de Taxol. Para el estudio de RNasa B1-Taxol (Figura 46): se disolvieron 50 mg de Taxol en 18 ml de propilenglicol y 3 ml de etanol, después de lo cual se añadieron 9 ml de agua. Se administró Taxol por inyecciones i.p. durante 5 días consecutivos de 7 días durante un periodo de 3 semanas, comenzando cuando los tumores eran palpables (13 días después de la inyección de células). Los controles recibieron PBS o polipropilenglicol+etanol. Para experimentos de Taxol y RNasa 6PL (Figura 64), se diluyó una preparación de Taxol comercial [inyección de Paclitaxel de reserva 6mg/ml (6 mg) en 527 mg de Cremophor EL purificado y alcohol deshidratado 49,7 % v/v, USP, Mead Johnson (Oncology Products), Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, NJ] con PBS antes de su uso, y se inyectó i.v. en la vena de la cola, como se ha descrito anteriormente.

Durante el experimento, los tumores se midieron dos veces por semana usando un calibrador. El volumen tumoral se calculó usando la ecuación $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$ (hemielipsoides). Cada ratón se marcó y se controló individualmente. El volumen tumoral relativo (VTR) se definió como $VTR=V_i/V_0$, en la que V_i era el volumen tumoral en cualquier momento dado y V_0 era el del momento de tratamiento inicial. Al final de los experimentos, se tomaron muestras para histología.

Resultados experimentales

La línea celular LS174T altamente angiogénica se usó en el tratamiento combinado de RNasa B1 y RNasa 6PL, y Taxol. Como se muestra claramente en la Figura 46, aunque el Taxol presenta solamente un efecto marginal en el volumen tumoral relativo (VTR), la RNasa B1 muestra un efecto significativo en la inhibición del crecimiento tumoral. Sin embargo, cuando se inyectaron simultáneamente RNasa B1 y Taxol en los ratones, se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral, lo que demuestra un efecto sinérgico, en lugar de aditivo, de la RNasa B1 al tratamiento con Taxol. Además, el VTR en el punto final fue de 158,2, 195,3, 61,4 y 13,43 en tratamientos de control, Taxol, RNasa B1 y RNasa B1 + Taxol, respectivamente (Figura 46), lo que demuestra, por primera vez, una supresión eficaz del crecimiento tumoral.

Los resultados usando la proteína de RNasa 6PL T2 humana recombinante con Taxol (Figura 64) también demostraron un efecto sinérgico, proporcionando pruebas adicionales de que la RNasa T2 humana inhibe de forma sinérgica el crecimiento y volumen tumoral cuando se administra junto con otro tratamiento antineoplásico.

Estos resultados indican que el tratamiento combinado tiene un mayor potencial para inhibir la velocidad de crecimiento tumoral que cada fármaco por sí solo. Estos resultados demuestran adicionalmente la capacidad de la RNasa T2 de diversos orígenes (RNasa B1 y RNasa6PL) para inhibir el crecimiento de tumores preestablecidos de una manera similar.

Ejemplo 16

Unión a actina en diversas RNasa T2

Se investigó la actividad de unión a actina de diversas RNasas de la familia T2.

Materiales y métodos experimentales

Transferencia de Western de actina. Este ensayo se basa en el método descrito en Hu *et al.* 1993 (Actin is a binding protein for angiogenin. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 1217-21). Brevemente, la RNasa B1, Angiogenina, RNasa I (1 µg de cada proteína) y G-actina (como un control positivo) se sometieron a SDS-PAGE, seguido de análisis de

Transferencia de Western. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó durante una noche con BSA y se incubó durante otra noche en 5 ml de tampón que contenía 25 µg de G-actina, después de lo cual se aplicó un IgM anti actina de ratón monoclonal seguido de Kit de Actina anti IgM de ratón de cabra conjugado con HRP (Ab-1), [CAT N° CP01-1EA (Oncogene)]. Las señales derivadas de HRP se detectaron por el sistema de quimioluminiscencia potenciado Super-Signal® (ECL, Pierce).

Ensayo de unión a actina de RNasa 6PL: transferencia por ranuras y SDS-PAGE. Se bloqueó una membrana de nitrocelulosa que contenía 25 µg (en 50 µl) de RNasa 6PL, RNasa B1 o G-Actina transferida directamente usando una Transferencia por Ranuras (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.) durante una noche a 4 °C con leche desnatada al 5 % (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1 x con Tween 20 0,25 % y se lavó dos veces durante 10 minutos cada una, con leche 1 % (p/v) en PBS 1 x con Tween 20 0,25 %. La membrana se equilibró después con tampón de Tris-HCl 2 mM recién preparado pH 8,0, que contenía CaCl₂ 0,2 mM, ATP 0,2 mM (Tampón G) durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó durante una noche a 4 °C con la adición de G-Actina 5 µg/ml. La membrana se lavó tres veces durante 10 minutos cada vez, a temperatura ambiente, con leche 1 % (p/v) en PBS 1 x con Tween 20 0,25 %, CaCl₂ 0,2 mM y se exploró con anticuerpos IgM anti Actina (1/5.000) en Tris-HCl 2 mM pH 7,4, CaCl₂ 0,2 mM durante 1 h. Las membranas se lavaron después tres veces durante diez minutos con PBS con Tween 20 0,25 %, CaCl₂ 2 mM, y se hicieron reaccionar con un anticuerpo secundario, anti IgM de ratón de cabra conjugado con HRP (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), a una dilución de 1/10.000 como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las membranas se procesaron para quimioluminiscencia potenciada (ECL) con reactivos de detección que contenían luminol (Sustrato SuperSignal; Pierce, Rockford, Ill) como un sustrato y se expusieron a película de rayos X (Hyperfilm-MP; Amersham International plc) para visualizar el anticuerpo unido.

Se realizó un ensayo de unión a actina en SDS-PAGE en un gel de SDS-Tricina al 12,5 %. Se realizó unión de proteínas en solución de acuerdo con Hu *et al* (Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 1217-1221). Se premezclaron RNasa6PL y G-actina en un tubo Eppendorff, a una relación de 1:1 (mol:mol) en tampón G, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió metyoduro de 1-3(dimetilamino)propil]-3-etil-carboimida (EDC, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5 mM. Después de otros 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, los complejos reticulados se eluyeron al pocillo. Los controles que no habían reaccionado, respectivos, también se aplicaron al gel: RNasa6PL y G-actina que previamente se habían sometido a un pretratamiento idéntico como el complejo entre ellas.

Resultados experimentales

Propiedades de unión a actina de RNasa T2 bacteriana y de A. niger. Como se muestra en las Figuras 47a-b, el análisis de Transferencia de Western de actina reveló una fuerte asociación tanto de RNasa I de *E. coli* como de la RNasa B1 de *A. niger* con G-actina, lo que demuestra su capacidad de unión a actina.

Unión a actina de RNasa 6PL humana. Como se muestra en las Figuras 66a y 66b, la RNasa 6PL, como la RNasa T2 bacteriana y de levadura, demostró una unión fuerte y específica a actina. Usando el reactivo de reticulación metyoduro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil-carboimida (EDC, Aldrich), que reacciona solamente con moléculas en asociación estrecha, se demostró la alta avidéz de la RNasa 6PL humana por la actina (véase Figura 66a, Carril 4). Las transferencias por ranuras de RNasa 6PL y RNasa T2, que se habían hecho reaccionar con actina, también mostraron la unión de la actina con ambas ribonucleasas (Figura 66b), detectable con un anticuerpo anti actina. En esta serie de experimentos, la actina también se transfirió para mostrar la especificidad de unión de anti actina con actina (ranura inferior).

Estos resultados proporcionan pruebas directas adicionales de la fuerte actividad de unión a actina característica de la RNasa T2 de origen ampliamente diverso (de bacteriano a humano), que se correlaciona con la eficacia de la RNasa T2 en la prevención, inhibición y/o inversión de la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala, y sus efectos en la movilidad y el crecimiento celular.

Ejemplo 17

Localización celular de RNasa B1

Materiales y métodos experimentales

Tinción de inmunocitoquímica de células cultivadas. Se cultivaron células A375SM o HUVEC en portaobjetos en cámara y se fijaron con acetona fría durante 20 minutos. Los portaobjetos se aclararon y se bloquearon después con gelatina de pescado al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos en cámara se incubaron con anticuerpo primario durante una noche a 4 °C. Después de lavarse con PBS 0,01 M pH 7,4 tres veces, las células se incubaron durante 60 minutos con anticuerpo secundario anti conejo conjugado con FITC diluido con gelatina de pescado al 4 % en PBS. Para inmunotinción de CD31 de HUVEC, las muestras de ensayo se incubaron durante 18 horas a 4 °C con una dilución 1:800 de anticuerpo anti CD31 de ratón monoclonal de rata (Pharmingen, San Diego, CA). Después de aclararse las muestras con PBS tres veces durante 3 minutos cada una, los

portaobjetos se incubaron durante 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente con una dilución 1:200 de anticuerpo secundario de Cabra anti rata conjugado con Alexa 594 de Cabra anti rata (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Las muestras se lavaron tres veces con PBS, 3 minutos cada vez, y se montaron con el medio de montaje Vectashield para fluorescencia con solución de Hoechst 33342, triclorhidrato, trihidrato 10 mg/ml en agua (Molecular Probes Inc., Eugene, O). Los portaobjetos se visualizaron en un microscopio confocal de barrido por láser Zeiss. Se obtuvieron secciones Z y secciones XZ de barrido tridimensional usando software LSM510.

Resultados experimentales

La RNasa B1 se localiza dentro de las células HUVEC. Como se muestra en las Figuras 50 a-t, la RNasa B1 penetra gradualmente en la membrana celular que se detecta por el marcador rojo de inmunotinción de CD31 y entra en la célula.

La RNasa B1 alcanza el núcleo de células de melanoma A375SM. Como se muestra en las Figuras 51a-c, mientras que en un periodo de dos horas de exposición a RNasa B1 la morfología celular cambia y se hace redondeada (Figura 51a), después de cuatro horas la RNasa B1 se ve dentro del citoplasma de algunas células (Figura 51b) y después de ocho horas alcanza los núcleos celulares (Figura 51c). Cabe mencionar que muchas de las células A375SM del melanoma muestran características apoptóticas después de 8 horas de exposición a RNasa B1 (Figura 51c).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la RNasa B1 entra en células tanto HUVEC como A375SM de melanoma e induce apoptosis en las células de melanoma. Los resultados también demuestran claramente que la penetración de RNasa B1 en las células es un proceso lento que dura varias horas, a diferencia de la respuesta inmediata vista en los tubos polínicos.

Ejemplo 18

Clonación del gen que codifica RNasa B1

El mecanismo por el que se produce RNasa B1 por el hongo *Aspergillus niger* aún no se conoce. Los genes que codifican RNasa T2 de *Aspergillus oryzae* (Ozeki *et al.* 1991. Cloning and nucleotide sequence of the genomic ribonuclease T2 gene (rntB) from *Aspergillus oryzae*. Curr Genet. 19: 367-73) y RNasa Rh de *Rhizopus niveus* (Horiuchi *et al.* 1988. Primary structure of a base non-specific ribonuclease from *Rhizopus niveus* J Biochem 103: 408-18), que son miembros de la familia RNasa T2, se han clonado. El entendimiento de la genética de RNasa B1 es muy importante, ya que el potencial para producción de proteína recombinante se aumentaría. Para estudiar la secuencia de aminoácidos de RNasa B1, se digirió en primer lugar con tripsina y quimiotripsina y se analizaron los fragmentos por Espectros de Masas de Cromatografía Líquida (LC-MS) y se compararon frente a la base de datos. Se descubrió que algunas secuencias peptídicas eran 100 % homólogas de RNasa M de *A. saitoi* (Nº de Referencia: P19791; Watanabe *et al.* 1990. Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential from *Aspergillus saitoi*. J Biochem.10: 303-310) y juntas comprendían el 60 % de la secuencia proteica (datos no mostrados). Es interesante mencionar que los taxones *saitoi* y *phoenicus* se habían clasificado previamente como variantes del grupo *A. niger* (Al-Musallam, A. 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. PhD. Thesis, State University, Utrecht, Países Bajos). Las secuencias de aminoácidos identificadas permitieron el diseño de cebadores oligonucleotídicos de ADN que pueden usarse en ADN genómico. Ya que la mayoría de los aminoácidos están codificados por al menos dos codones de nucleótidos, los presentes inventores usaron cebadores degradados que tenían baja degradación, de acuerdo con el uso codónico de *A. niger*, de la siguiente manera: cebador directo - 5'-TTYTGGGARCAAYGARTGGAAY-3' (para los aminoácidos F107-N112) (SEC ID Nº: 1) y cebador inverso - 5'-CCYTTIACRTTRAARTARTARTA-3' (complemento inverso para los aminoácidos Y200-K206) (SEC ID Nº: 2). La letra "Y" se refiere a cualquiera de los nucleótidos C o T y la letra "R" se refiere a cualquiera de los nucleótidos A o G. La desoxiinosina (I) reemplaza cualquiera de los cuatro nucleótidos.

Resultados experimentales

La banda de 400 pb importante obtenida después de la amplificación por PCR (Figura 52) se escindió del gel y se clonó en un vector pGEM-T (Promega) para análisis de secuencia de ADN. Los 300 nucleótidos que se obtuvieron crearon una fase abierta de lectura para 100 aminoácidos (Figura 53), que coincidía con la F107-K206 de la RNasa M casi completamente (excepto por la posición 123 en la que el ácido glutámico reemplazó ácido aspártico en RNasa B1 y RNasa M, respectivamente). Esta secuencia representa la región media del gen. Usando esta secuencia, se determinó la secuencia completa del gen de RNasa B1 de *Aspergillus niger* B1 (Nº de Referencia de GenBank DQ115376, SEC ID Nº: 15), y se determinó la secuencia de aminoácidos de la proteína de RNasa B1 (Nº de Referencia de GenBank AAZ22530, SEC ID Nº: 16)

Ejemplo 19

Clonación y purificación de la proteína de RNasa 6PL humana

Se ha considerado que la delección de una región del cromosoma 6 en seres humanos (6q27) está asociada con varios tumores malignos humanos (Cooke *et al.* 1996. Genes Chromosomes Cancer 15: 223-233; Saito *et al.* 1992. Cancer Res 52: 5815-5817). Se ha descubierto que esta región contiene el gen supresor de tumores potencial RNasa6PL que comparte homología con la familia de RNasa T2 (Trubia *et al.* 1997. Genomics 42: 342-344; Acquati *et al.* 2001. Meth Mol Biol 160: 87-101), incluyendo RNasa B1. Debido a las capacidades antineoplásicas de las RNasas de la familia T2, la RNasa T2 humana representa un agente altamente ventajoso para tratar el cáncer debido a su origen humano endógeno, y por lo tanto a ser óptimamente no inmunogénico y no tóxico cuando se administra a seres humanos. Para ensayar la posibilidad de que la proteína de RNasa 6PL humana se pueda usar como un agente antineoplásico, se ha sintetizado proteína de RNasa 6PL humana, de la siguiente manera.

Materiales y métodos experimentales

Expresión de la proteína de RNasa6PL humana en Pichia pastoris. La secuencia del gen para la RNasa6PL se identificó en el proyecto genoma humano (secuencia genómica: N° de Referencia de GenBank NT_007422; secuencia de ADN: N° de Referencia de GenBank NM_003730) y se presenta esquemáticamente en la Figura 54. De 28.751 pb del gen completo, solamente 719 pb forman la fase abierta de lectura. Para producir una proteína de RNasa6PL recombinante el ADN de 719 pb sintético (GenArt GmbH, Alemania) se ligó en el plásmido pPIC9K y se transformó adicionalmente en la levadura *Pichia pastoris*. Las levaduras recombinantes se cultivaron en condiciones inductoras (es decir, en presencia de metanol 1 %), y las colonias obtenidas se ensayaron con respecto a la presencia del inserto de RNasa6PL.

Purificación de la proteína de RNasa6PL humana del clon de levadura. Para purificar la proteína de RNasa6PL recombinante se fermentó una colonia positiva (es decir, una colonia que contenía el ADN de inserto de RNasa6PL) según las instrucciones del fabricante (Invitrogen Inc., Life Technologies) y el sobrenadante del medio se trató por calor (10 minutos a 90 °C) seguido de intercambio de tampón por diálisis usando Tris-HCl 20 mM pH 7. La proteína relativamente pura se cargó en una columna de Q Sepharose en una Cromatografía Líquida de Proteínas Rápida (FPLC) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido), usando una columna de 5 ml a un caudal de 5 ml/minuto. Para eluir la proteína de RNasa6PL activa, se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 1 M a la columna (durante un periodo de tiempo de 20 minutos) y se recogieron proteínas eluidas en fracciones de 0,5 ml. Como alternativa, el extracto de proteína de colonias de expresión seleccionadas se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos a 10 °C y el sobrenadante se pasó a través de filtros de 0,45 y 0,2 µm, respectivamente. El sobrenadante filtrado se hizo reaccionar de forma discontinua durante una noche con Concanavalina A inmovilizada en agarosa en perlas reticulada al 4 % (Sigma, St Louis, Estados Unidos) previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM, tampón de pH 7,4, que contenía NaCl 500 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, a 4 °C, con rotación continua. Para elución y recogida, se preparó una columna (3,5 x 1,3 cm) con la suspensión de extracto proteico-SEPHAROSE ConA, y se lavó con el tampón de equilibrado. La RNasa 6PL se eluyó después con metil α-D manopiranosido 500 mM y se recogieron fracciones de 5 ml/tubo. Se determinó la densidad óptica a 280 nm y la actividad RNasa para las fracciones, y las fracciones máximas (Figura 67a) se agruparon, dializaron y liofilizaron. La fracción purificada se analizó además después en SDS PAGE (Figura 67b).

Ensayo de actividad RNasa. Se determinó la actividad RNasa por ensayo de difusión en placas, usando ARN de levadura torula 0,1 % (p/v) (Sigma Chemicals, St Louis MO) en agarosa 1 % (p/v) como un sustrato. Se añadieron muestras de 10 µl a una placa de Petri de 15 cm de diámetro y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El sustrato se tiñó después con azul de toluidina 0,02 % (p/v) en agua. Se indicó la actividad RNasa por un halo blanco en el fondo azul.

Evaluación físico-química de RNasa6PL humana. Para temperatura óptima, se ensayó el porcentaje de actividad RNasa restante en la mezcla de reacción después de incubación de RNasa 6PL a diversas temperaturas, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, sobre el intervalo de temperaturas de 0 a 70 °C. Para pH óptimo, la actividad RNasa se midió como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en un intervalo de pH de 3,5 a 7, ajustado con tampón de Acetato Na.

Resultados experimentales

La estructura del gen de RNasa 6PL humana. La secuencia del gen para RNasa6PL se identificó en el proyecto genoma humano. Como se ilustra esquemáticamente en la Figura 54, de los 28.751 pb del gen completo, solamente 719 pb (dispuestos en 9 exones) forman la fase abierta de lectura (SEC ID N°: 3).

Identificación de un clon de levadura de RNasa6PL. La región codificante de RNasa6PL se clonó en el plásmido pPIC9K de la levadura *Pichia pastoris* y se descubrió que una colonia contenía un inserto génico de aproximadamente 750 pb (Figura 55a), lo que demuestra la clonación de una RNasa6PL recombinante en levadura.

Se produce RNasa6PL recombinante en la levadura Pichia pastoris. La colonia positiva se cultivó en condiciones adecuadas para sobreexpresar la RNasa6PL recombinante. El extracto de proteína de levadura se pasó a través de una columna de Q Sepharose en una Cromatografía Líquida de Proteínas Rápida (FPLC) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) o se purificó por afinidad por pase a través de una columna de afinidad de

SEPHAROSE ConA. La proteína eluida se ensayó en un SDS-PAGE con respecto a la presencia de una proteína de RNasa6PL. Como se muestra en la Figura 56, se obtuvo una proteína de 27 kDa de la fracción eluida, consistente en 15 mg de proteína de RNasa6PL purificada.

5 *La proteína de RNasa6PL recombinante purificada es termoestable a diversas temperaturas.* La termoestabilidad de la proteína recombinante se evaluó en un SDS-PAGE después de la incubación durante 10 minutos de la RNasa6PL a temperaturas crecientes de 55-100 °C. Como se muestra en la Figura 57a, la RNasa6PL recombinante fue estable a todas las temperaturas ensayadas.

10 *La RNasa6PL humana recombinante es catalíticamente activa a diversas temperaturas.* La actividad catalítica de la RNasa6PL recombinante se ensayó *in vitro* por su capacidad para degradar el ARN. Como se muestra en la Figura 57b, la proteína recombinante fue capaz de degradar el ARN después de la incubación de la proteína (durante 10 minutos) a diversas temperaturas de 55 a 100 °C. Cuando se evaluó en un ensayo cuantitativo de actividad ribonucleolítica de RNasa6PL, se detectó la actividad óptima a aproximadamente 50 °C (Figura 64). El pH óptimo para la actividad ribonucleolítica de RNasa6PL estaba entre 4 y 5, similar a la RNasa T2 de levadura.

En su conjunto, estos resultados demuestran el plegamiento preciso de la proteína de RNasa6PL recombinante durante la síntesis proteica en la levadura. Además, la termoestabilidad y actividad a temperatura creciente demuestran que la proteína recombinante muestra las propiedades características típicas de miembros de la familia de RNasa T2.

Ejemplo 20

La RNasa T2 humana (RNasa6PL) inhibe la formación del tubo polínico in vitro

25 El crecimiento del tubo polínico es polarizado, con el sitio de expansión centrado en la cúpula apical. Los orgánulos citoplasmáticos se mueven a lo largo del tubo polínico de una manera de fuente inversa y se concentran principalmente en el área subapical. La corriente citoplasmática y el crecimiento del tubo polínico están regulados por las proteínas citoesqueléticas, de las que la actina filamentososa (F-) desempeña un papel principal. Los filamentos de actina se disponen como haces largos a lo largo del tallo de tubo polínico y forman una red difusa en la cúpula apical. La interrupción de la estructura de F-actina conduce a la inhibición del crecimiento. Se ha mostrado que la RNasa de la familia T2 de origen vegetal inhibe el crecimiento del tubo polínico, independientemente de la actividad ribonucleolítica. Por lo tanto, a pesar del origen mamífero (humano) de la RNasa6PL, los inventores han ensayado la elongación del tubo polínico en presencia y ausencia de RNasa6PL.

Materiales y métodos

Ensayo del tubo polínico de lirios. Se mantuvieron flores de lirios (*Lilium longiflorum* Thunb. cv. Osnat) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se hizo germinar el polen de anteras con dehiscencia *in vitro* en cultivos acuosos de 100 µl que contenían sacarosa al 7 % (p/v), Ca(NO₃)₂ 1,27 mM, H₃BO₃ 0,16 mM, KNO₃ 1 mM y KH₂PO₄ 3 mM como se ha descrito en otra parte (Yokota y Shimmen 1994. Protoplasma 177: 153-162). Los cultivos de polen se complementaron con la RNasa6PL o RNasa B1 recombinante hasta una concentración proteica final de 1 µM. Se complementaron cultivos adicionales con la misma concentración de RNasas inactivadas por calor enzimáticamente (EI) (que se inactivaron por autoclave durante 20 minutos a 120 °C en presencia de 1,5 Atmósferas). Los controles negativos fueron un cultivo de levadura que contenía el plásmido pPIC9K sin el inserto de gen de RNasa6PL, sometido a los mismos procedimientos de cultivo y purificación. Después de la incubación del cultivo de polen durante 2 horas a 25 ° en oscuridad, la longitud del tubo polínico se midió microscópicamente por un micrómetro ocular.

Resultados experimentales

La RNasa6PL humana recombinante inhibe la formación del tubo polínico in vitro. La longitud del tubo polínico se usó como un ensayo funcional para el efecto angiogénico de la RNasa6PL humana recombinante en filamentos de actina de tubo polínico de lirio. Como se muestra en la Figura 58, la RNasa6PL inhibió eficazmente el crecimiento del tubo polínico en 45 % en relación con un control de proteína de levadura, similar a la inhibición conseguida con RNasa B1 (36,5 % en relación con el control).

Como se muestra adicionalmente en la Figura 58, la RNasa6PL inactivada enzimáticamente (EI-RNasa6PL), como EI-RNasa B1, desprovista de cualquier actividad RNasa, aún mantiene su efecto inhibitorio contra la elongación del tubo polínico (42 % y 55 %, respectivamente).

Estos resultados demuestran que la RNasa6PL, como las otras RNasas T2 de unión a actina, muestra un efecto inhibitorio en la formación del tubo polínico, incluso después de la inactivación por calor.

La RNasa T2 humana (RNasa6PL) muestra propiedades antiangiogénicas in vitro

La angiogénesis y formación de vasos sanguíneos son esenciales para la supervivencia y el desarrollo del cáncer (véase Vallee y Riordan 1997. Cell Mol Life Sci. 53: 803-15 y Strydom 1998. Cell Mol Life Sci. 54: 811-24, para revisiones). La angiogenina se conoce como un inductor eficaz de la angiogénesis y en algunas células cancerosas (por ejemplo HT-29) es uno de los principales factores de crecimiento. Ya que en células endoteliales la actina es un receptor de superficie celular para angiogenina, los presentes inventores han planteado la hipótesis de que la RNasa6PL puede actuar como un competidor para la angiogenina o bFGF o VEGF para inhibir la angiogénesis como se ha mostrado previamente para RNasa B1.

Ensayo de formación de tubos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 7, anteriormente en el presente documento, excepto que el medio se complementó en presencia o ausencia de factores de crecimiento [angiogenina, VEGF o bFGF (1 µg/ml)], y bien RNasa T2 de *A. niger* (RNasa B1, 10 µg/ml), RNasa T2 humana recombinante (RNasa6PL, 10 µg/ml en la Figura 58 y 0,5-10 µM en la Figura 63), medio de cultivo de levadura de control (plásmido pPIC9K solamente, Control de Levadura) o PBS.

Resultados experimentales

La RNasa6PL muestra un efecto antiangiogénico significativo en la formación del tubo de HUVEC. El efecto antiangiogénico de la RNasa6PL humana recombinante se ensayó en el ensayo de formación de tubo de HUVEC. Como se muestra en las Figuras 58a-l, la RNasa6PL, como RNasa B1, a una concentración de 10 µM, alteró significativamente la formación de tubos inducida por angiogenina o bFGF en HUVEC. Además, como se ilustra adicionalmente en la Tabla 6, a continuación en el presente documento, el efecto antiangiogénico de la RNasa6PL fue significativamente mayor que el de RNasa B1.

Tabla 6

El efecto de RNasas T2 en la formación del tubo de HUVEC			
		Factores de crecimiento	
Proteína	Control	Angiogenina	bFGF
Control	+	+++	+++
RNasa B1	+	+-	-
RNasa6PL	--	--	--
Control de levadura	+	++	++

Tabla 6: El efecto de diversas RNasas T2 en la formación de tubos de HUVEC. Se muestran los efectos relativos, concretamente, "-" (inhibición), "+ -" (inhibición moderada), "- -" (inhibición significativa), "+" (promoción), "++" (promoción significativa) de la formación de tubos de HUVEC.

La RNasa T2 humana (RNasa6PL) también inhibió significativamente la formación de tubos de células HUVE en presencia de una diversidad de factores proangiogénicos, tales como angiogenina, bFGF y VEGF (Figuras 63a-63o), en comparación con el alcance de la formación de tubos en pocillos de ensayo de control (PBS). La inhibición completa de la angiogénesis en el cultivo de células HUVE es evidente a concentraciones de RNasa6PL de 5 µM (Figuras 63d, h y n).

Las características anti angiogénicas de RNasa6PL presentadas en el presente documento son típicas de un miembro de la familia de RNasas T2, e indican fuertemente que la RNasa T2 humana, RNasa 6PL posee las mismas capacidades anti neoplásicas/antiangiogénicas de la RNasa B1.

EJEMPLO 21

La RNasa T2 de diverso origen inhibe la clonogenicidad de células cancerosas

Como se ha mostrado anteriormente en el presente documento, la RNasa B1 de *A. niger* inhibe el potencial clonogénico de células cancerosas de colon humano en un ensayo de formación de colonias *in vitro*. Para determinar si la RNasa T2 de origen ampliamente diverso mantiene fuerte similitud entre una serie de actividades características, se investigó el efecto de la RNasa T2 de origen bacteriano, de levadura y humano en la clonogenicidad de células HT-29 de cáncer de colon humano.

Materiales y métodos

Ensayo clonogénico. El ensayo de formación de colonias se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente en el presente documento, con modificaciones menores. Se cultivaron células HT-29 de cáncer de colon humano en matraces de 50 ml a una concentración de 10^5 células por matraz. El medio contenía 7 ml de DMEM complementado con FCS 10 %, glutamina 1 % y solución de antibiótico-antimicótico 1 % en presencia o ausencia de RNasa T2 de *A. niger* 1 μ M (RNasa B1), RNasa I de *E. coli* o RNasa 6PL (RNasa T2 Humana), y se cambió después de 24 horas de implantaciones celulares. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %. Después de 48 horas, se sembraron 1000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en 200 μ l de medio, en presencia o ausencia de RNasa 1 μ M y se cultivaron durante 5 días. Se contó el número de colonias. Se realizaron seis determinaciones individuales para cada RNasa.

Resultados:

La Figura 68 muestra claramente que la clonogenicidad, o el potencial de las células cancerosas humanas para organizarse en colonias, de células cancerosas humanas, está significativamente alterada por la administración de RNasa T2, independientemente de su origen. Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que se describen, para mayor brevedad, en el contexto de una única realización, pueden proporcionarse también por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roiz, Levava Schwartz, Betty Smirnov, Patricia Shoseyov, Oded

<120> RNASA T2 HUMANA RECOMBINANTE Y USOS DE LA MISMA

<130> 30062

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1

ttytgggarc aygartggaa y 21

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Inosina

<400> 2

ccytnacrt traartarta rta 23

<210> 3

<211> 719

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia codificante clonada de RNasa6PL recombinante

<400> 3

```

gaattcgggtg ctgacaagag attgagagac aaccacgaat ggaagaagtt gattatggtt      60
caacactggc cagaaactgt ttgtgaaaag attcaaaacg actgtagaga cccaccagac      120
tactggacta ttcacggatt gtggccagat aagtccgaag gttgtaacag atcctggcca      180
ttcaacttgg aggagattaa ggacttggtg ccagaaatga gagcttactg gccagatgtt      240
attcactcat tcccaaacag atctagattc tggaagcacg aatgggaaaa gcatgggtact      300
tgtgtctgctc aagttgacgc tttgaactcc caaaagaagt acttcggtag atctttggaa      360
ttgtacagag aattggattt gaactctggt ttgttgaagt tgggtatcaa gccatccatt      420
aactactacc aagttgctga cttcaaggac gctttggcta gagtttacgg tgttattcca      480
aagattcaat gtttgccacc atctcaagac gaagaagttc aaactattgg tcaaattgag      540
ttgtgtttga ctaagcaaga tcaacaattg caaaactgta ctgaaccagg tgaacaacca      600
tctccaaagc aagaggtttg gttggcta atgtgtgctg aatctagagg ttgagagtt      660
tgtgaggatg gtccagtttt ctaccacca cctaagaaaa ctaagcacta agcggccgc      719

```

5

<210> 4
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Producto de RNasa6PL recombinante

15

<400> 4

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

<210> 5

<211> 411

<212> PRT

<213> *Irpex lacteus*

<400> 5

Met Val Ala Ser Leu Val Val Leu Gly Ser Leu Ala Ala Leu Val Ser
 1 5 10 15

ES 2 524 601 T3

Ala Gly Pro Leu Ser Leu Tyr Ser Pro Ala Leu Gly Pro Met Asp Ile
 20 25 30
 Phe Lys Arg Val Asn Ser Gly Cys Gly Thr Ser Gly Ala Glu Ser Cys
 35 40 45
 Ser Asn Ser Asp Asp Gly Thr Cys Cys Phe Glu Ala Pro Gly Gly Leu
 50 55 60
 Leu Leu Gln Thr Gln Phe Trp Asp Thr Asp Pro Ser Thr Gly Pro Ser
 65 70 75 80
 Asp Ser Trp Thr Ile His Gly Leu Trp Pro Asp Asn Cys Asp Gly Thr
 85 90 95
 Phe Glu Ser Ser Cys Asp Ser Ser Arg Ala Tyr Thr Gly Ile Gly Asp
 100 105 110
 Leu Leu Thr Ala Gln Gly Ala Ser Asp Thr Leu Asp Phe Met Asn Gln
 115 120 125
 Tyr Trp Val Asp Ile Asn Gly Gln Asn Glu Gln Phe Trp Glu His Glu
 130 135 140
 Trp Ser Lys His Gly Thr Cys Tyr Ser Thr Leu Glu Thr Ser Cys Leu
 145 150 155 160
 Pro Ser Gly Ser Pro Lys Gly Ala Glu Ala Val Ala Phe Phe Gln Gln
 165 170 175
 Val Val Thr Leu Phe Lys Thr Leu Pro Thr Tyr Gln Trp Leu Ala Lys
 180 185 190
 Ala Gly Ile Thr Pro Asp Ser Ser Lys Thr Phe Thr Leu Ser Glu Ile
 195 200 205
 Thr Ser Ala Leu Lys Ser Ala Ala Gly Val Thr Pro Ala Leu Asp Cys
 210 215 220
 Asp Gly Lys Asn Leu Asn Gln Ile Ser Trp Tyr Phe His Leu Lys Gly
 225 230 235 240
 Ser Leu Leu Asp Gly Lys Phe Val Pro Ile Asp Ala Pro Lys Ala Gly
 245 250 255
 Ser Cys Ala Ser Ser Gly Leu Lys Tyr Pro Pro Lys Ser Gly Ser Ser
 260 265 270
 Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Thr Thr Thr Thr Ser Ser Gly Ser
 275 280 285
 Ser Ser Thr Gly Asn Pro Gly Ser Leu Pro Ser Lys Ala Thr Leu His
 290 295 300
 Ala Ser Thr Gly Gly Leu Leu Ser Ala Gly Thr Trp Ser Thr Gln Thr
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Tyr Thr Ile Ser Gly Ser Ser Ser Ser Phe Thr Leu Lys
 325 330 335

ES 2 524 601 T3

```

Thr Ser Lys Gly Ser Cys Gly Val Val Ser Ser Gly Gln Phe Glu Cys
      340                      345                350

Gly Ser Gly Val Ser Ala Thr Thr Phe Ser Ala Val Thr Ser Gly Ser
      355                      360                365

Ser Leu Leu Leu Ala Ser Gly Gly Ser Thr Lys Trp Ser Ser Asp Gly
      370                      375                380

Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Glu Ala Ile Phe Thr Gly Ser Gly His
      385                      390                395                400

Gly Thr Ser Leu Thr Leu Ser Ile Val Ser Ala
      405                      410

```

5

<210> 6
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus saitoi*

 <400> 6

Thr Ile Asp Thr Cys Ser Ser Asp Ser Pro Leu Ser Cys Gln Thr Asp
1 5 10 15

Asn Glu Ala Ser Cys Cys Phe Asn Ser Pro Gly Gly Ser Leu Leu Gln
20 25 30

Thr Gln Phe Trp Asp Tyr Asp Pro Ser Asp Gly Pro Ser Asp Ser Trp
35 40 45

Thr Ile His Gly Leu Trp Pro Asp Asn Cys Asp Gly Ser Tyr Gln Glu
50 55 60

Tyr Cys Asp Asp Ser Arg Glu Tyr Ser Asn Ile Thr Ser Ile Leu Glu
65 70 75 80

Ala Gln Asp Arg Thr Glu Leu Leu Ser Tyr Met Lys Glu Tyr Trp Pro
85 90 95

Asp Tyr Glu Gly Ala Asp Glu Asp Glu Ser Phe Trp Glu His Glu Trp
100 105 110

Asn Lys His Gly Thr Cys Ile Asn Thr Ile Asp Pro Ser Cys Tyr Thr
115 120 125

Asp Tyr Tyr Ala Gln Glu Glu Val Gly Asp Phe Phe Gln Gln Val Val
130 135 140

Asp Leu Phe Lys Thr Leu Asp Ser Tyr Thr Ala Leu Ser Asp Ala Gly
145 150 155 160

Ile Thr Pro Ser Glu Asp Ala Thr Tyr Lys Leu Ser Asp Ile Glu Asp
165 170 175

Ala Leu Ala Ala Ile His Asp Gly Tyr Pro Pro Tyr Val Gly Cys Glu
180 185 190

Asp Gly Ala Leu Ser Gln Leu Tyr Tyr Tyr Phe Asn Val Lys Gly Ser
195 200 205

Ala Ile Gly Gly Thr Tyr Val Ala Ser Glu Arg Leu Glu Asp Ser Asn
210 215 220

Cys Lys Gly Ser Gly Ile Lys Tyr Pro Pro Lys Ser Ser Ser
225 230 235

<210> 7
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> *Syncephalastrum racemosum*
 <400> 7

Ala Asp Ser Cys Pro Ala Asp Ala Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Gly
1 5 10 15

Asp Ser Cys Cys Ser Pro Thr Asn Gly Leu Leu Val Leu Val Gln Gln
20 25 30

Trp Leu Lys Asp Tyr Gly Pro Asn Thr Ala Phe Thr Leu His Gly Leu
35 40 45

Trp Pro Asp Thr Cys Ser Gly Gly Ile Pro Gly Ser Gly Asn Thr Gly
50 55 60

Cys Asp Ser Ser Arg Asn Val Asp Asp Val Gly Ser Val Ile Lys Ser
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ser Leu Tyr Ser Gln Met Ser Gln Tyr Trp Pro Ser Tyr
85 90 95

Thr Gly Asp Asn Ser Glu Phe Trp Thr His Glu Trp Asn Lys His Gly
100 105 110

Thr Cys Val Thr Thr Leu Asp Pro Asp Cys Phe Gly Ala Ser Tyr Thr
115 120 125

Asp Asn Glu Asp Met Phe Thr Tyr Phe Gln Gln Ala Ile Asp Leu Arg
130 135 140

Ala Lys Tyr Asn Leu Tyr Thr Ile Leu Lys Asp Ala Gly Ile Thr Pro
145 150 155 160

Gly Gly Ser Tyr Ser Val Ser Ala Leu Glu Ser Ala Ile Glu Lys Ser
165 170 175

Thr Gly Ser Thr Pro Lys Ile Thr Cys Ser Ser Gly Ala Ile Ser Glu
180 185 190

Ile Trp Leu Tyr Phe His Val Lys Gly Thr Asp Ser Tyr Val Pro Thr
195 200 205

Asp Ala Val Asp Lys Ser Thr Cys Ser Gly Thr Val Ile Tyr Pro Ala
210 215 220

Lys Ser
225

<210> 8
<211> 325
<212> PRT
<213> *Candida albicans*

<400> 8

ES 2 524 601 T3

Met Leu Ser Gln Ser Phe Leu Ile Ala Leu Ala Val Ile Pro Val Thr
1 5 10 15

Leu Ala Ser Pro Tyr Tyr Asn Pro Tyr Phe Gly Lys Tyr Phe His Gly
20 25 30

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

Lys Asp Cys Ser Ala Phe Ile Asp Gln Asn Pro Glu Thr Ser Trp Ser
50 55 60

Cys His Asn Lys Ser Pro Val Ser Ser Ala Asn Ser Cys Cys Phe Glu
65 70 75 80

Glu Asn Gly Ile Ile Leu Ser Thr Gln Phe Trp Asp Tyr Asn Thr Thr
85 90 95

Leu Leu Glu Ile Ala Val Asn Gly Ser Thr Ser Asp Ile Val Glu Ala
100 105 110

Glu Leu Lys Ser Lys Leu Asp Thr Val Tyr Asn Asp Leu Ser Arg Thr
115 120 125

Phe Thr Ile His Gly Thr Trp Asp Asp Phe Cys Asn Gly Ser Tyr Pro
130 135 140

Gln Tyr Cys Asn Lys Ser Leu Glu Val Ser Asp Glu Lys Asp Asn Leu
145 150 155 160

Thr His Ile Leu Val Asp Gln Phe Lys Glu Val Glu Leu Tyr Asn Ile
165 170 175

Met Ser Lys Tyr Trp Ile Asp Thr Ile Ala Ser Asn Val Asp Ser Ser
180 185 190

Ala Ser Thr Ala Leu Trp Glu His Glu Tyr Asn Lys His Gly Thr Cys
195 200 205

Met Thr Thr Leu Ser Pro Ser Cys Phe Thr Ser Gln Ser Tyr Thr Arg
210 215 220

Phe Glu Asn Val Val Asn Phe Tyr Lys Lys Thr Val Glu Ile Trp Ser
225 230 235 240

Gln Leu Asp Thr Phe Glu Phe Leu Ala Ala Ala Gly Ile Tyr Pro Thr
245 250 255

Val Ser Arg Lys Tyr Lys Leu Ser Gln Val Gln Glu Ala Leu Gln Lys
260 265 270

Ala His Gly Ala Glu Val Tyr Val Gly Cys Leu Asn Asn Ser Ile Ser
275 280 285

Glu Ile Trp Tyr Phe Tyr Asn Leu Gln Gly Ser Ile Leu Thr Gly Thr
290 295 300

Tyr Lys Pro Ile Asp Thr Thr Thr Asn Thr Lys Cys Lys Asp Glu Val

ES 2 524 601 T3

305 310 315 320

Trp Tyr Ile Pro Lys
325

<210> 9
<211> 256
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

ES 2 524 601 T3

<210> 10
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

5

<400> 10

```

His Glu Trp Lys Lys Leu Ile Met Val His His Trp Pro Met Thr Val
 1          5          10          15

Cys Asn Glu Lys Asn Cys Glu His Pro Pro Asp Tyr Trp Thr Ile His
          20          25          30

Gly Leu Trp Pro Asp Lys Ser Gly Glu Cys Asn Arg Ser Trp Pro Phe
          35          40          45

Asn Pro Asp Glu Ile Lys Gly Leu Leu Pro Asp Met Arg Leu Tyr Trp
          50          55          60

Pro Asp Val Leu His Ser Ser Pro Asn His Ser Val His Phe Trp Arg
          65          70          75          80

His Glu Trp Glu Lys His Gly Thr Cys Ala Ala Gln Leu Asp Ala Leu
          85          90          95

Asn Ser Gln Arg Lys Tyr Phe Gly Lys Thr Leu Asp Leu Tyr Lys Glu
          100          105          110

Leu Ala Leu Asn Ser Thr Leu Gln Lys Leu Gly Ile Lys Pro Ser Ile
          115          120          125

Ser Tyr Tyr Gln Ile Ser Asp Ile Lys His Ala Leu Val Gly Val Tyr
          130          135          140

Gly Val Val Pro Lys Val Gln Cys Leu Pro Pro Lys Ser Gly Glu Lys
          145          150          155          160

Val Gln Thr Leu Gly Gln Ile Glu Leu Cys Leu Thr Arg Asp Leu Gln
          165          170          175

Leu Gln Asp Cys Pro Glu Pro Gly Leu Glu Ile Cys Glu Asp Gly Pro
          180          185          190

Val Phe Tyr Pro Pro Pro Lys Glu
          195          200
  
```

10

<210> 11
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 11

Met Ala Pro Ala Glu Ala Arg Gly Ala Leu Pro Gly Trp Ile Ser Val
1 5 10 15

Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Cys Ser Leu Cys Gly Ala Gly Pro Leu
20 25 30

Trp Ser Gly Ser His Glu Trp Lys Lys Leu Ile Leu Thr Gln His Trp
35 40 45

Pro Pro Thr Val Cys Lys Glu Val Asn Ser Cys Gln Asp Ser Leu Asp
50 55 60

Tyr Trp Thr Ile His Gly Leu Trp Pro Asp Arg Ala Glu Asp Cys Asn
65 70 75 80

Gln Ser Trp His Phe Asn Leu Asp Glu Ile Lys Asp Leu Leu Arg Asp
85 90 95

Met Lys Ile Tyr Trp Pro Asp Val Ile His Arg Ser Ser Asn Arg Ser
100 105 110

Gln Phe Trp Lys His Glu Trp Val Lys His Gly Thr Cys Ala Ala Gln
115 120 125

Val Asp Ala Leu Asn Ser Glu Lys Lys Tyr Phe Gly Lys Ser Leu Asp
130 135 140

Leu Tyr Lys Gln Ile Asp Leu Asn Ser Val Leu Gln Lys Phe Gly Ile
145 150 155 160

Lys Pro Ser Ile Asn Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Phe Lys Asp Ala Leu
165 170 175

Thr Arg Ile Tyr Gly Val Val Pro Lys Ile Gln Cys Leu Met Pro Glu
180 185 190

Gln Gly Glu Ser Val Gln Thr Val Gly Gln Ile Glu Leu Cys Phe Thr
195 200 205

Lys Glu Asp Leu His Leu Arg Asn Cys Thr Glu Pro Gly Glu Gln Leu
210 215 220

Ser Ser Arg Gln Glu Ala Trp Leu Ala Met Glu Ala Ser Thr His Gly
225 230 235 240

Met Met Val Cys Glu Asp Gly Pro Ile Phe Tyr Pro Pro Pro Thr Lys
245 250 255

Thr Gln His

<210> 12
<211> 221
<212> PRT
<213> *Todarodes pacificus*

<400> 12

ES 2 524 601 T3

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

<210> 13
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> *Malus domestica*

<400> 13

ES 2 524 601 T3

Met Gly Ile Thr Gly Met Ile Tyr Met Val Thr Met Val Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ile Val Leu Ile Leu Ser Ser Pro Thr Val Gly Tyr Asp Tyr Phe Gln
20 25 30

Phe Thr Gln Gln Tyr Gln Pro Ala Val Cys His Phe Asn Pro Thr Pro
35 40 45

Cys Arg Asp Pro Pro Asp Lys Leu Phe Thr Val His Gly Leu Trp Pro
50 55 60

Ser Asn Ser Ser Gly Asn Asp Pro Ile Tyr Cys Lys Asn Thr Thr Met
65 70 75 80

Asn Ser Thr Lys Ile Ala Asn Leu Thr Ala Arg Leu Glu Ile Ile Trp
85 90 95

Pro Asn Val Leu Asp Arg Thr Asp His Ile Thr Phe Trp Asn Lys Gln
100 105 110

Trp Asn Lys His Gly Ser Cys Gly His Pro Ala Ile Gln Asn Asp Met
115 120 125

His Tyr Leu Gln Thr Val Ile Lys Met Tyr Ile Thr Gln Lys Gln Asn
130 135 140

Val Ser Glu Ile Leu Ser Lys Ala Lys Ile Glu Pro Val Gly Lys Phe
145 150 155 160

Arg Thr Gln Lys Glu Ile Glu Lys Ala Ile Arg Lys Gly Thr Asn Asn
165 170 175

Lys Glu Pro Lys Leu Lys Cys Gln Lys Asn Ser Gln Arg Thr Glu Leu
180 185 190

Val Glu Val Thr Ile Cys Ser Asp Arg Asn Leu Asn Gln Phe Ile Asp
195 200 205

Cys Pro Arg Pro Ile Leu Asn Gly Ser Arg Tyr Tyr Cys Pro Thr Asn
210 215 220

Asn Ile Leu Tyr
225

<210> 14
<211> 313
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 14

Met Ser Val Lys Gly Glu Ala Gly Ala His Ala Pro Leu Arg Ser Leu
1 5 10 15

Ala Glu Gly Ser Lys His Thr Asp Trp Arg Lys Pro Glu Val Lys Ser
20 25 30

Arg Trp Arg Ser Val Trp Leu Pro Ser Glu Arg Ala Gln Arg Pro Leu
35 40 45

Gly Ser Cys Gly Ala Arg Asp Ser Ala Met Ala Glu Ala Arg Gly Ala
50 55 60

Leu Pro Gly Trp Val Ser Val Leu Gly Trp Gly Leu Ala Leu Cys Cys
65 70 75 80

Leu Cys Gly Ala Gly Pro Leu Trp Ser Gly Ser His Glu Trp Lys Lys
85 90 95

Leu Ile Leu Thr Gln His Trp Pro Pro Thr Val Cys Lys Glu Val Asn
100 105 110

Arg Cys Arg Asp Ser Leu Asp Tyr Trp Thr Ile His Gly Leu Trp Pro
115 120 125

Asp Arg Ala Glu Asp Cys Asn His Ser Trp His Phe Asn Leu Asn Glu
130 135 140

Ile Lys Asp Leu Leu Arg Asp Met Lys Ile Tyr Trp Pro Asp Val Ile
145 150 155 160

His Pro Ser Ser Asn Arg Ser Gln Phe Trp Lys His Glu Trp Asp Lys
165 170 175

His Gly Thr Cys Ala Ala Gln Val Asp Ala Leu Asn Ser Glu Arg Lys
180 185 190

Tyr Phe Gly Lys Ser Leu Asp Leu Tyr Lys Gln Ile Asp Leu Asn Ser
195 200 205

Val Leu Gln Lys Phe Glu Ile Lys Pro Ser Ile Asn Tyr Tyr Gln Leu
210 215 220

Ala Asp Phe Lys Asp Ala Leu Thr Arg Ile Tyr Gly Val Val Pro Lys
225 230 235 240

Ile Gln Cys Leu Met Pro Glu Gln Gly Glu Asn Val Gln Thr Ile Gly
245 250 255

Gln Ile Glu Leu Cys Phe Thr Lys Glu Asp Phe His Leu Arg Asn Cys
260 265 270

Thr Glu Pro Glu Glu Gln Pro Ser Ser Gly Gln Glu Ala Arg Leu Ala
275 280 285

Arg Glu Ala Ser Thr His Gly Met Met Val Cys Glu Asp Gly Pro Ile
290 295 300

Phe Tyr Pro Pro Pro Lys Ser Gln His
305 310

<210> 15
 <211> 1021
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 15

```

atgtctttcc ttccttctgt gggcatgctc gccctgggag caatgcagct cagctctggt    60
gcgctgggta ccattgacac ttgctcttct gacagccctc tgagctgcca gaccgacaac    120
gaagcttctt gctgcttcaa ctctcctgga ggctcccttc tccagactca attctgggac    180
tacgaccctt ccgatggccc gagcggctct tggaccatcc acggactttg gtaggaccgg    240
cacaccgat ctctgtatca tcgctaata gctttccagg cccgataact gcgatggcac    300
ctaccaggag tactgcgacg aatctcgcga gtacagcaac atcacttcca ttctcgaagc    360
gcagaatcgc accgagctcc tgtctacat gaaggaatac tggcccgact acgaggggtgc    420
tgatgaggat gagagtttct gggagcacga gtggaacaag cacgtatgtc tgatcaacct    480
gattcgggaa ctggcatatt gactttctag ggaacttgca tcaacaccat tgagcccagc    540
tgctacaccg actactacgc tcaggaggaa gttggtgact ttttccagca ggtcgttgac    600
ctttttaaga ccttggattc ctacaccgta tgcaaataac cccttctggt ctcatctata    660
ggtactgaca gcagcaggct ctctccgacg ccggaattac tccctccgag gatgccacct    720
acaagctgag cgacattgag gatgctctcg ccgcatcca cgatggctac cccccgtatg    780
tcgggtgcga ggacggtgct ctgtcccagc totactatta ctccaacgct aagggttagcg    840
ccatcggcgg cacctacggt gcttctgaga gacgtaagtt atattcaatt ggaatataag    900
acacaaactg atttattgta ccagtcgagg actccaactg caaggactct gccatcaagt    960
acccgcccaa gtacagctcc agcaagaaga tctatggatc ctccctatag tgagaatccc   1020
g                                           1021
    
```

g

10

<210> 16
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*

15

<400> 16

Met Ser Phe Leu Pro Ser Val Gly Met Leu Ala Leu Gly Ala Met Gln

ES 2 524 601 T3

1	5	10	15
Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ala Thr Ile Asp Thr Cys Ser Ser Asp Ser	20	25	30
Pro Leu Ser Cys Gln Thr Asp Asn Glu Ala Ser Cys Cys Phe Asn Ser	35	40	45
Pro Gly Gly Ser Leu Leu Gln Thr Gln Phe Trp Asp Tyr Asp Pro Ser	50	55	60
Asp Gly Pro Ser Gly Ser Trp Thr Ile His Gly Leu Trp Pro Asp Asn	65	70	75
Cys Asp Gly Thr Tyr Gln Glu Tyr Cys Asp Glu Ser Arg Glu Tyr Ser	85	90	95
Asn Ile Thr Ser Ile Leu Glu Ala Gln Asn Arg Thr Glu Leu Leu Ser	100	105	110
Tyr Met Lys Glu Tyr Trp Pro Asp Tyr Glu Gly Ala Asp Glu Asp Glu	115	120	125
Ser Phe Trp Glu His Glu Trp Asn Lys His Gly Thr Cys Ile Asn Thr	130	135	140
Ile Glu Pro Ser Cys Tyr Thr Asp Tyr Tyr Ala Gln Glu Glu Val Gly	145	150	155
Asp Phe Phe Gln Gln Val Val Asp Leu Phe Lys Thr Leu Asp Ser Tyr	165	170	175
Thr Ala Leu Ser Asp Ala Gly Ile Thr Pro Ser Glu Asp Ala Thr Tyr	180	185	190
Lys Leu Ser Asp Ile Glu Asp Ala Leu Ala Ala Ile His Asp Gly Tyr	195	200	205
Pro Pro Tyr Val Gly Cys Glu Asp Gly Ala Leu Ser Gln Leu Tyr Tyr	210	215	220
Tyr Phe Asn Val Lys Gly Ser Ala Ile Gly Gly Thr Tyr Val Ala Ser	225	230	235
Glu Arg Leu Glu Asp Ser Asn Cys Lys Asp Ser Gly Ile Lys Tyr Pro	245	250	255
Pro Lys Tyr Ser Ser Ser Lys Lys Ile Tyr Gly Ser Ser Leu	260	265	270

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de ribonucleasa aislada de la familia T2 como se expone en SEC ID N°: 4, en la que la actividad ribonucleasa se inactiva por calor mediante autoclave y tiene actividad de unión a actina.
2. La proteína de ribonucleasa aislada de la familia T2 de la reivindicación 1, en la que dicha proteína de ribonucleasa tiene una actividad antineoplásica.
- 10 3. La proteína de ribonucleasa de la reivindicación 1 o 2 para su uso en la prevención, inhibición o inversión en un sujeto mamífero que lo necesite, de un trastorno o enfermedad asociado con células de proliferación anómala seleccionado del grupo que consiste en hiperproliferación, tumorigénesis, crecimiento tumoral, colonización y angiogénesis.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, la proteína de ribonucleasa de la familia T2 de la reivindicación 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. La proteína de ribonucleasa de la reivindicación 3, en la que dicho trastorno o enfermedad se selecciona del grupo que consiste en papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt, artritis, artritis reumatoide, retinopatía diabética, angiogénesis, reestenosis, reestenosis en endoprótesis y reestenosis de injerto vascular, vitreorretinopatía proliferativa, enfermedad proliferativa inflamatoria crónica, dermatofibroma y psoriasis.
- 25 6. La proteína de ribonucleasa de la reivindicación 3 o 5, en la que dicha proteína de ribonucleasa se diseña para administrar al sujeto por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en administración oral, administración intravenosa, administración subcutánea, administración sistémica, administración tópica, administración transmucosa, administración parenteral, administración rectal e inhalación.
- 30 7. La proteína de ribonucleasa de la familia T2 de la reivindicación 1 o 2 para uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto que lo necesite.
8. La proteína de ribonucleasa de la reivindicación 7, en la que dicho tumor es un tumor metastásico.
- 35 9. La proteína de ribonucleasa de la reivindicación 7 u 8, diseñada para administración por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en administración oral, administración intravenosa, administración subcutánea, administración sistémica, administración tópica, administración transmucosa, administración parenteral, administración rectal e inhalación.
- 40 10. Un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y:
 - (a) la proteína de ribonucleasa de la reivindicación 1 o 2 y
 - (b) al menos un agente quimioterapéutico, en el que dicha proteína de ribonucleasa es capaz de potenciar
 - 45 adicionalmente la actividad de dicho agente quimioterapéutico de una manera sinérgica;
 - en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta o prospecto que indica que dicha proteína de ribonucleasa o dicho polinucleótido y dicho agente quimioterapéutico son para el tratamiento de cáncer en un sujeto.

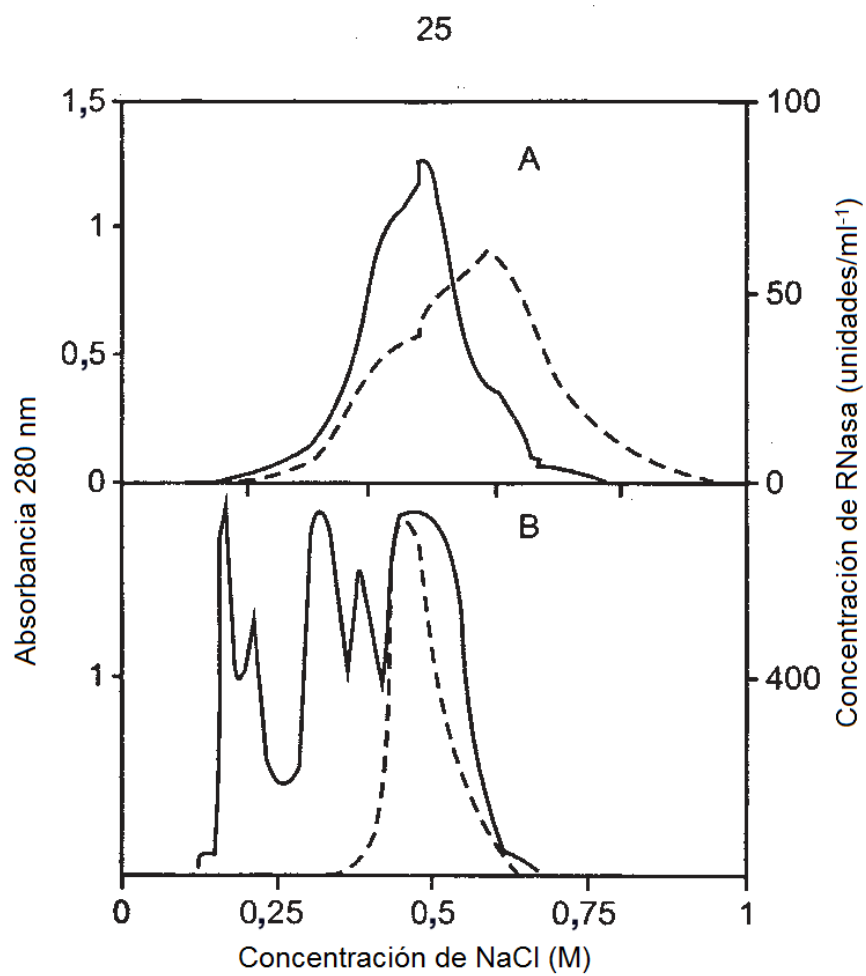


Fig. 1

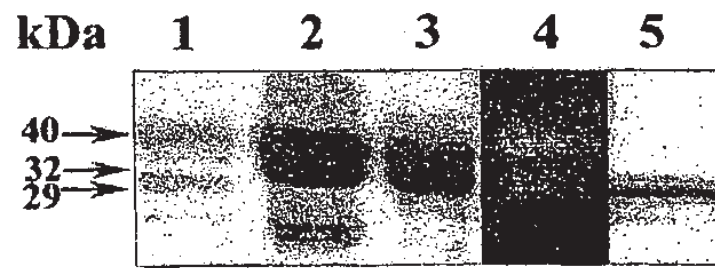


Fig. 2

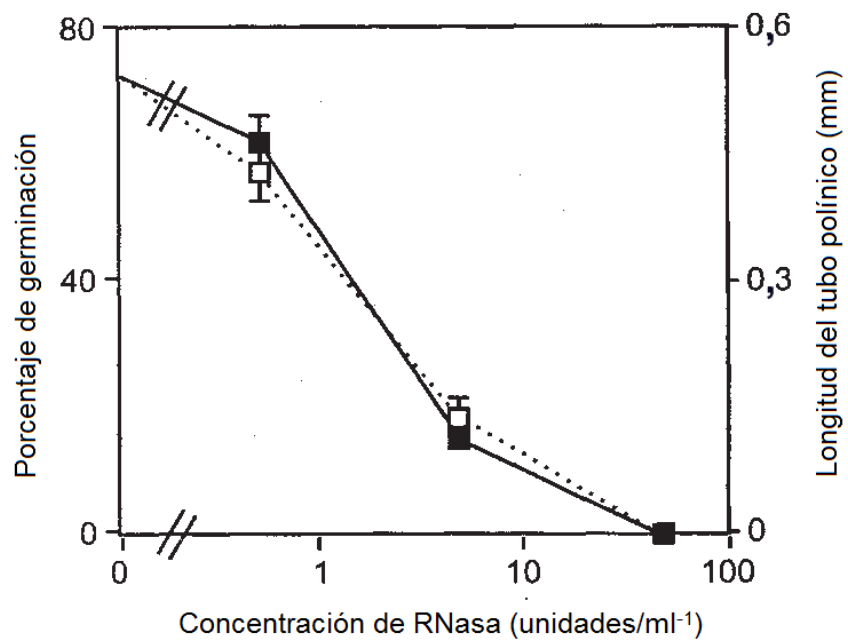


Fig. 3

Fig. 4a



Fig. 4b

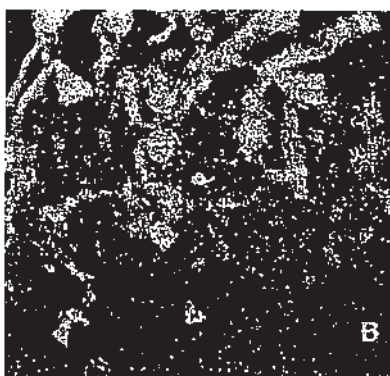


Fig. 5a

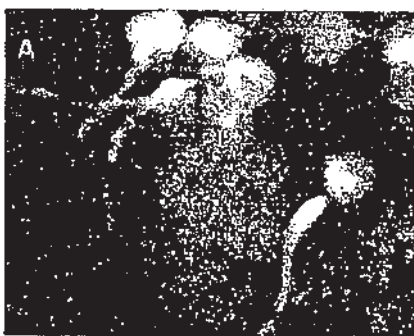


Fig. 5b

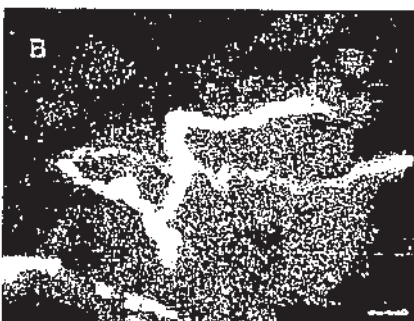


Fig. 6a

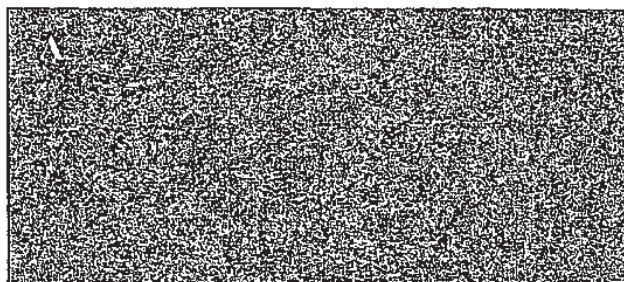


Fig. 6b

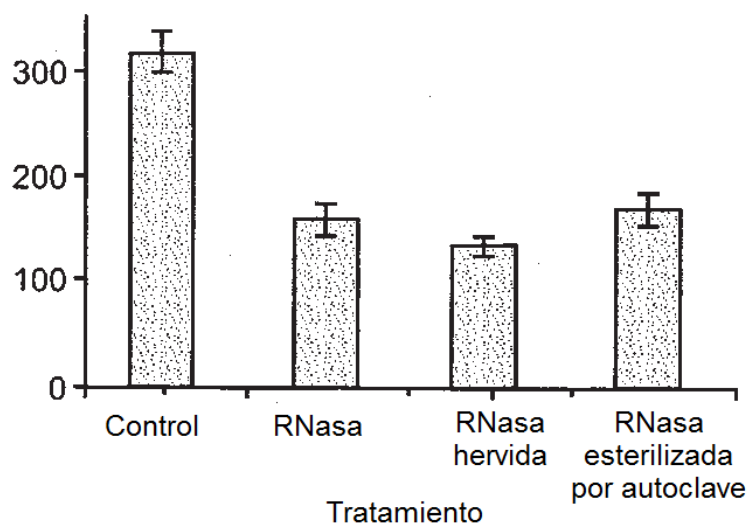
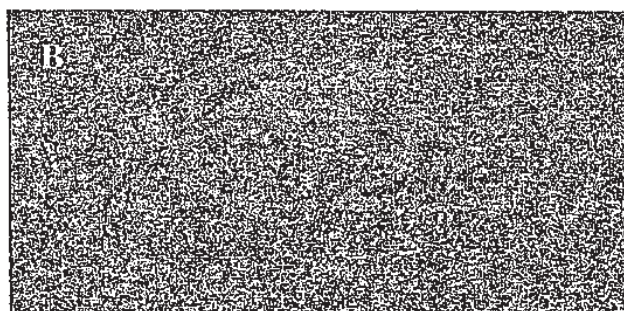


Fig. 7

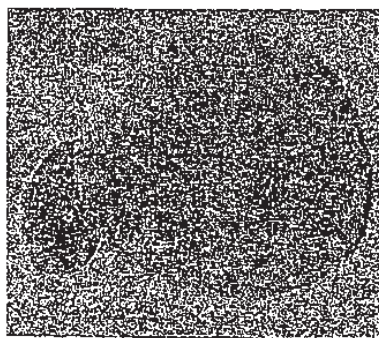


Fig. 8a

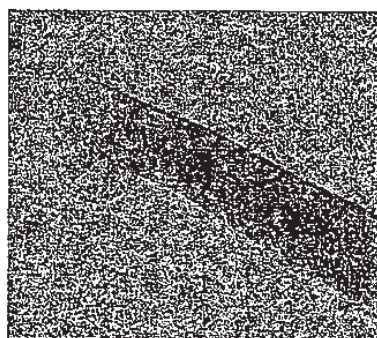


Fig. 8b

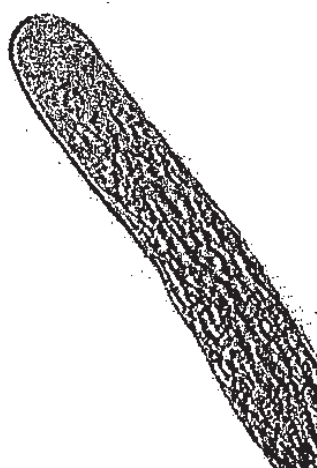


Fig. 9a



Fig. 9b



Fig. 10a

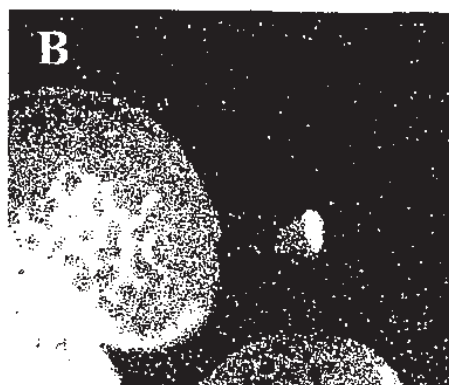


Fig. 10b

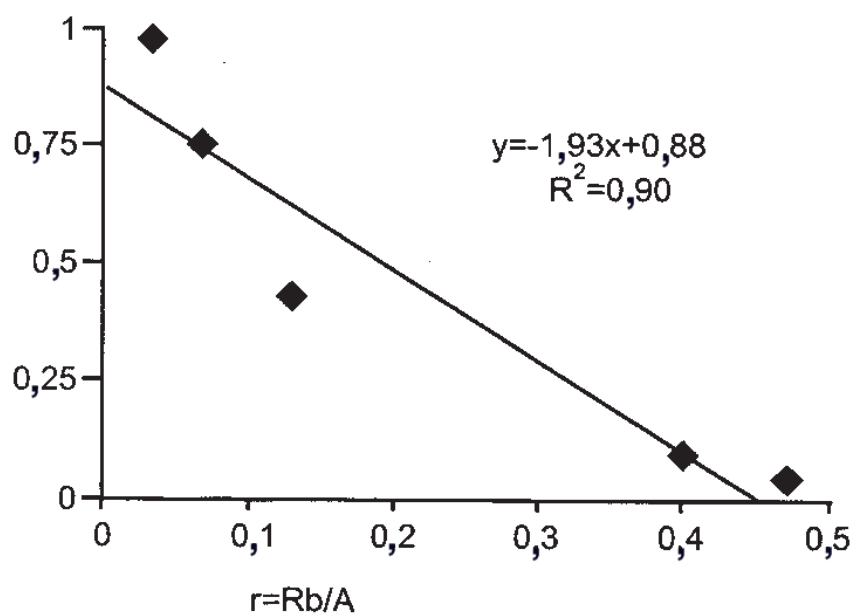


Fig. 11

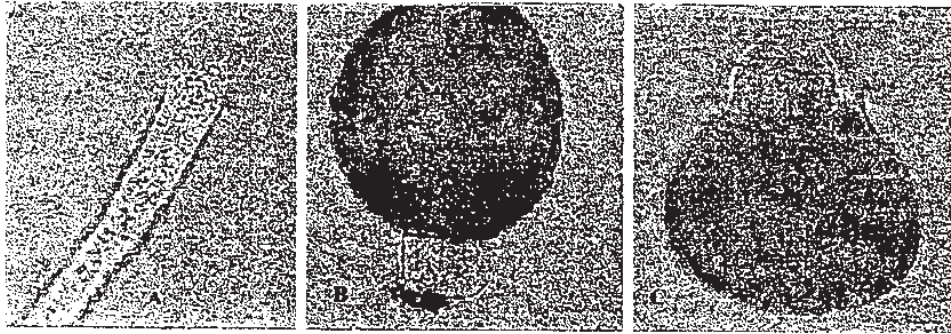


Fig. 12a

Fig. 12b

Fig. 12c

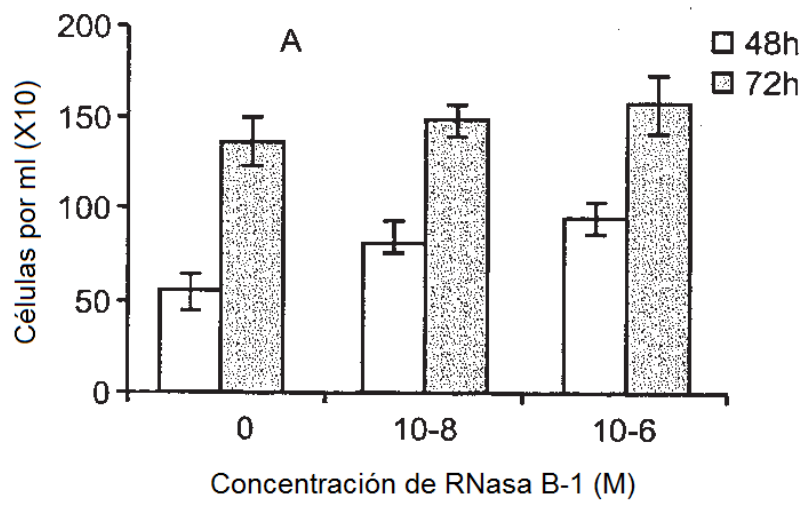


Fig. 13a

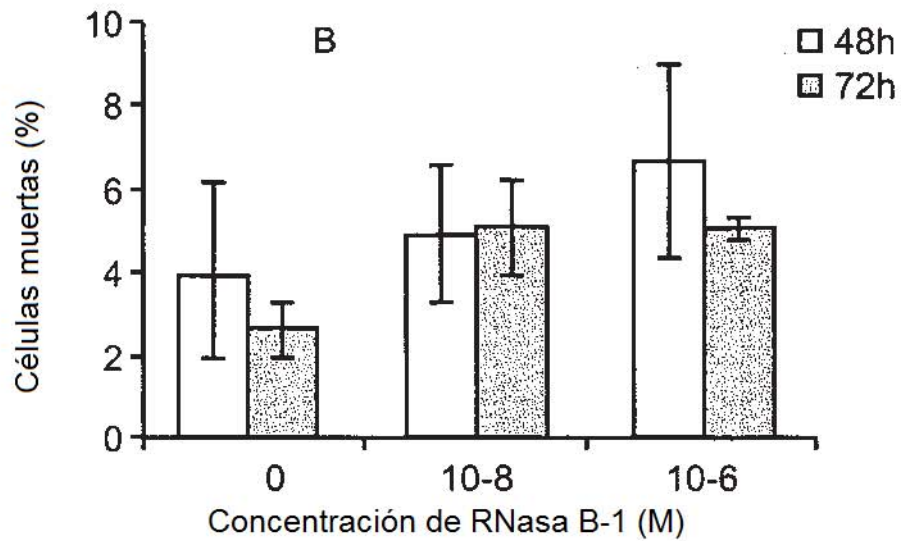


Fig. 13b

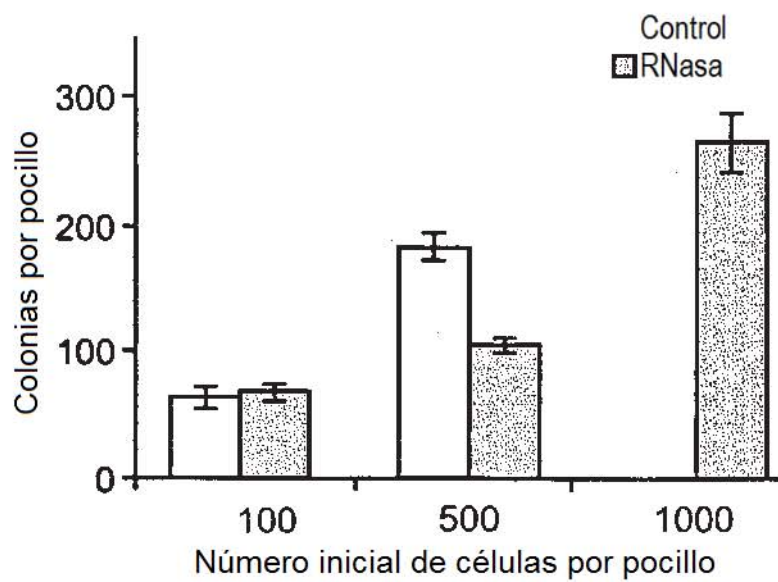


Fig. 14

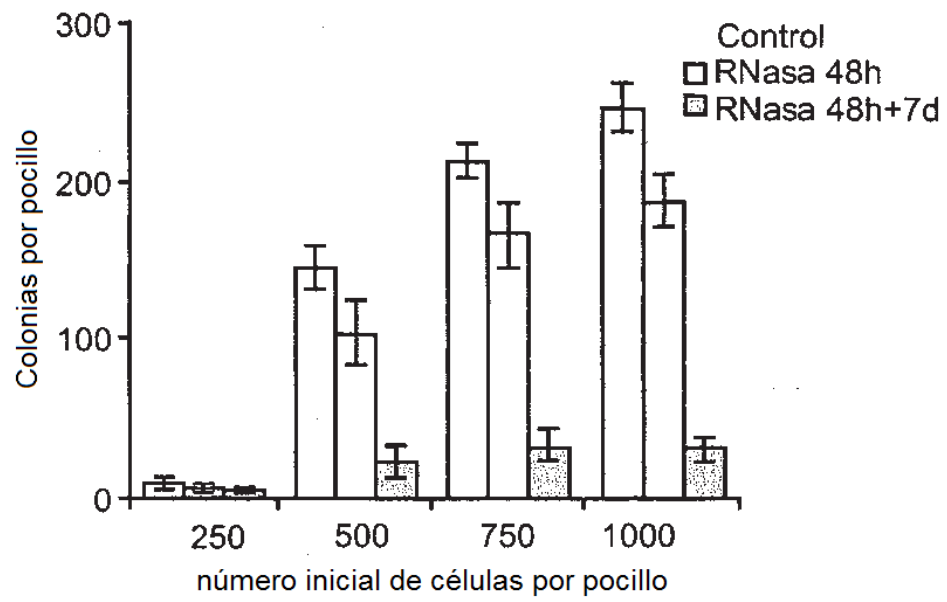


Fig. 15

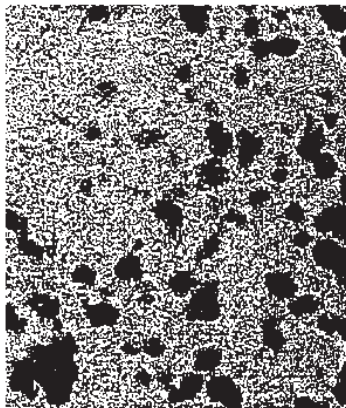


Fig. 16a

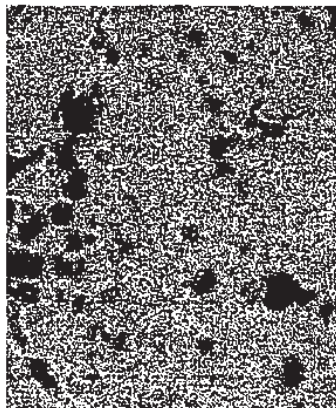


Fig. 16b

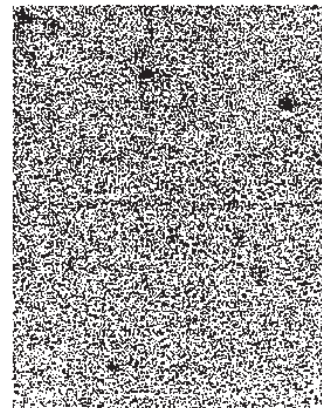


Fig. 16c

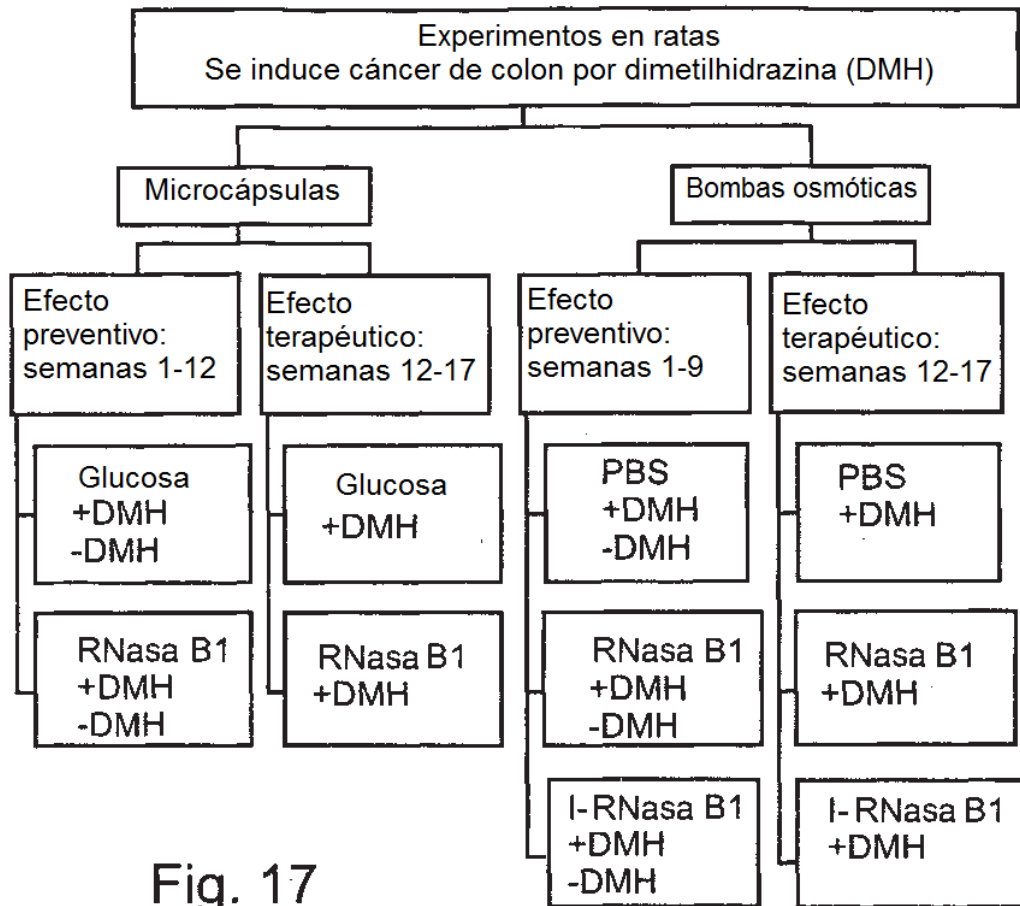


Fig. 17

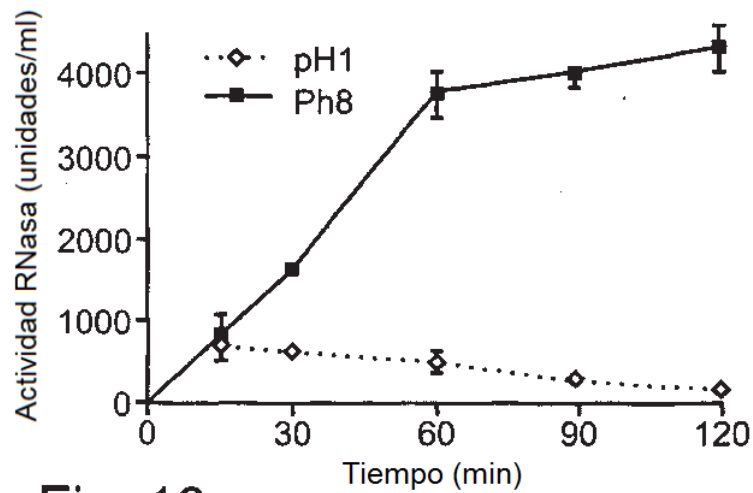


Fig. 18

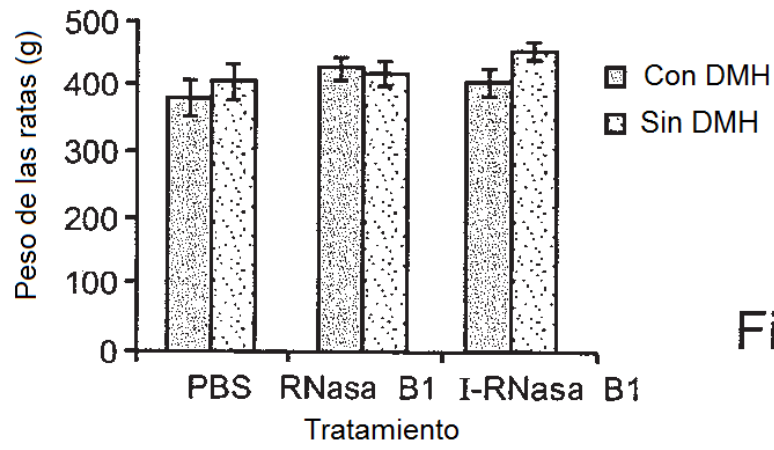


Fig. 19a

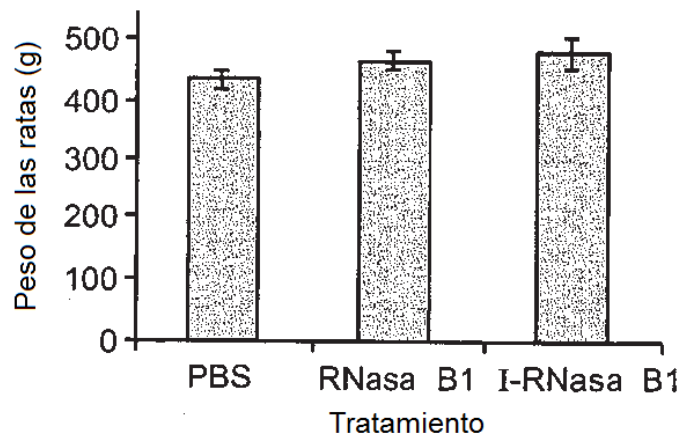


Fig. 19b

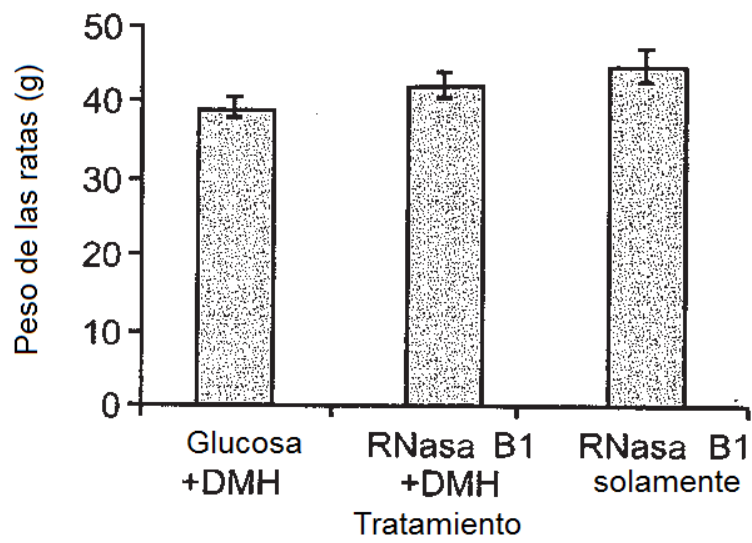


Fig. 19c

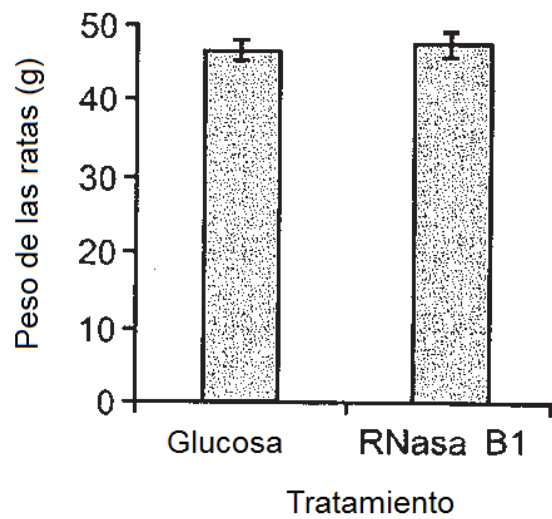


Fig. 19d

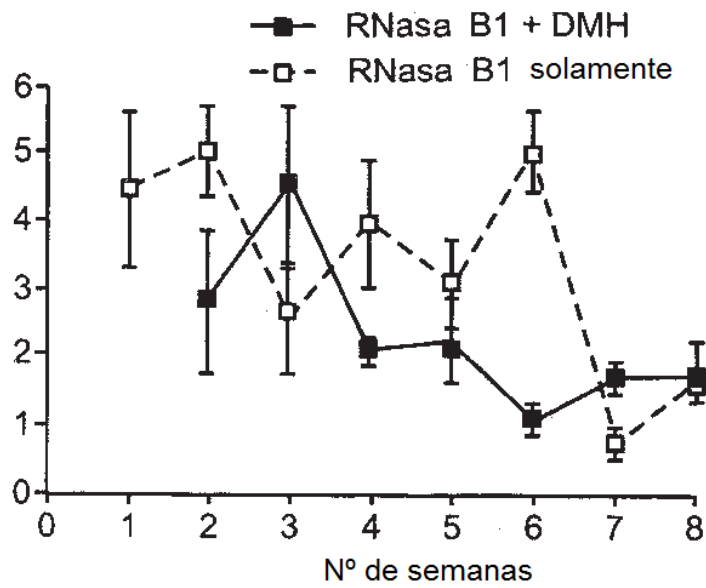


Fig. 20a

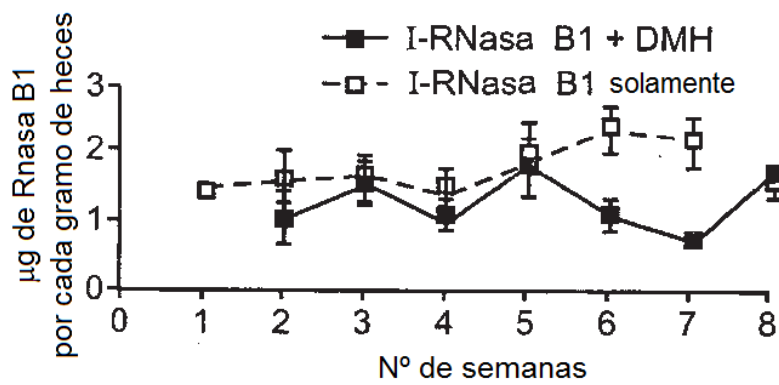


Fig. 20b

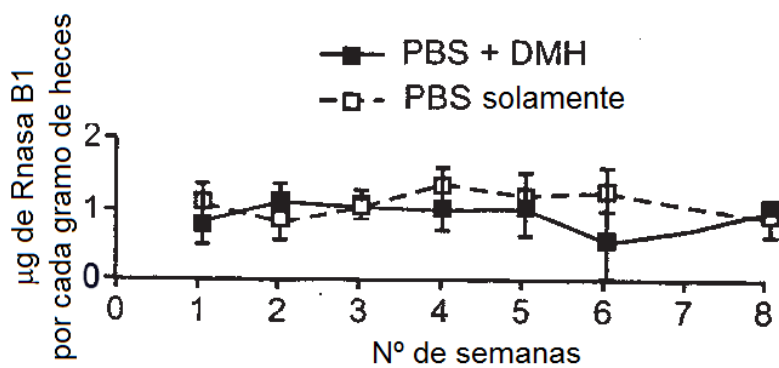


Fig. 20c

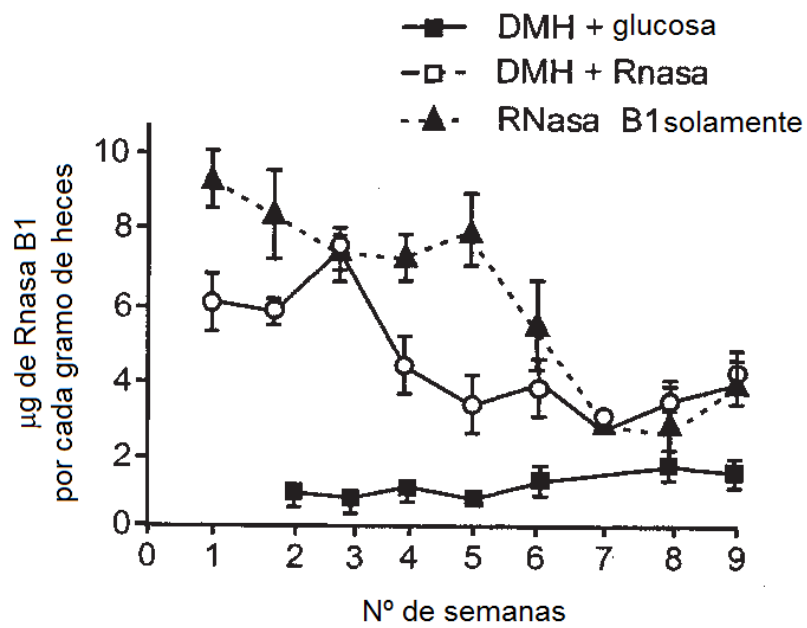


Fig. 21

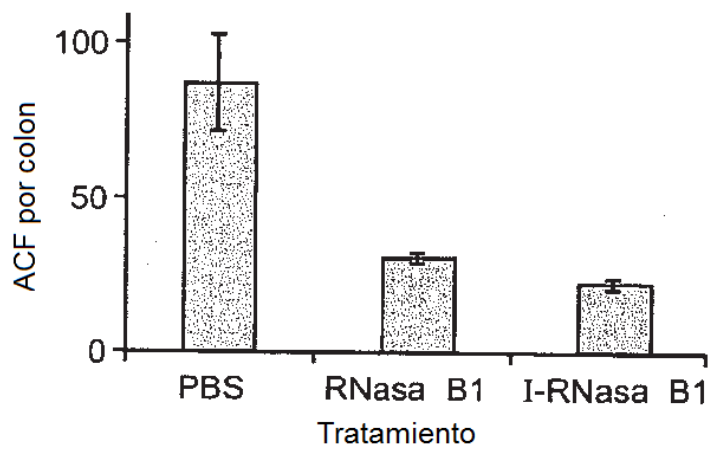


Fig. 22

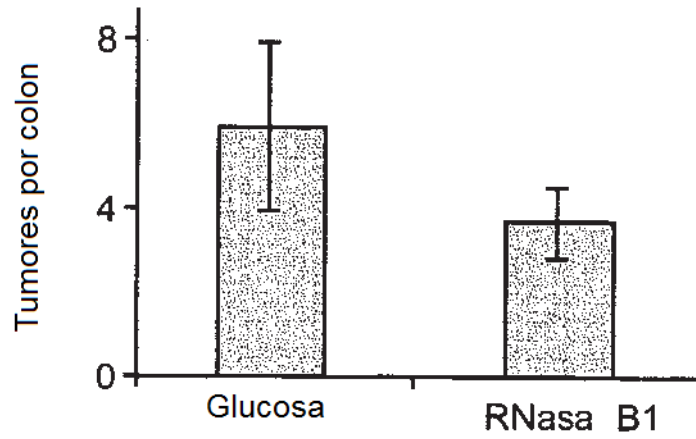


Fig. 23a

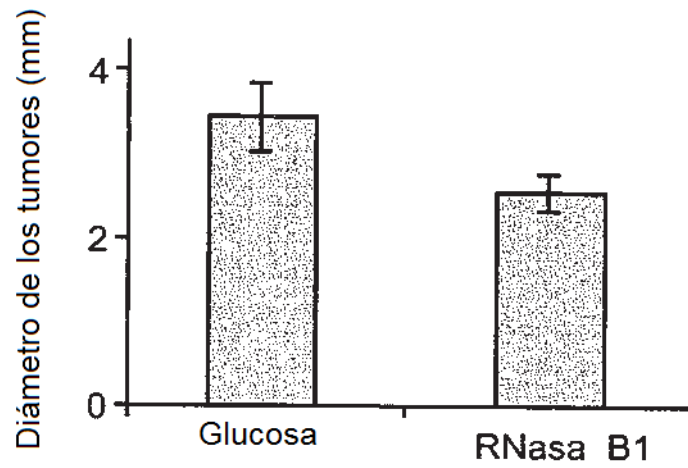


Fig. 23b

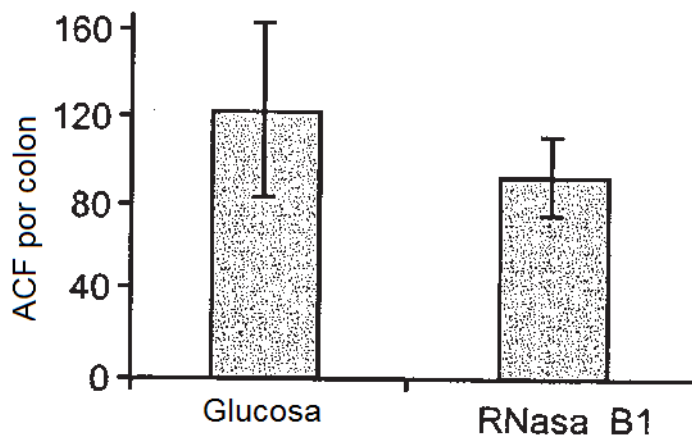


Fig. 23c

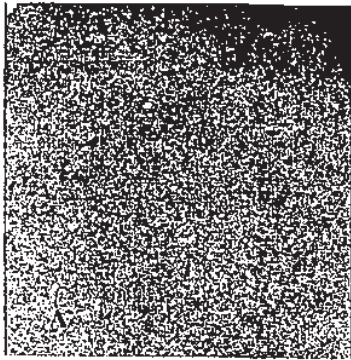


Fig. 24a

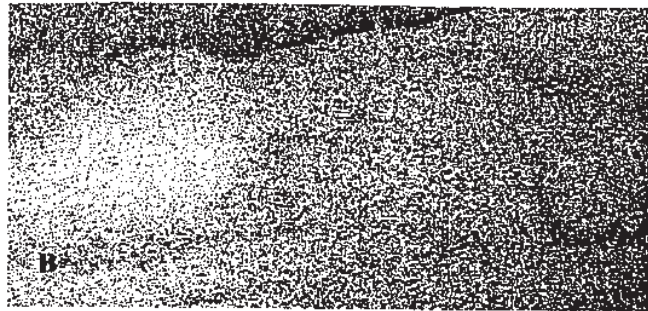


Fig. 24b

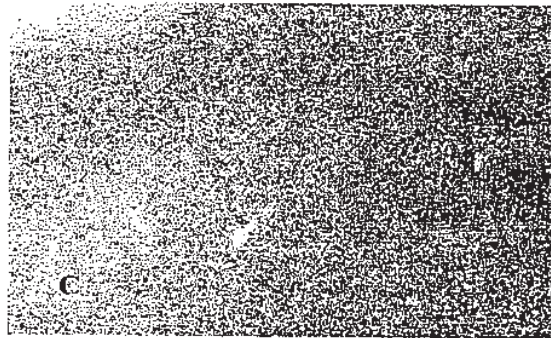


Fig. 24c

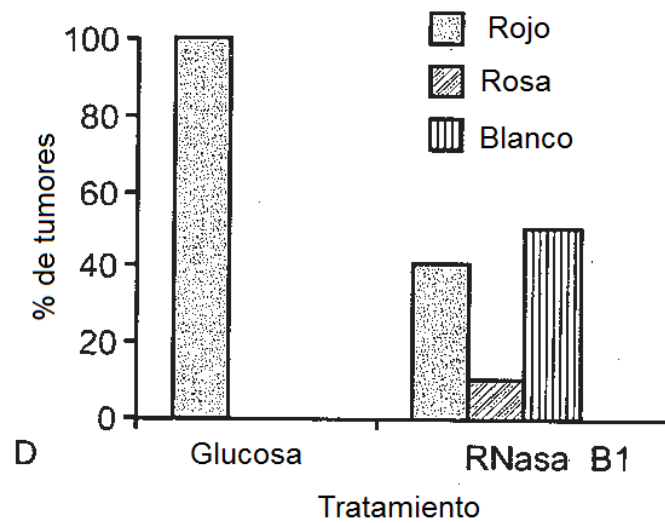


Fig. 24d

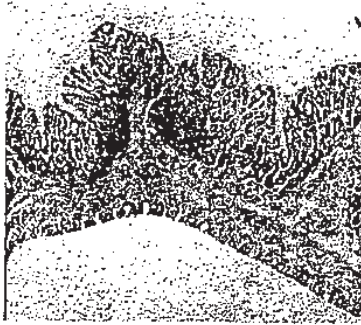


Fig. 25a

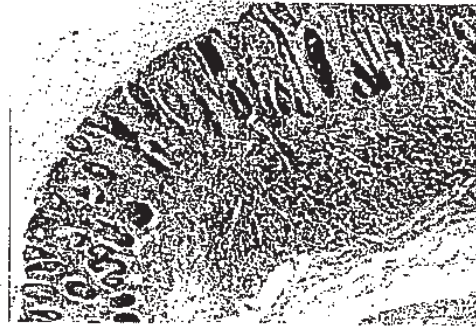


Fig. 25b

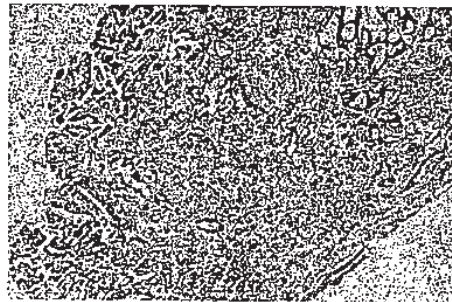


Fig. 25c

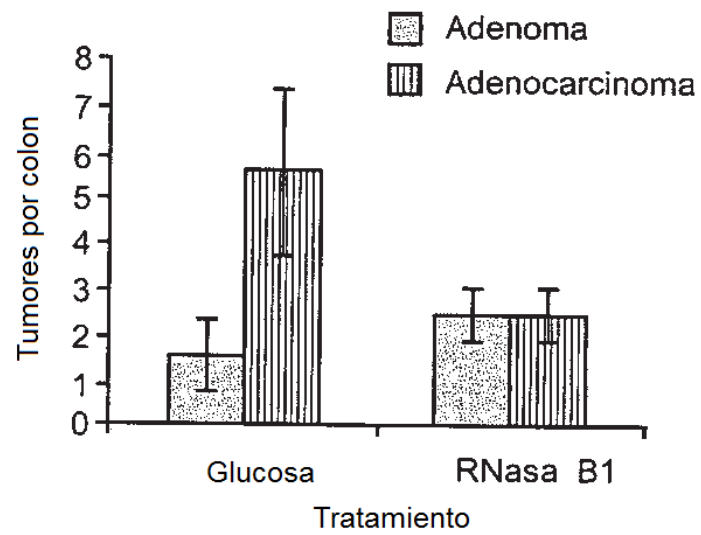


Fig. 25d

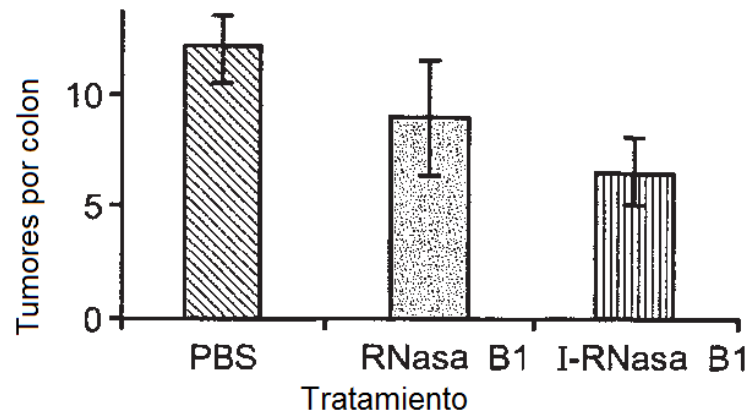


Fig. 26a

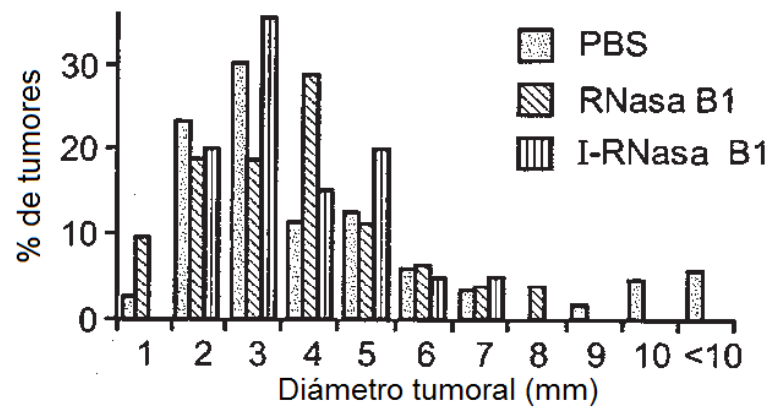


Fig. 26b

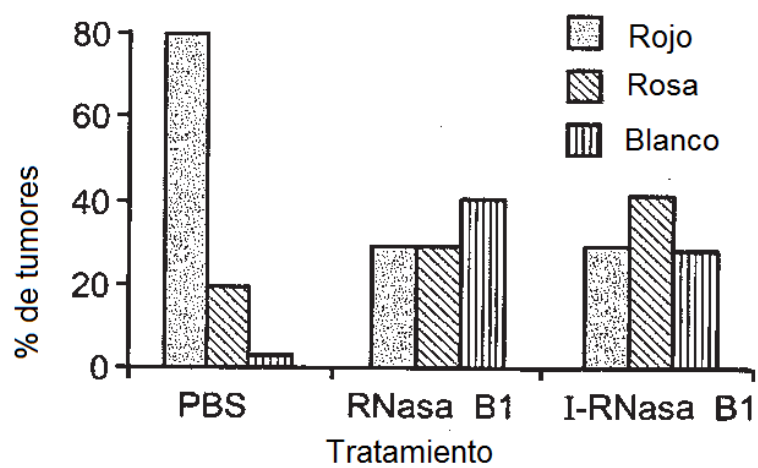


Fig. 26c

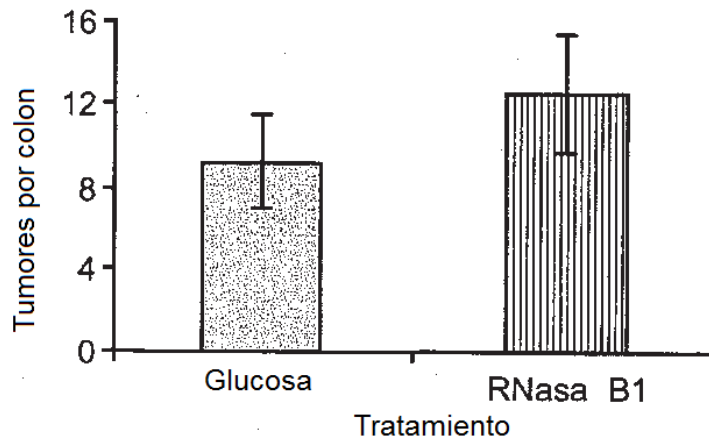


Fig. 27a

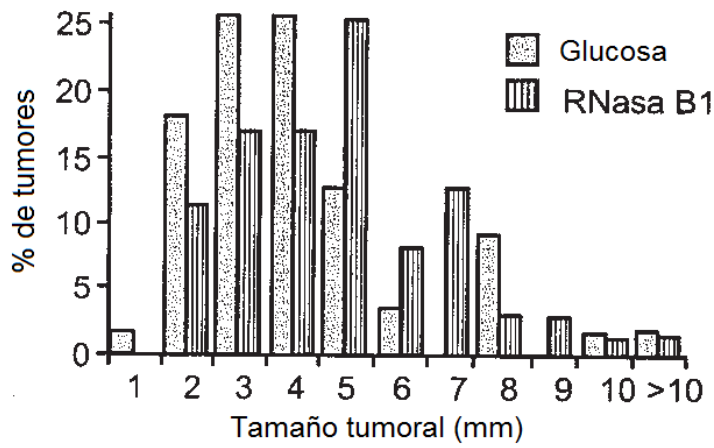


Fig. 27b

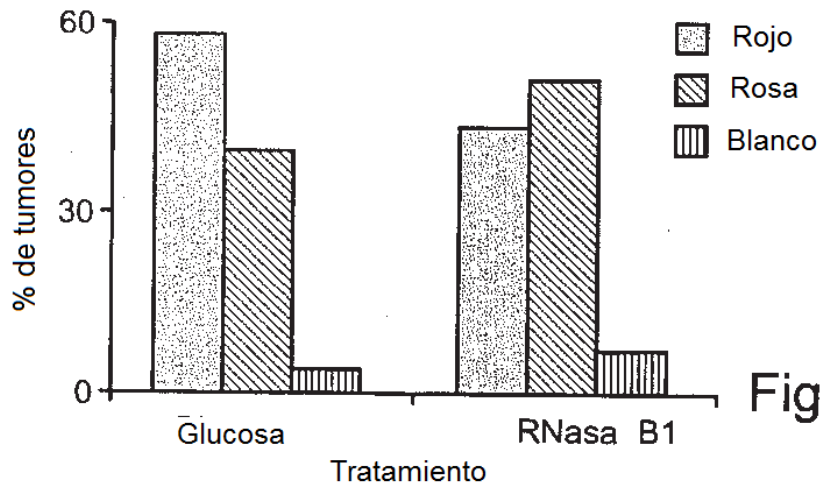


Fig. 27c

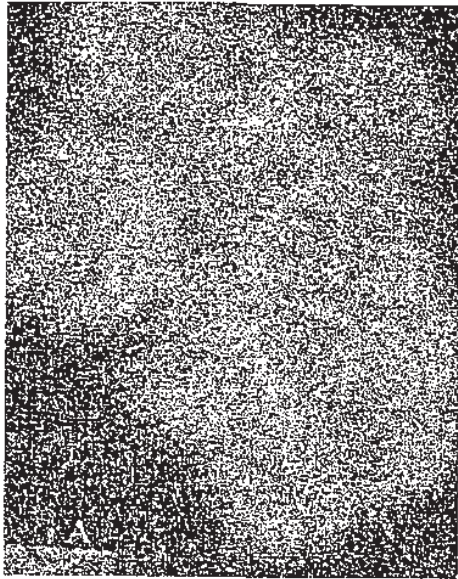


Fig. 28a

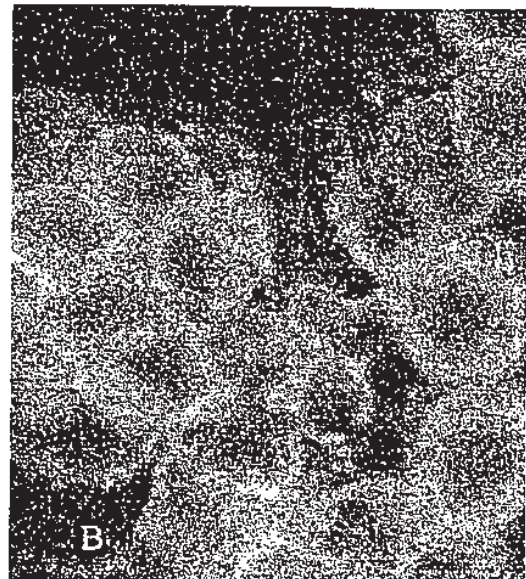


Fig. 28b

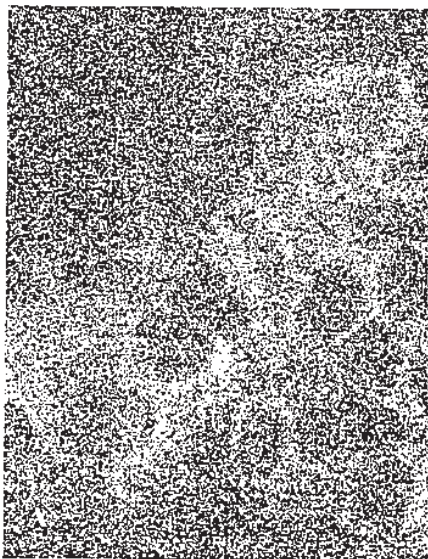


Fig. 29a

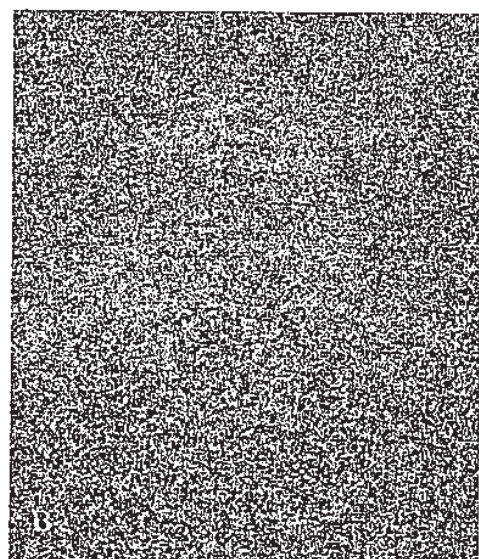


Fig. 29b



Fig. 30a



Fig. 30b

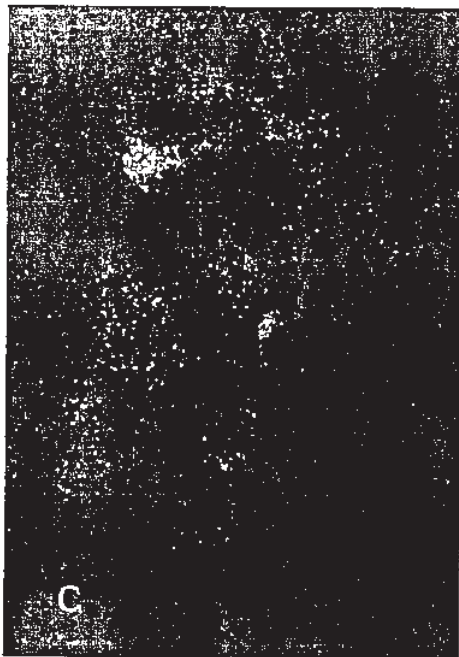


Fig. 30c

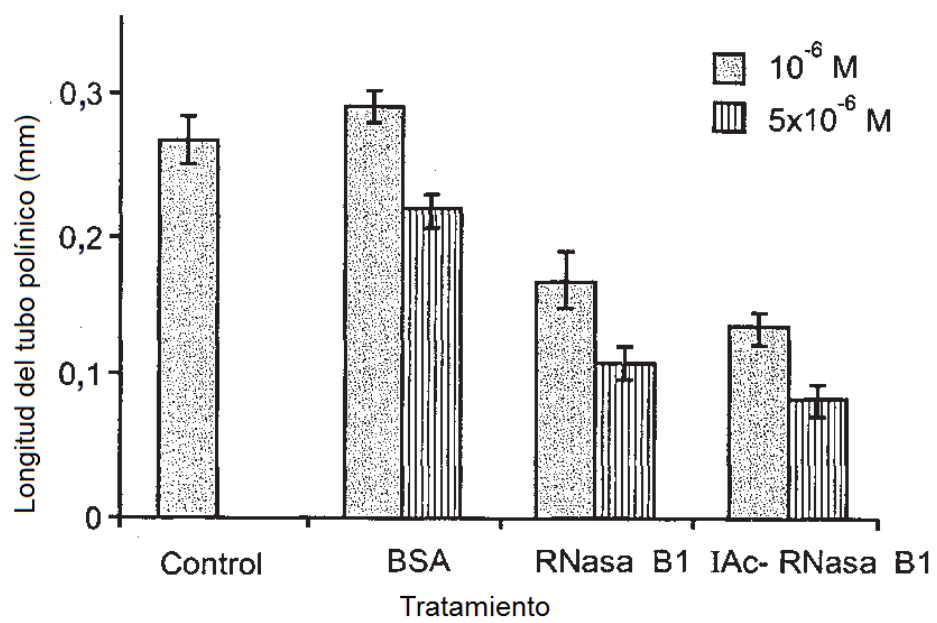


Fig. 31

Fig. 32a

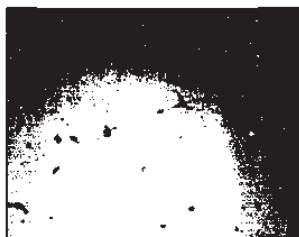


Fig. 32b

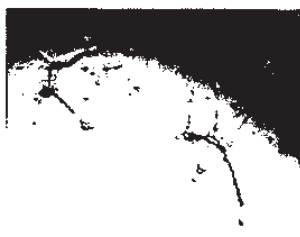


Fig. 32c

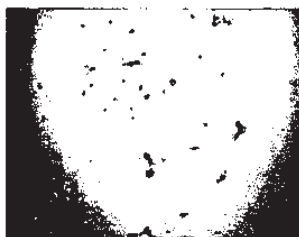


Fig. 32d

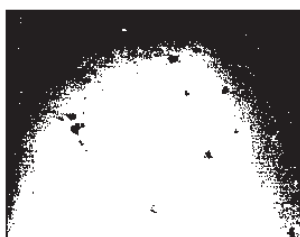


Fig. 32e

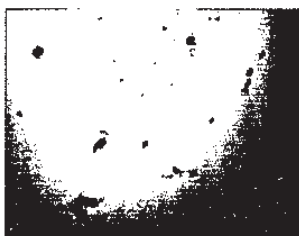


Fig. 32f

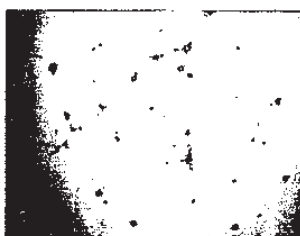


Fig. 32g

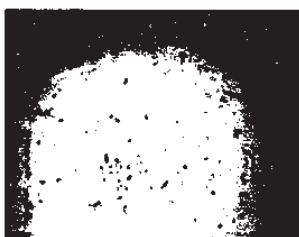


Fig. 32h

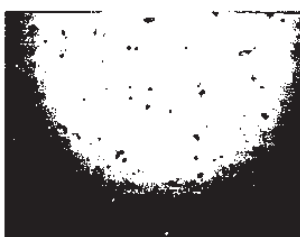


Fig. 33a



Fig. 33b



Fig. 33c



Fig. 33d



Fig. 34a



Fig. 34b

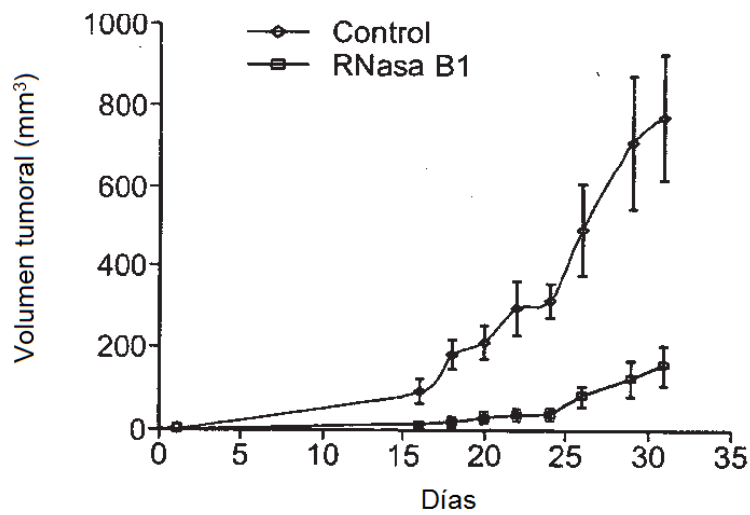
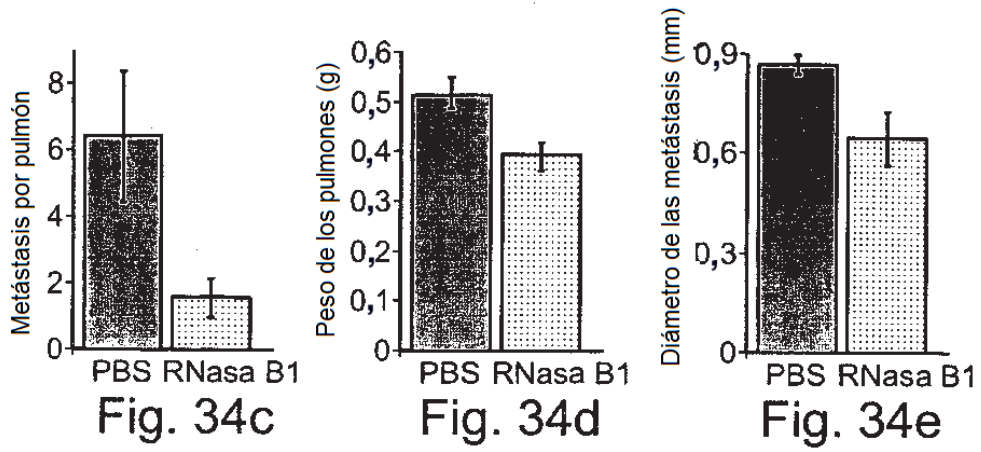


Fig. 35

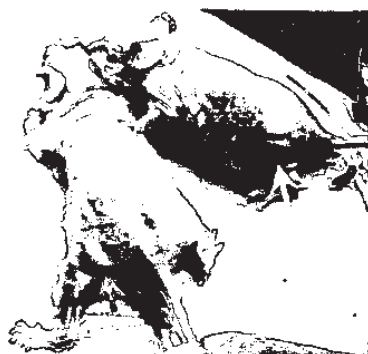


Fig. 36a

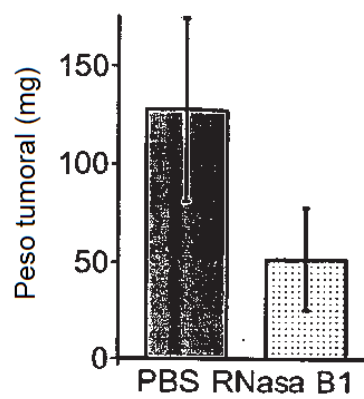


Fig. 36b



Fig. 37

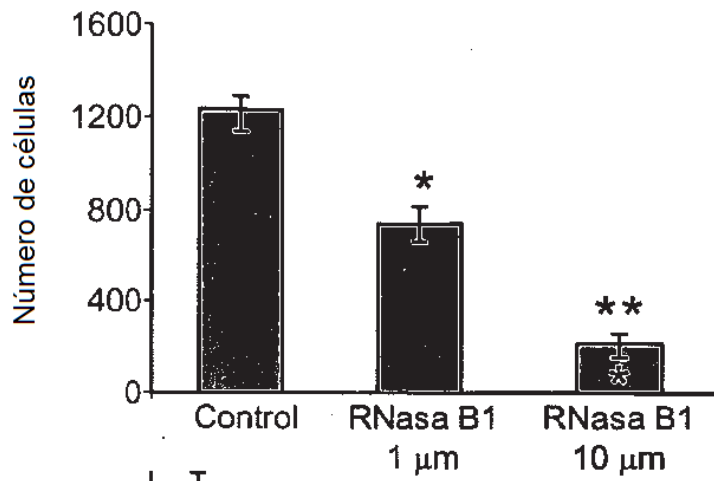


Fig. 38

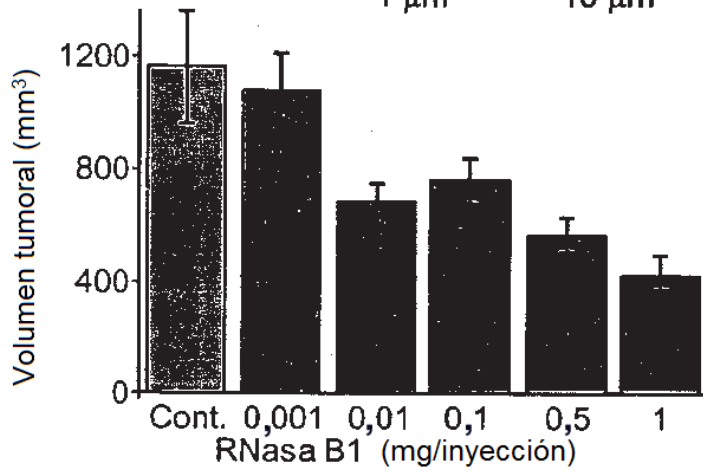


Fig. 39a

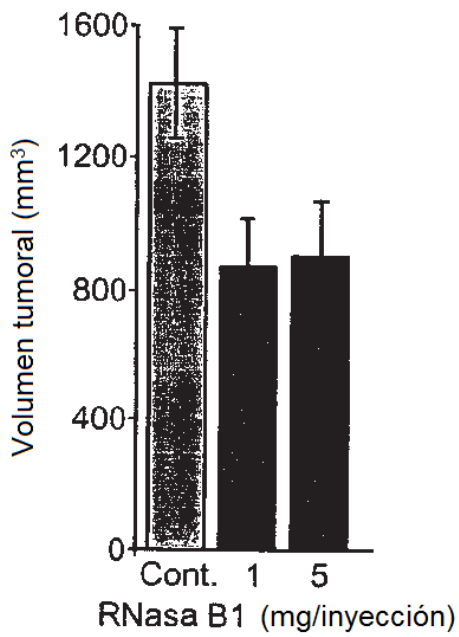


Fig. 39b



Fig. 40a



Fig. 40b

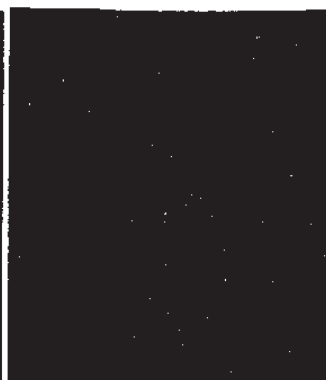


Fig. 40c



Fig. 41a



Fig. 41b

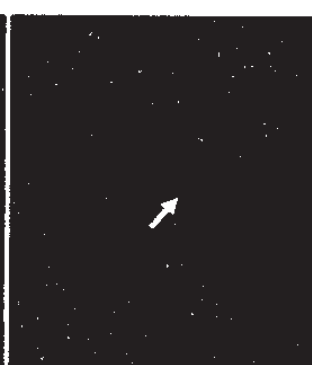


Fig. 41c

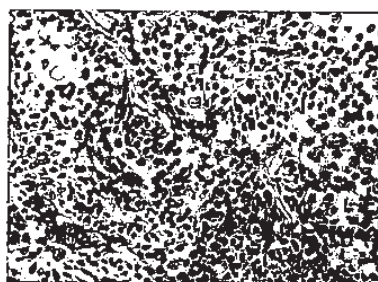


Fig. 42a

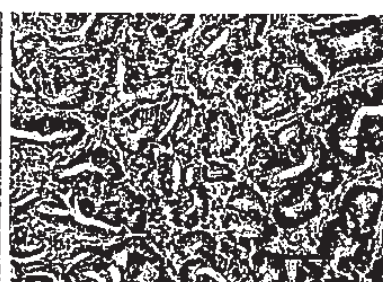


Fig. 42b

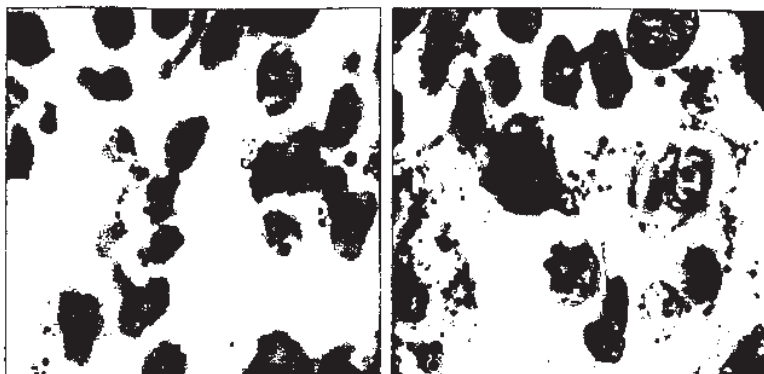


Fig. 43a

Fig. 43b

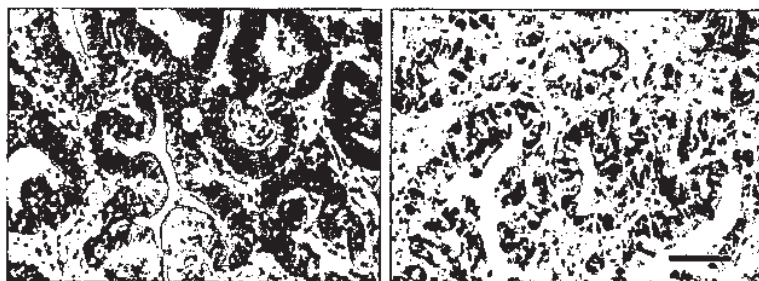


Fig. 44a

Fig. 44b

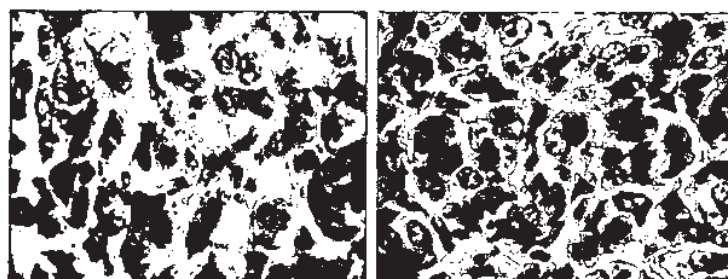


Fig. 45a

Fig. 45b

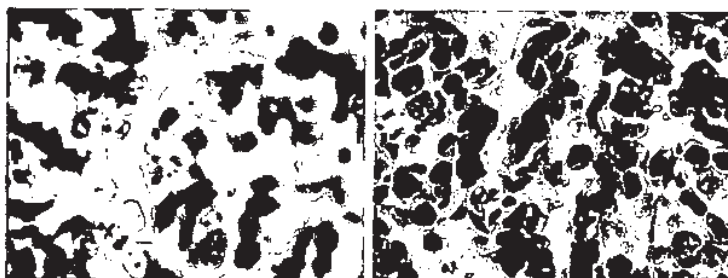


Fig. 45c

Fig. 45d

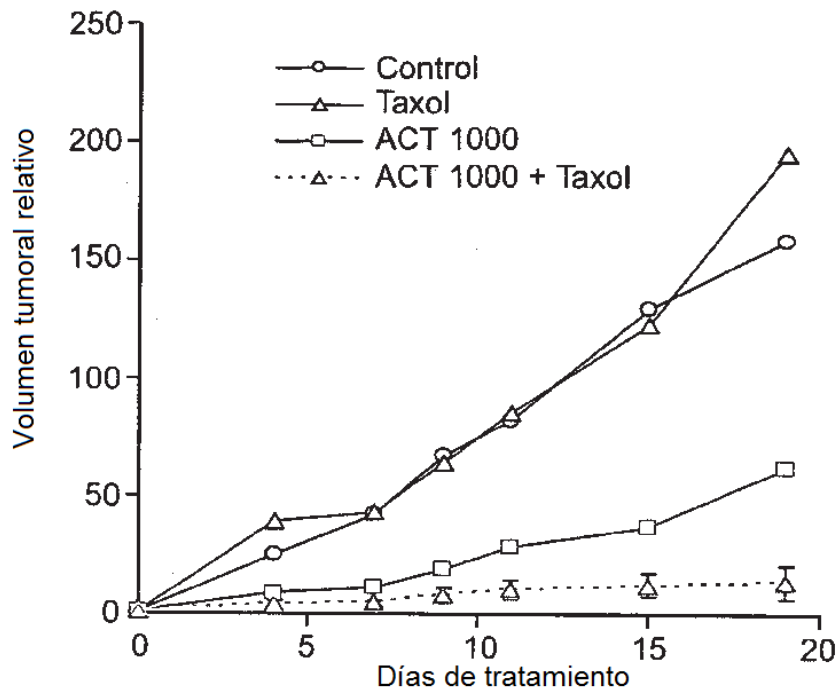


Fig. 46

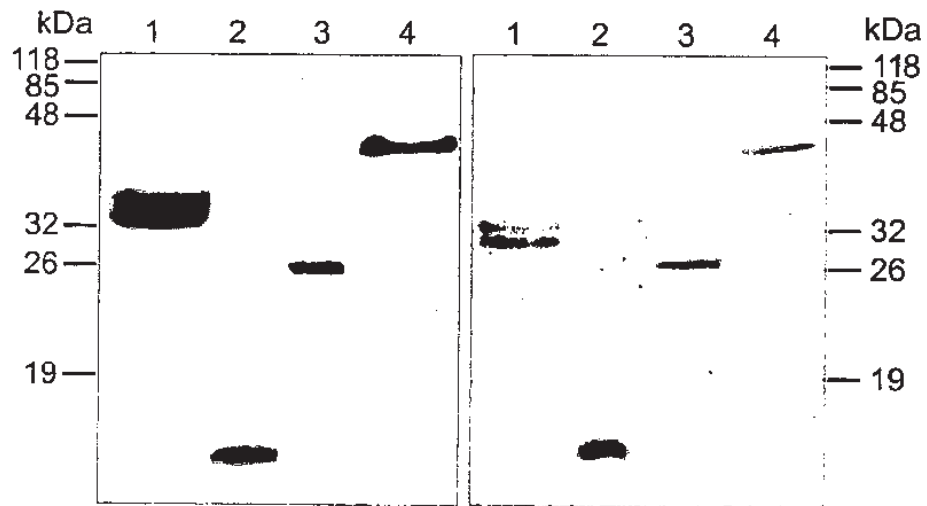


Fig. 47a

Fig. 47b

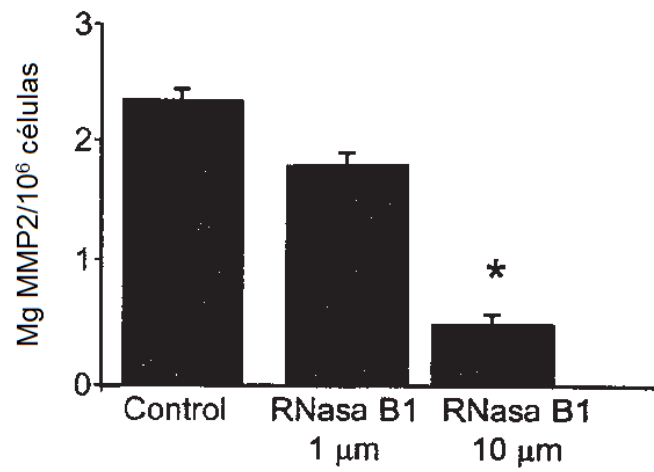


Fig. 48

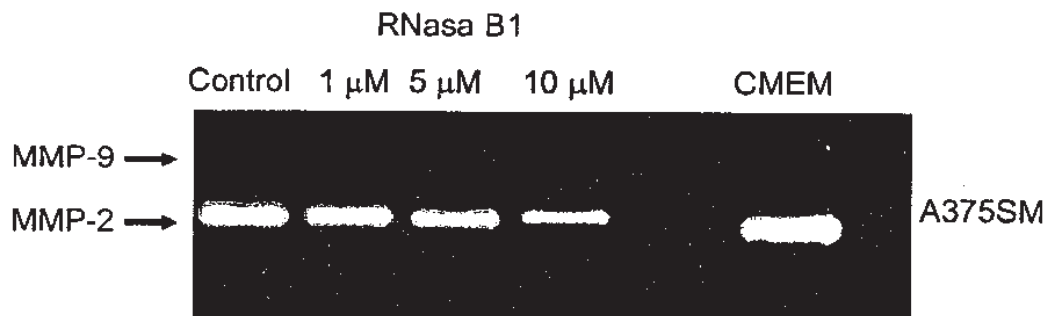


Fig. 49a

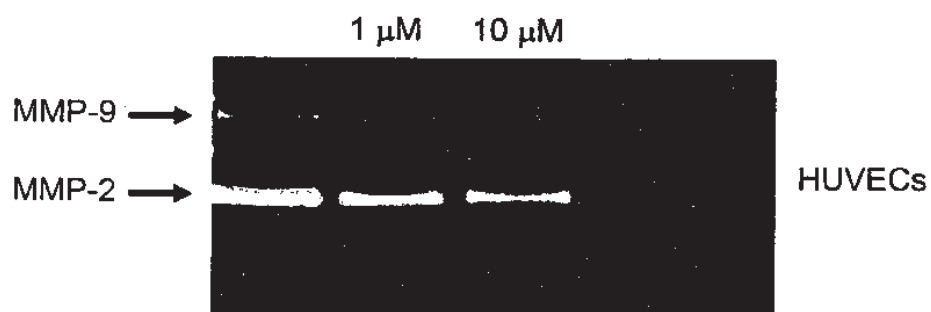


Fig. 49b

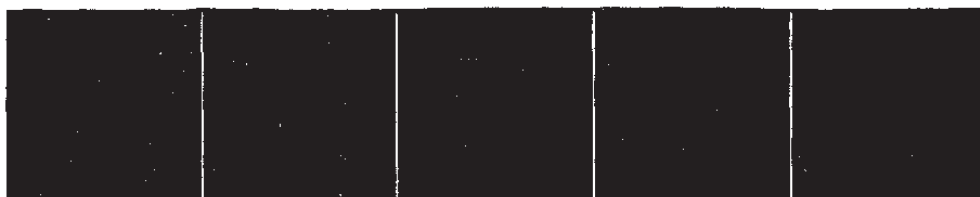


Fig. 50a Fig. 50b Fig. 50c Fig. 50d Fig. 50e

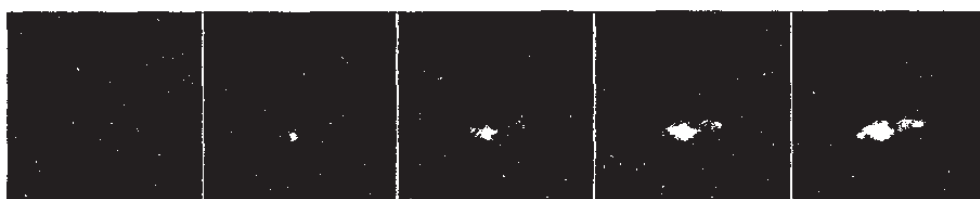


Fig. 50f Fig. 50g Fig. 50h Fig. 50i Fig. 50j

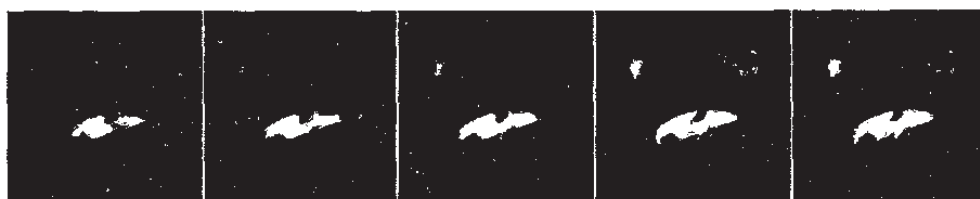


Fig. 50k Fig. 50l Fig. 50m Fig. 50n Fig. 50o

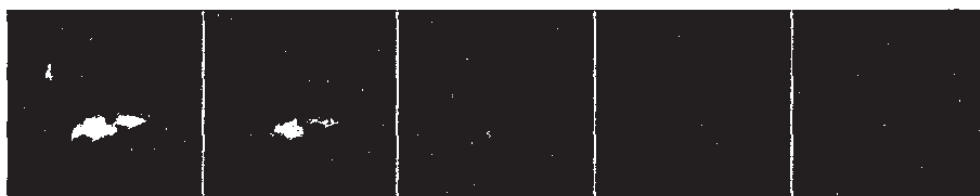


Fig. 50p Fig. 50q Fig. 50r Fig. 50s Fig. 50t

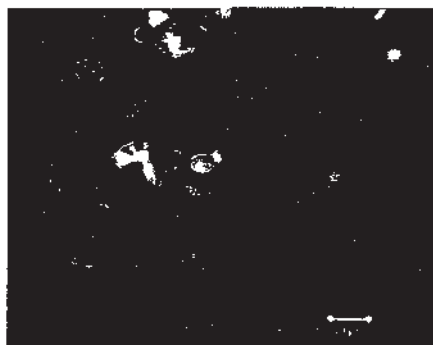


Fig. 51a

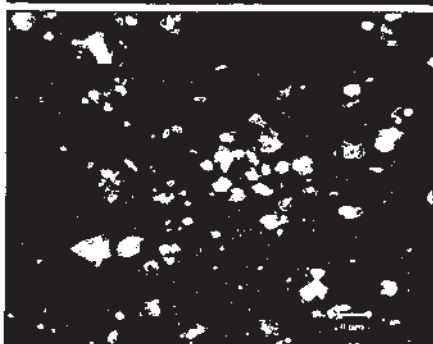


Fig. 51b

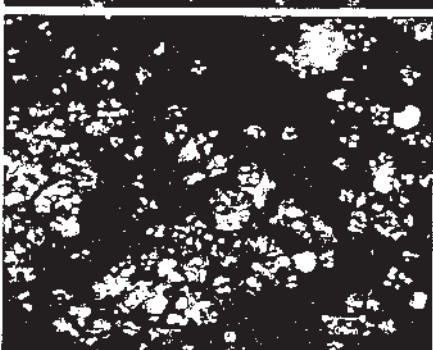


Fig. 51c

Producto de PCR M

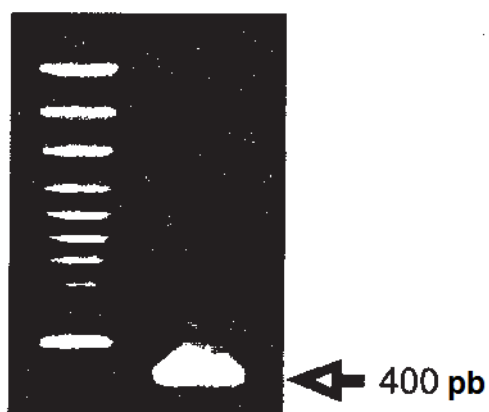


Fig. 52

107. F W E H E W N K H G T C I N T I **E** P S C
1. TTC TGG GAG CAC GAG TGG AAC AAG CAC GGA ACT TGC ATC AAC ACC ATT GAG CCC AGC TGC
Y T D Y Y A Q E E V G D F F Q Q V V D L
61. TAC ACC GAC TAC TAC GCT CAG GAG GAA GTT GGT GAC TTT TTC CAG CAG GTC GTT GAC CTT
F K T L D S Y T A L S D A G I T P S E D
121. TTT AAG ACC TTG GAT TCC TAC ACC GCT CTC TCC GAC GCC GGA ATT ACT CCC TCC GAG GAT
A T Y K L S D I E D A L A A I H D G Y P
181. GCC ACC TAC AAG CTG AGC GAC ATT GAG GAT GCT CTC GCC GCG ATC CAC GAT GGC TAC CCC
P Y V G C E D G A L S Q L Y Y Y F N V K ,206
241. CCG TAT GTC GGG TGC GAG GAC GGT GCT CTG TCC CAG CTC TAC TAT TAC TTC AAC GTC AAG

Fig. 53

ARNm de RNasa E.C. (9 exones) de ADN de longitud completa de 6q27 (28751 pb)

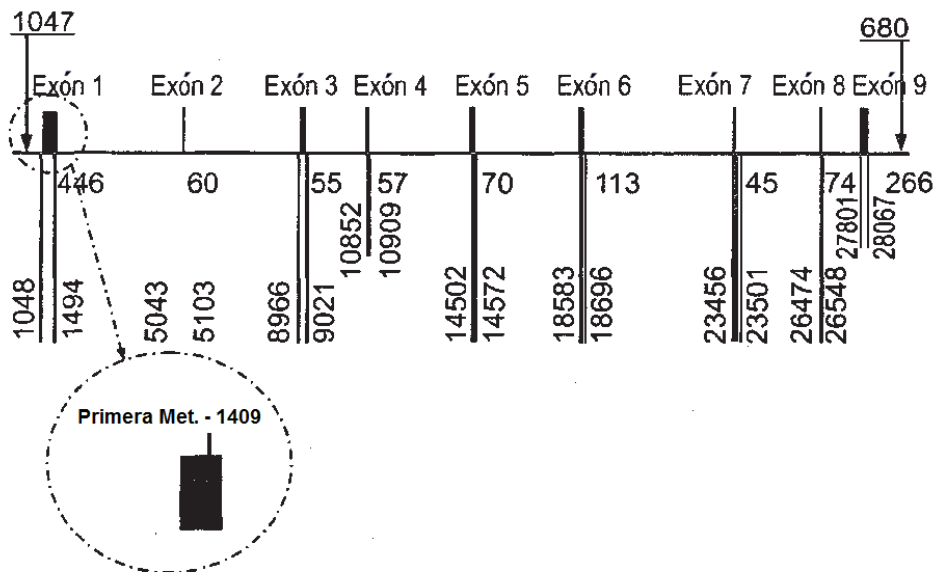


Fig. 54

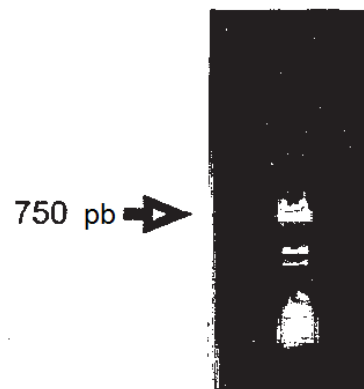


Fig. 55a

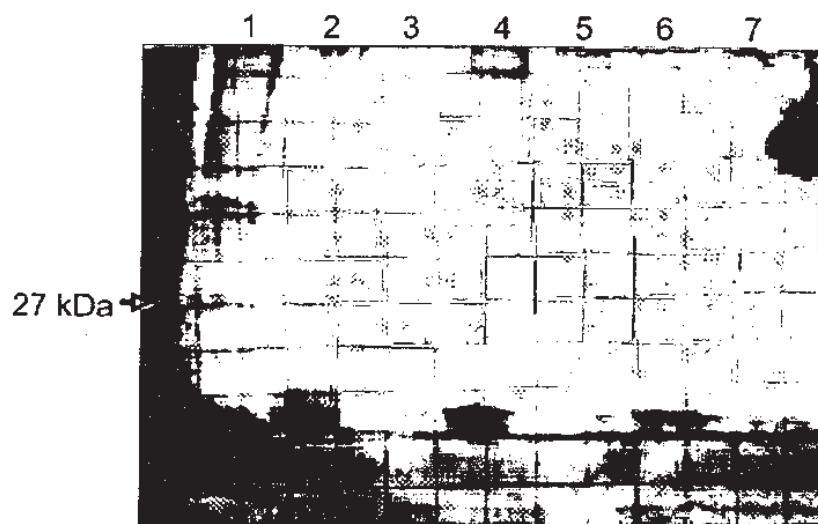


Fig. 55b

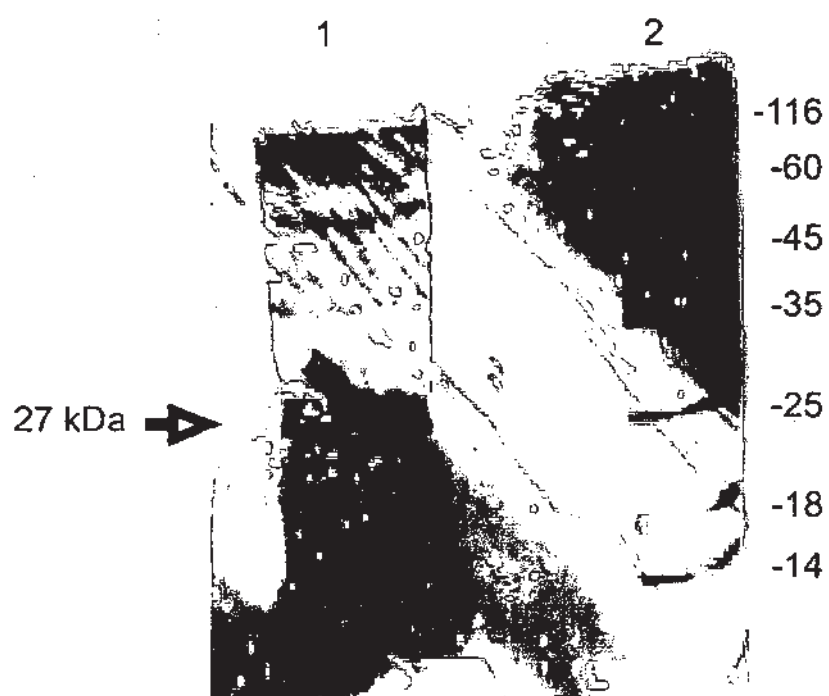


Fig. 56

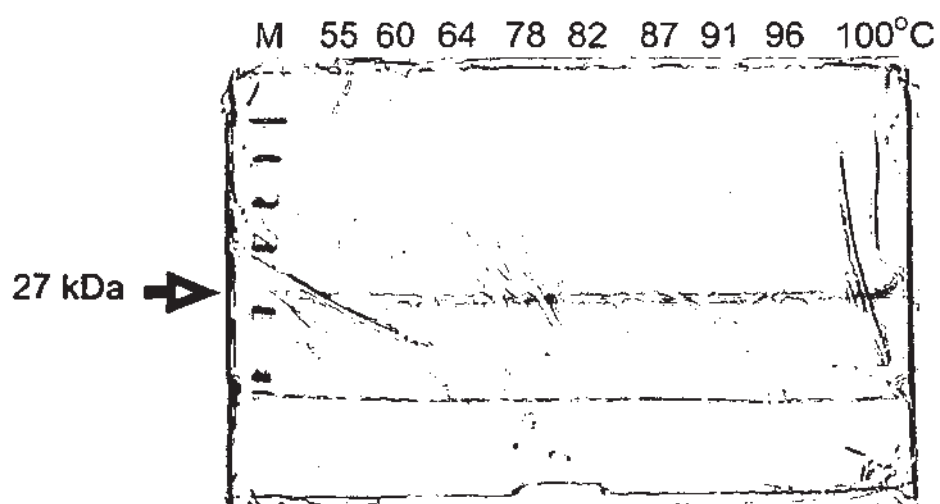


Fig. 57a

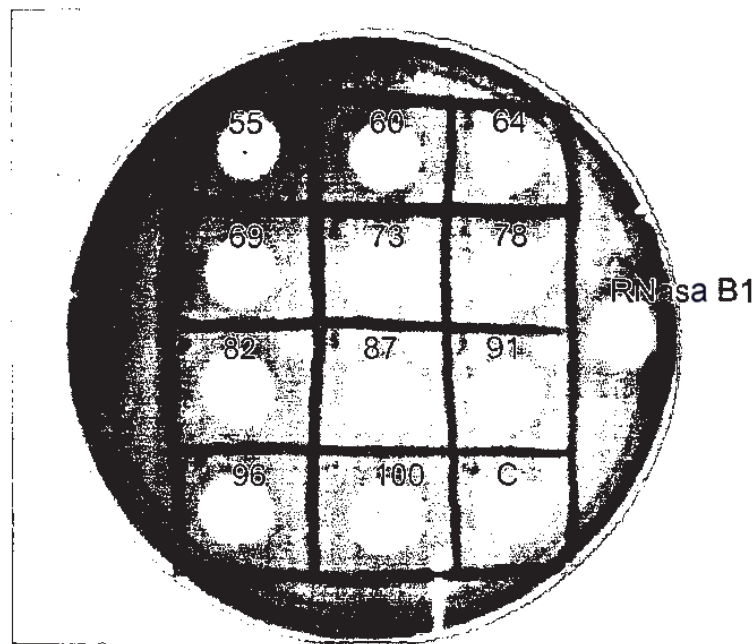


Fig. 57b

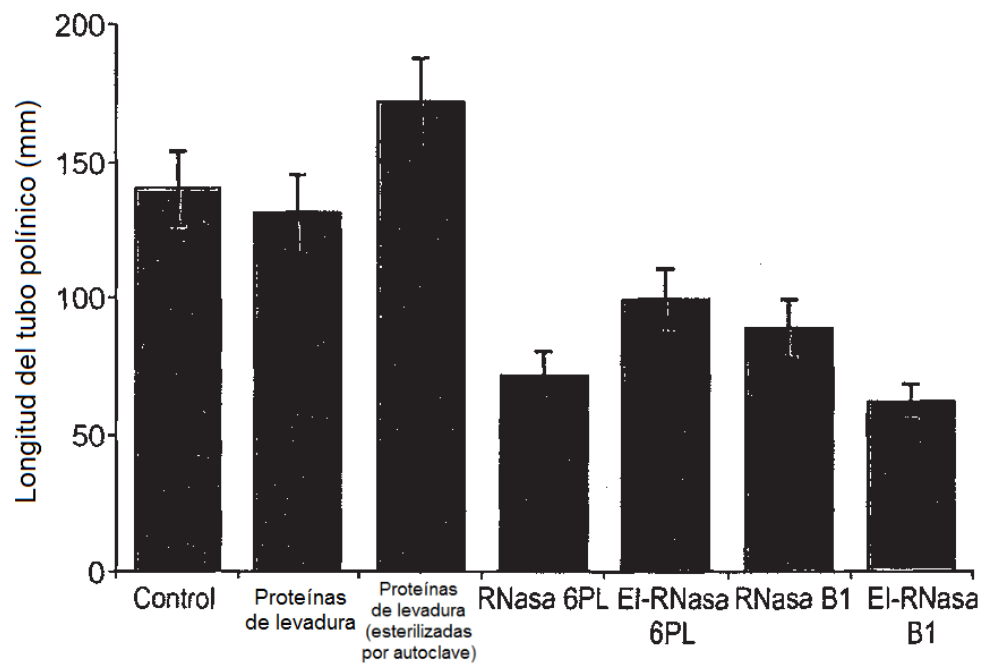


Fig. 58

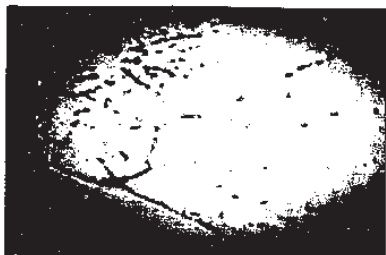


Fig. 59a



Fig. 59b

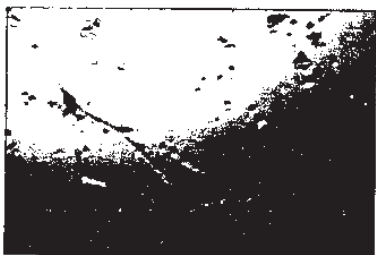


Fig. 59c

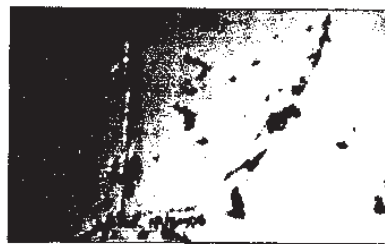


Fig. 59d

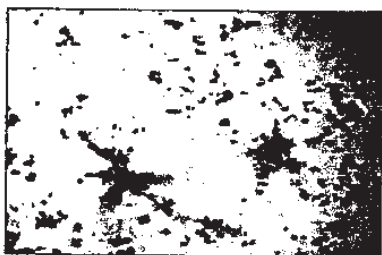


Fig. 59e

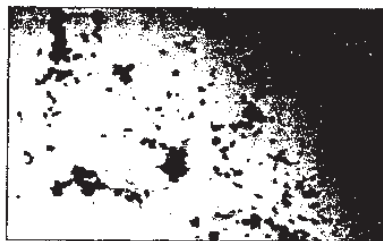


Fig. 59f

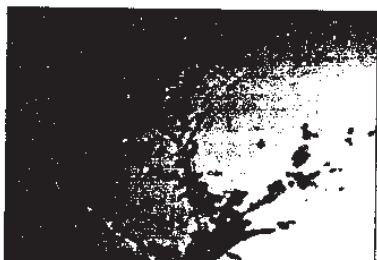


Fig. 59g

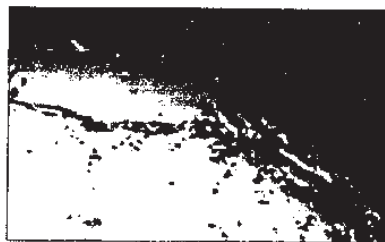


Fig. 59h

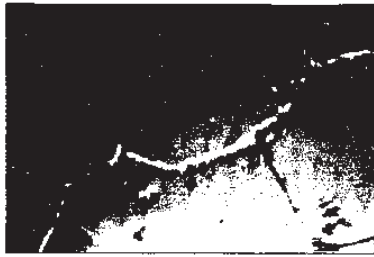


Fig. 59i

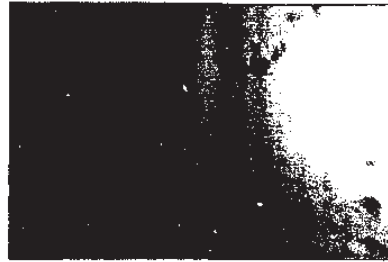


Fig. 59j

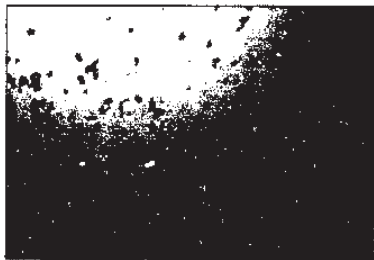


Fig. 59k

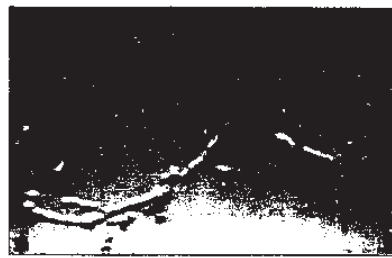


Fig. 59l

EcoRI

GAATTCGGTGCTGACAAGAGATTGAGAGACAACCACGAATGGAAGAAGTTGATTATGGTT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTAAGCCACGACTGTTCTCTAACTCTCTGTTGGTGCTTACCTTCTTCAACTAATACCAA
E F G A D K R L R D N H E W K K L I M V

BsaI

CAACACTGGCCAGAACTGTTTGTGAAAAGATTCAAACGACTGTAGAGACCCACCAGAC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTTGTGACCGGTCTTTGACAAACACTTTTCTAAGTTTGTGCTGACATCTCTGGGTGGTCTG
Q H W P E T V C E K I Q N D C R D P P D

TACTGGACTATTCACGGATTGTGGCCAGATAAGTCCGAAGGTTGTAACAGATCCTGGCCA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATGACCTGATAAGTGCCCTAACACCGGTCTATTCAAGGCTTCCAACATTGTCTAGGACCGGT
Y W T I H G L W P D K S E G C N R S W P

TTCAACTTGGAGGAGATTAAGGACTTGTGTCAGAAATGAGAGCTTACTGGCCAGATGTT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAGTTGAACCTCCTCTAATTCCTGAACAACGGTCTTTACTCTCGAATGACCGGTCTACAA
F N L E E I K D L L P E M R A Y W P D V

*XbaI**BglII*

ATTCACCTCATTCCCAAACAGATCTAGATTCTGGAAGCACGAATGGGAAAAGCATGGTACT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TAAGTGAGTAAGGTTTGTCTAGATCTAAGACCTTCGTGCTTACCCCTTTTCGTACCATGA
I H S F P N R S R F W K H E W E K H G T

HincII ScaI BglII

TGTGCTGCTCAAGTTGACGCTTTGAACTCCCAAAAGAAGTACTTCGGTAGATCTTTGGAA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACACGACGAGTTCAACTGCGAAACTTGAGGGTTTTCTTCATGAAGCCATCTAGAAACCTT
C A A Q V D A L N S Q K K Y F G R S L E

TTGTACAGAGAATTGGATTTGAACTCTGTTTTGTTGAAGTTGGGTATCAAGCCATCCATT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACATGTCTCTTAACCTAAACTTGAGACAAAACAACTTCAACCCATAGTTTCGGTAGGTAA
L Y R E L D L N S V L L K L G I K P S I

AACTACTACCAAGTTGCTGACTTCAAGGACGCTTTGGCTAGAGTTTACGGTGTATTCCA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTGATGATGGTTCAACGACTGAAGTTCCTGCGAAACCGATCTCAAATGCCACAATAAGGT
N Y Y Q V A D F K D A L A R V Y G V I P

AAGATTCAATGTTTGGCCACCATCTCAAGACGAAGAAGTTCAAACCTATTGGTCAAATTGAG
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTCTAAGTTACAAACGGTGGTAGAGTTCTGCTTCTTCAAGTTTGATAACAGTTTAACTC
K I Q C L P P S Q D E E V Q T I G Q I E

MunI

TTGTGTTTGGACTAAGCAAGATCAACAATTGCAAAACTGTACTGAACCAGGTGAACAACCA
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AACACAAACTGATTCGTTCTAGTTGTTAACGTTTTGACATGACTTGGTCCACTTGTGGT
L C L T K Q D Q Q L Q N C T E P G E Q P

Fig. 60

XbaI
TCTCCAAAGCAAGAGGTTTGGTTGGCTAATGGTGCTGCTGAATCTAGAGGTTTGAGAGTT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGAGGTTTCGTTCTCCAAACCAACCGATTACCACGACGACTTAGATCTCCAAACTCTCAA
S P K Q E V W L A N G A A E S R G L R V

NotI
EagI
TGTGAGGATGGTCCAGTTTTCTACCCACCACCTAAGAAAATAAGCACTAAGCGGCCGC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACACTCCTACCAGGTCAAAAGATGGGTGGTGGATTCTTTTGATTTCGTGATTCCGCCGGCG
C E D G P V F Y P P P K K T K H *

Fig. 60 (Cont.)

Alineamiento de múltiples secuencias de CLUSTAL W (1.82) que describe todas las secuencias presentadas:

Sec id n°:

```

5   gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      MVASLVVLGSLAALVSAGPLSLYSPALGPMDFKRVNSCGCTSG----- 44
6   gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    -----TIDT-CSSDS----- 9
7   gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043    -----ADS-CPAD----- 7
8   gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    -MLSQSFLIALAVIPVTLASPYYPYFGKYFHGQRTSGDSSSSCNFYPVK 49
9   gi|5231228|ref|NP_003721.2|      -----MRPAALRGALLGCL-----CLALLCLGG----- 23
10  gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_FIG     -----MAPAEARGALPGWISVLGWGLALCSLCC----- 28
11  gi|21311883|ref|NP_080887.1|      -----MGITCMIMVMTMVFSLIVLILSSPT----- 25
12  gi|7435268|pir||JE0171
13  gi|2118020|pir||S64695

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      -----AESCSNSD---DGTCCFEAPGGLLLQTQFWDTPD--- 75
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    -----PLSCQTDN---EASCCFNSPGSSLTQTFWDYDP--- 40
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043    -----ALSCSATS---GDSCCS-PTNGLLVLVQGMKLD--- 36
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    DCSAFIDONPETSWSCHNKSPVSSANSCCFEENGILSTQFWDYNTTLE 99
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      -----ADKRLRON-----HEWKKLIMVQHWPEPTVCEK--- 50
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_FIG     -----HEWKKLIMVHHWPMPTVCN--- 18
gi|21311883|ref|NP_080887.1|      -----AGPLNSGS-----HEWKKLILTQHWPPTVCK--- 54
gi|7435268|pir||JE0171            -----KDTHTDFDFVFTQQWPPAVCUEA 22
gi|2118020|pir||S64695            -----VGDYFQFTQQYQPAVCHFN 45

: : :

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      -----STGPSDSWTIHGLWPDNCDG---TFES 99
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    -----SDGPSDSWTIHGLWPDNCDG---SYQE 64
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043    -----YGPNTAFTLHGLWPDTCGGIPGSGNT 63
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    IAVNGSTSDIVEAELKSLDTVYNLRSRTTTHGTWDDFCNG---SYPO 145
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      -----IQNCDRDPDYWTIHGLWPKDSEG--- 74
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_FIG     -----EKNCEHPPDYWTIHGLWPKDSCG--- 41
gi|21311883|ref|NP_080887.1|      -----EVNSCQSDLDYWTIHGLWPDRAED--- 78
gi|7435268|pir||JE0171            QAHC-----HLCSIPSDVKGWVHGLWPSRKTRD---MGPF 55
gi|2118020|pir||S64695            -----PTPCRDPPDKLFTVHGLWPSNSSG---NDPI 73

: : * *

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      SCDSRAYTGIGD-----LLTAQGASDLDLDMNQYVVDINGONEQ----- 139
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    YCDSREYSNITS-----ILEACDRTELLSYMKYWPDYGADEDE----- 105
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043    GCDSSRNVDVGS-----VIKSGD--SSLYSQMSQYPSYTCDNSE----- 102
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    YCNKSLEVSDEKDNLTILVDQFKEVELYNIMSKYWIOTIASNVDSAST 195
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      -CNRSWPFN-----LEEIKDLLPEMRYAPVDVHSFPNRS--- 108
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_FIG     -CNRSWPFN-----PDEIKGLLPDMRLYWPDLVHSSPNHVS--- 76
gi|21311883|ref|NP_080887.1|      -CNQSWHFN-----LDEIKDLLRDMKIYAPDVHRSNRS--- 112
gi|7435268|pir||JE0171            FCNNTYSFD-----ENKIKPIEAEEMRKYWPNLFDSPDLS--- 90
gi|2118020|pir||S64695            YCKNTMNS-----TKIANLTARLEIWPVNLORTDHT--- 107

* : : *

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      -FWEHEWSKKGTCYSTLETSCLP-SGSPKGAEAVAFQVQVTLFK--TLP 185
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    SFWEHEWNKKGTCINTIDPSCYT-DYYAQ--EEVGDFQVQVVDLTK--TLD 151
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043    -FWTHEWNKKGTCVTTLDPCDFG-ASYTDNEDMFTYFQQAIDLRA--KYN 148
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    ALWFEHRYNKGTCMTTILSPSCFTSQSYTRFENVVHFYKKTVEIWS--QLD 243
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      RFWKHEWEKKGTCAAQVDALNSQ-----KKYFGKSLDLYR--ELD 146
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_FIG     HFWRHEWEKKGTCAAQVDALNSQ-----KKYFGKSLDLYR--ELA 114
gi|21311883|ref|NP_080887.1|      QFWKHWEVKKGTCAAQVDALNSE-----KKYFGKSLDLYR--QID 150
gi|7435268|pir||JE0171            -FWKHWEKKKGTCSLSKLTPE-----FGYFNTALNLFK--KYN 127
gi|2118020|pir||S64695            -FWNKQNNKKGSCGHPATQNDMH-----YLQTVIKMYITQKN 144

: * : : * * :

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      TYQNLAKAGITPDSSKFTTLSEITSALKSAAG-VTPALDCDG-----K 227
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    SYTALSDAGITPSEDATYKLSDEIALAAIHGQYPPYVGCD-----G 194
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043    LYTILKDGAGITPGGS--YVSALSAIEKSTG-STPKITCSS-----G 188
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    TFEFLAAAGITYPTVSRKYKLSQVQALQKAGH-AEYVYVGLCN-----N 285
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      LNSVLLKLGIKPSIN--YQVADFKDALARVYG-VIPKIQCLPPSQDEEVQ 194
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_FIG     LNSTLQKLGIKPSIS--YQISDIKHALVGVYG-VVPKVQCLPPKSGEKVQ 162
gi|21311883|ref|NP_080887.1|      LNSVLQKFGIKPSIN--YQLADEFKDALTIRYG-VVPKITCYIDKMS--KHH 195
gi|7435268|pir||JE0171            ITSILHSGVIPNTYTAYEVNDFSTAVENALN-IVPVTICIDKMS--KHH 175
gi|2118020|pir||S64695            VSEILSKAKIEPVGK-FRTQKEIEKAIKGTNNKEPKLKQKNSQR---T 190

: : :

```

Fig. 61


```

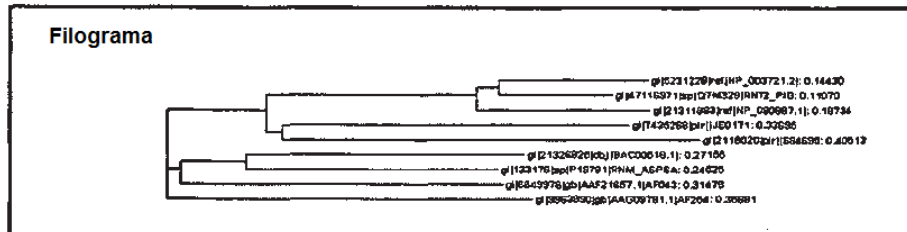
gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      NLNQISWYFHLKGSLLDGKFVPIDAPKA-----GSCASS 261
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    ALSQLYYFNVKGSAGGTYYVASERLED-----SNCKGS 228
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043   AISEIWLYPHVKG---TDSYVPTDAVDK-----STCSGT 219
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    SISEIWFYNLQGSILGTGYPIDTTN-----TKCKDE 319
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      TIGQIELCLTKDQQLQNCTEPGEQSPKQEVWLANGAAESRGLRVCEG 244
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG   TLGQIELCLTR-DLQLQDCPEPG-----LEICEDG 191
gi|21311883|ref|NP_080887.1|     TVGQIELCFTKEDLHLNCTEPGEQLSSRQEAWLAMEAS-THGMMVCEG 247
gi|7435268|pir|JE0171            YIMQVEICIDKELNAISCPDDHSEASSAR-----NCPASK 210
gi|2118020|pir|IS64695           ELVEVTICSDRNLNQFIDCPRPILNGSR-----YYCPTN 224
                                     :  :

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      GLKYPPKSGSSSGSGSGSTTTTSSGSSSTGNPGSLPSKATLHASTGGLL 311
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    GKYPKSSS----- 238
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043   -VIYPAKS----- 226
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    VWYIFK----- 325
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      PVFYPPPKKTKH----- 256
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG   PVFYPPPKKE----- 200
gi|21311883|ref|NP_080887.1|     PIFYPPPTKQH----- 259
gi|7435268|pir|JE0171            GIWYPPPIIPQD----- 221
gi|2118020|pir|IS64695           NILY----- 228

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      SAGTWSTQLATYITISGSSSFTLKTSGKSGVWSSGQFECGSGVSATTF 361
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    -----
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043   -----
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    -----
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      -----
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG   -----
gi|21311883|ref|NP_080887.1|     -----
gi|7435268|pir|JE0171            -----
gi|2118020|pir|IS64695           -----

gi|21326825|dbj|BAC00516.1|      SAVTSGSSLLASGGSTKWSSDGTGPSGTTQEAITGSGHGTSITLSIVSA 411
gi|133176|sp|P19791|RNM_ASPSA    -----
gi|6649978|gb|AAF21657.1|AF043   -----
gi|9963990|gb|AAG09791.1|AF254    -----
gi|5231228|ref|NP_003721.2|      -----
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG   -----
gi|21311883|ref|NP_080887.1|     -----
gi|7435268|pir|JE0171            -----
gi|2118020|pir|IS64695           -----

```



Alineamiento de múltiples secuencias por CLUSTAL W (1.82) usando las secuencias de mamífero y calamar:

```

gi|5231228|ref|NP_003721.2|      MRPAALRGALLGCL-----CLALLCLGADKRLRDNHEWKKLIMVQHWPE 45
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG  -----HEWKKLIMVHHWPM 14
gi|21311883|ref|NP_080887.1|     MAPAEARGALPGWISVLGWGLALCSCGAGPLWSGSHEWKKLILTQHWFP 50

```

Fig. 61 (Cont.)

```

gi|7435268|pir||JE0171 ----- KDTHTDFFVETQOWPP 16
... : : : : : *

gi|5231228|ref|NP_003721.2| TVCEKIQNDCRDP-----PDYWTIHGLWPKSEG-----CNRSWPFNLE 84
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG TVCN--EKNCEHP-----PDYWTIHGLWPKSGE-----CNRSWPFNPD 51
gi|21311883|ref|NP_080887.1| TVCK-EVNSCQDS-----LDYWTIHGLWPDRAED-----CNQSWHFNLD 88
gi|7435268|pir||JE0171 AVCVEAQAHGLCSIPSDVKGWVVHGLWPSRKTD RMGPFFCNNTYSFDEN 66
: * : : : : : * : : : : :

gi|5231228|ref|NP_003721.2| EIKDLLPEMRAYWPDVHHSFPNRS-RFWKHEWEKHGTCAAQVDALNSQKK 133
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG EIKGLLPDMRLYWPDVHSSPNHSHVFWRHWEWEKHGTCAAQLDALNSQKK 101
gi|21311883|ref|NP_080887.1| EIKDLLRDMKIYWPDVHRSNRS-QFWKHEWVKHGTCAAQVDALNSEKK 137
gi|7435268|pir||JE0171 KIKPIEAEMRKYWPNLFADSPDLS--FWKHEWKKHGTCSLSDKLTPDEFG 114
: * : : : : : * : : : : :

gi|5231228|ref|NP_003721.2| YFGRSLELYRELDLNSVLLKLGKIP-SINYQVADFKDALARVYGVIPI 182
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG YFGKTLDLKELALNSTLQKLGKIP-SISYYQISDIKHALVGVIYGVVPKV 150
gi|21311883|ref|NP_080887.1| YFGKSLDLKQIDLNSVLQKFGKIP-SINYQLADFKDALTRIYGVVPI 186
gi|7435268|pir||JE0171 YFNTALNLFKKYNTSILGHSGVIPNTYTAYEVNDFSTAVENALNIVPI 164
* : : : : : * : : : : :

gi|5231228|ref|NP_003721.2| QCLPPSQDEEVQITGQIELCLTKQDQQLQNCTEPGEQPSPKQEVWLANGA 232
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG QCLPPKSGEKVQITGQIELCLTR-DLQLQDCPEPG----- 184
gi|21311883|ref|NP_080887.1| QCLMPEQGESVQITGQIELCFTKEDLHLRNCTEPGEQLSSRQEAWLAMEA 236
gi|7435268|pir||JE0171 TCIYDKMS-KHHYIMQVEICIDK-ELNAISCPDDHSEASS----- 202
* : : : : : * : : : : :

gi|5231228|ref|NP_003721.2| AESRGLRVCEGDPVFYPPPKTKH 256
gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG -----LEICEDGPFYPPPKKE--- 200
gi|21311883|ref|NP_080887.1| S-THGMMVCEGDPFIYPPPTKTQH 259
gi|7435268|pir||JE0171 -----ARNCPASKGIWYPPPIIPQD 221
* : : : : :

```

Fig. 61 (Cont.)

Seq id n°: 11

gi|21311883|ref|NP_080887.1| ☐ ribonucleasa T2 [Mus musculus]
 Longitud = 259
 Puntuación = 367 bits (943), Expectativa = e-101
 Identidades = 164/234 (70%), Positivos = 194/234 (82%), Huecos = 2/234 (0%)

Consulta: 3 GADKRLRDNHEWKKLIMVQHWPETVCEKIQNDCRDPDPDYWTIHGLWPDKSEGCNRSWPFN 62
 GA +HEWKKLI+ QHWP TVC+++ N C+D DYWTIHGLWPD++E CN+SW FN
 Objeto: 28 GAGPLWSGSHWKKLILTQHWPPTVCKEV -NSCQDSLDYWTIHGLWPDRAEDCNQSWHFN 86

Consulta: 63 LEEIKDLLPEMRAYWPDVIHSFPNRSRFRWKHEWEKHGTCAAQVDALNSQKKYFGRSLELY 122
 L+EIKDLL +M+ YWPDVIH NRS+FWKHEW KHGTCAAQVDALNS+KKYFG+SL+LY
 Objeto: 87 LDEIKDLLRDMKIYWPDVIHRSSNRSQFWKHEWVKHGTCAAQVDALNSEKKYFGKSLDLY 146

Consulta: 123 RELDLNSVLLKLGKIKPSINYQVADFKDALARVYGVIPKIQCLPPSQDEEVQTIQIQLC 182
 +++DLNSVL K GIKPSINYQ+ADFKDAL R+YGV+PKIQCL P Q E VQT+GQIELC
 Objeto: 147 KQIDLNSVLQKFGKIKPSINYQLADFKDALTRIYGVPKIQCLMPEQGESVQTVGQIELC 206

Consulta: 183 LTKQDQQLQNCTEPGEQSPKQEVWLANGAAESRGLRVCEGDPVFYPPPKTKH 236
 TK+D L+NCTEPGEQ S +QE WLA A + G+ VCEGDP+FYPPP KT+H
 Objeto: 207 FTKEDLHLRNCTEPGEQQLSSRQEAWLAM -EASTHGMVCEGDPFIYPPPTKQH 259

Seq id n°: 14

gi|34853788|ref|XP_214769.2| similar al precursor de ribonucleasa 6 [Rattus norvegicus]
 Longitud = 313
 Puntuación = 354 bits (908), Expectativa = 1e-96
 Identidades = 161/230 (70%), Positivos = 187/230 (81%), Huecos = 2/230 (0%)

Consulta: 3 GADKRLRDNHEWKKLIMVQHWPETVCEKIQNDCRDPDPDYWTIHGLWPDKSEGCNRSWPFN 62
 GA +HEWKKLI+ QHWP TVC+++ N CRD DYWTIHGLWPD++E CN SW FN
 Objeto: 83 GAGPLWSGSHWKKLILTQHWPPTVCKEV -NRCRDSLDYWTIHGLWPDRAEDCNHSHWFN 141

Consulta: 63 LEEIKDLLPEMRAYWPDVIHSFPNRSRFRWKHEWEKHGTCAAQVDALNSQKKYFGRSLELY 122
 L EIKDLL +M+ YWPDVIH NRS+FWKHEW+KHGTCAAQVDALNS++KYFG+SL+LY
 Objeto: 142 LNEIKDLLRDMKIYWPDVIHPSSNRSQFWKHEWVKHGTCAAQVDALNSEKKYFGKSLDLY 201

Consulta: 123 RELDLNSVLLKLGKIKPSINYQVADFKDALARVYGVIPKIQCLPPSQDEE VQTIQIQLC 182
 +++DLNSVL K IKPSINYQ+ADFKDAL R+YGV+PKIQCL P Q E VQTIQIQLC
 Objeto: 202 KQIDLNSVLQKEIKPSINYQLADFKDALTRIYGVPKIQCLMPEQGENVQTIQIELC 261

Consulta: 183 LTKQDQQLQNCTEPGEQSPKQEVWLANGAAESRGLRVCEGDPVFYPPPK 232
 TK+D L+NCTEP EQPS QE LA A + G+ VCEGDP+FYPPP
 Objeto: 262 FTKEDFHLRNCTEPGEQSSGQEARLAR -EASTHGMVCEGDPFIYPPPK 310

Seq id n°: 10

gi|47116971|sp|Q7M329|RNT2_PIG ribonucleasa T2
gi|7435280|pir|JE0172 , ribonucleasa T2 (EC 3.1.27.1) - cerdo
 Longitud = 200
 Puntuación = 322 bits (825), Expectativas = 4e-87
 Identidades = 149/223 (66%), Positivas = 172/223 (77%), Huecos = 24/223 (10%)

Consulta: 12 HEWKKLIMVQHWPETVCEKIQNDCRDPDPDYWTIHGLWPDKSEGCNRSWPFNLEEIKDLLP 71
 HEWKKLIMV HWP TVC + +C PPDYWTIHGLWPDKS CNRSWPFN +EIK LLP
 Objeto: 1 HEWKKLIMVHHWPMTCVN--EKNCEHPPDYWTIHGLWPDKSGECNRSWPFNPDEIKGLLP 58

Consulta: 72 EMRAYWPDVIHSFPNRS -RFRWKHEWEKHGTCAAQVDALNSQKKYFGRSLELYRELDLNSV 130
 +MR YWPDV+HS PN S FW+HEWEKHGTCAAQ+DALNSQ+KYFG++L+LY+EL LNS
 Objeto: 59 DMRLYWPDVLHSSPNHSHVFWRHEWEKHGTCAAQDALNSQKRYFGK TLDLYKELALNST 118

Consulta: 131 LKLGKIKPSINYQVADFKDALARVYGVIPKIQCLPPSQDEEVQTIQIQLCLTKQDQQL 190
 L KLGKIKPSI+YYQ++D K AL VYGV+PK+QCLPP E+VQT+GQIELCLT+ D QL
 Objeto: 119 LQKLGKIPSISYYQISDIKHALVGVYGVKQCLPPKSGEKVQTLGQIELCLTR -DLQL 177

Consulta: 191 QNCTEPGEQSPKQEVWLANGAAESRGLRVCEGDPVFYPPPK 233
 Q+C EP GL +CEGDPVFYPPPK+
 Objeto: 178 QDCPEP-----GLEICEDGPFYPPPK 200

Fig. 62

Angiogenina



Fig. 63a

bFGF

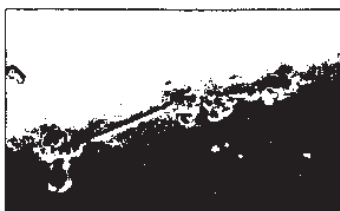


Fig. 63f

VEGF



Fig. 63k

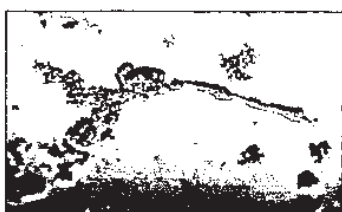


Fig. 63b

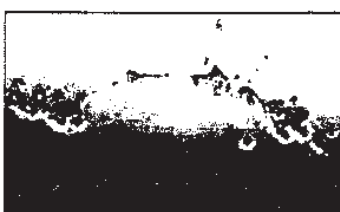


Fig. 63g

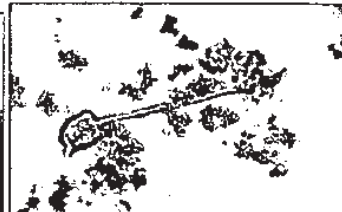


Fig. 63l



Fig. 63c

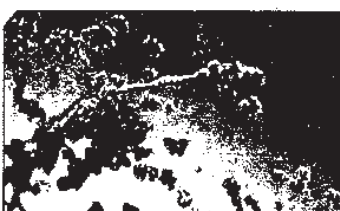


Fig. 63h

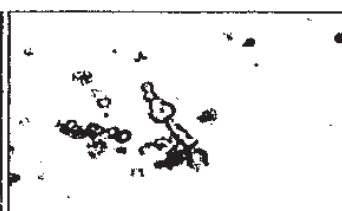


Fig. 63m

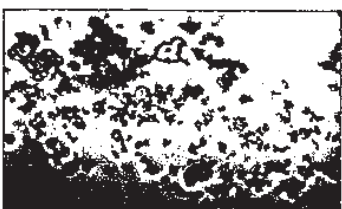


Fig. 63d

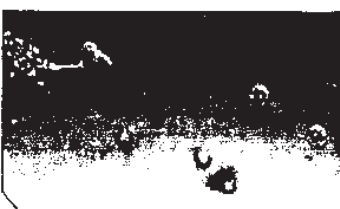


Fig. 63i



Fig. 63n

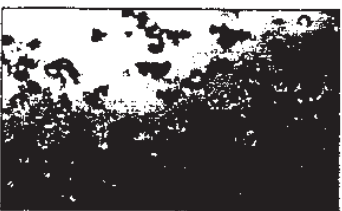


Fig. 63e

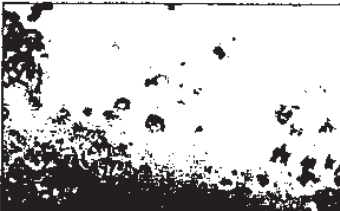


Fig. 63j



Fig. 63o

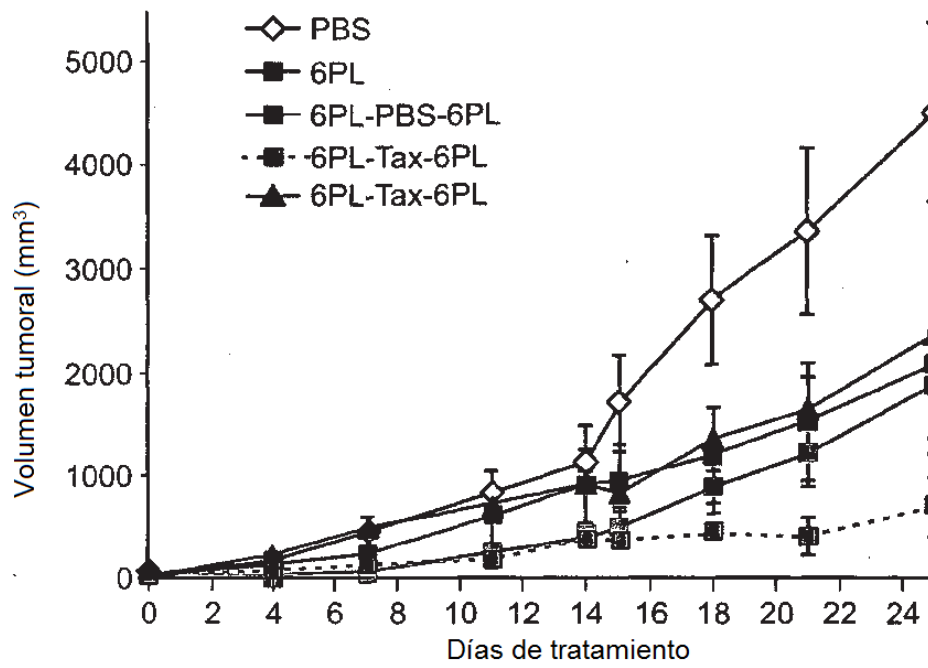
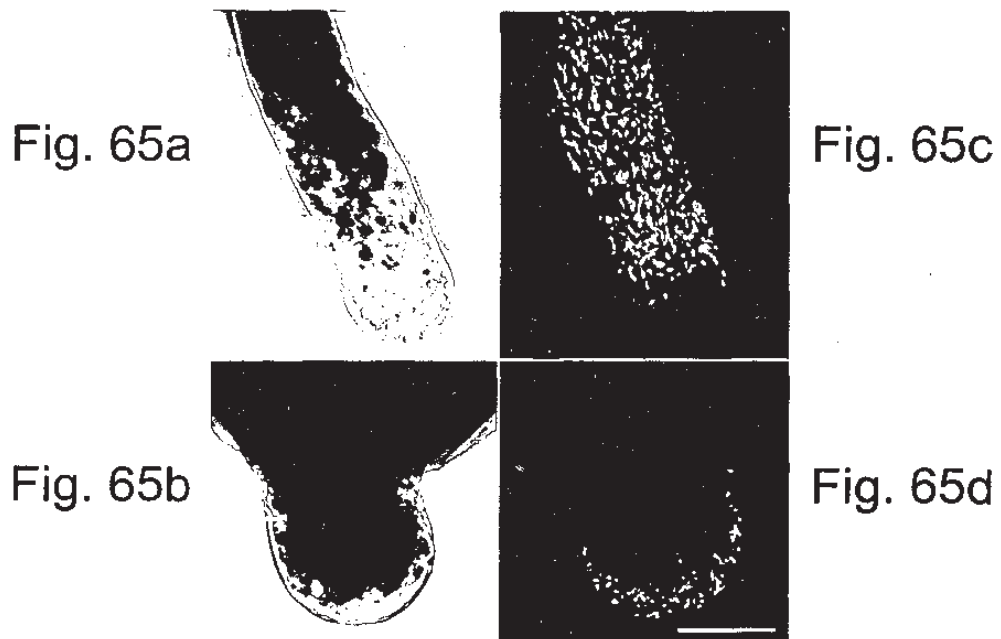


Fig. 64



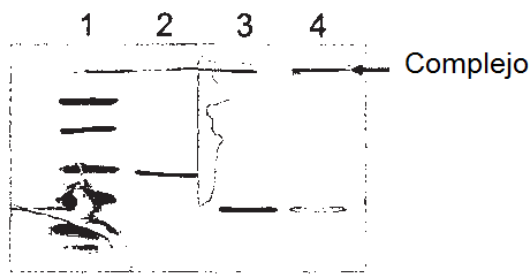


Fig. 66a

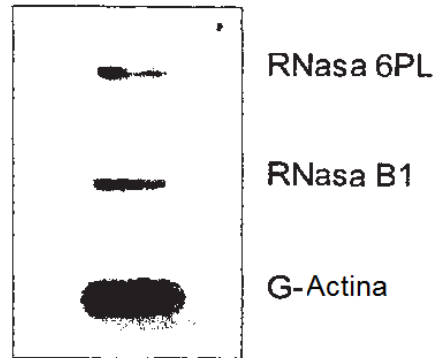


Fig. 66b

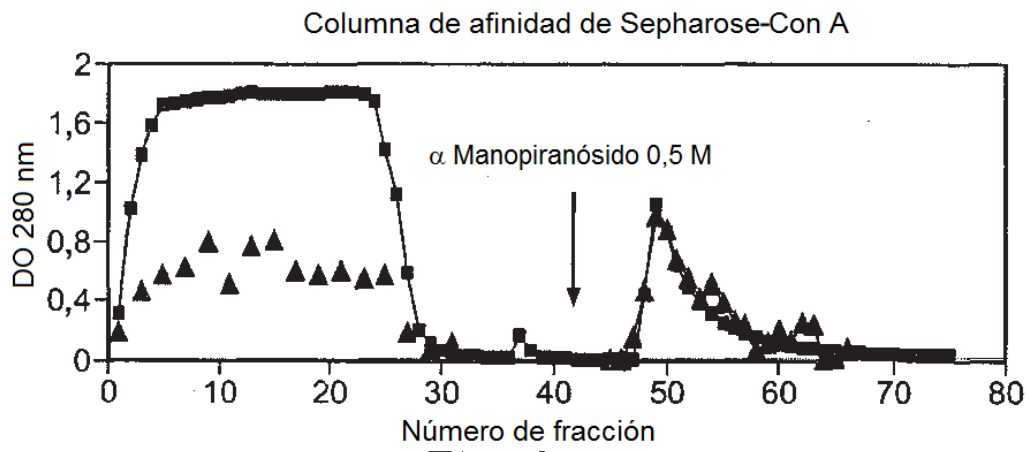


Fig. 67a

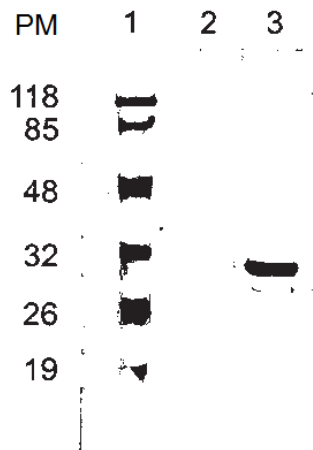


Fig. 67b

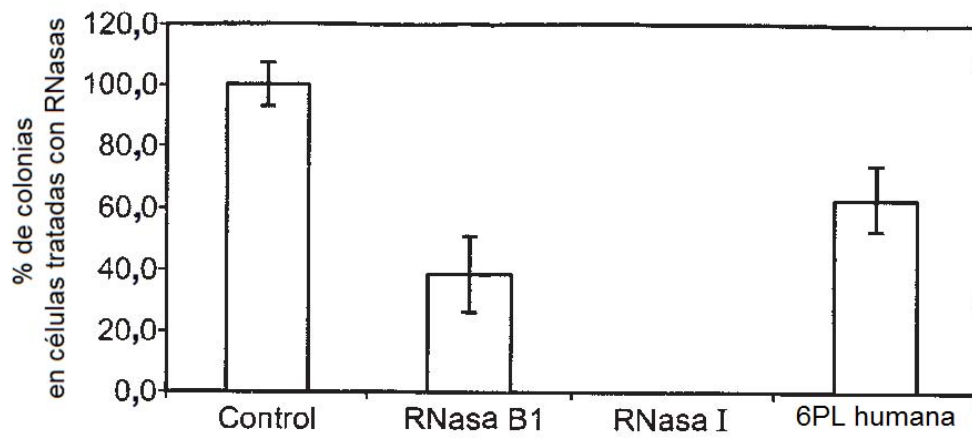


Fig. 68

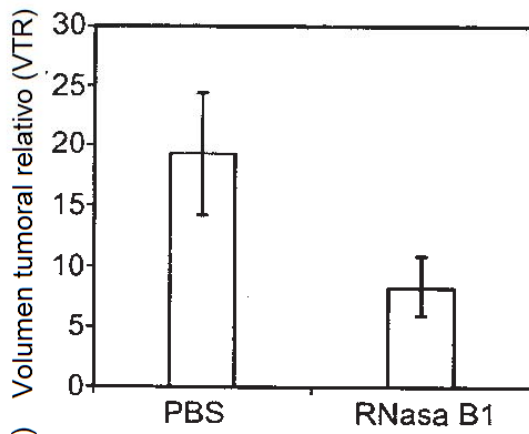


Fig. 69a

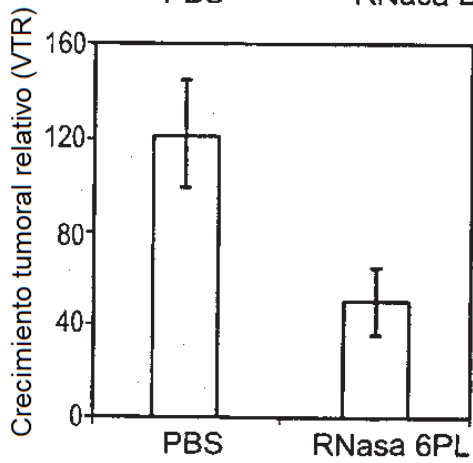


Fig. 69b