



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 288 762**

⑤① Int. Cl.:  
**C12N 15/57** (2006.01)  
**C12N 9/50** (2006.01)  
**A61K 38/48** (2006.01)  
**A61K 39/39** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98907054 .5**  
⑧⑥ Fecha de presentación : **25.02.1998**  
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1012304**  
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

⑤④ Título: **Componente de bromelina.**

③⑩ Prioridad: **25.02.1997 GB 9703827**  
**25.02.1997 GB 9703850**  
**28.02.1997 GB 9704252**  
**25.03.1997 GB 9706119**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.01.2008**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.01.2008**

⑦③ Titular/es: **Sarantis Pty. Ltd.**  
**Suite 339, 433 Logan Road**  
**Stones Corner, QLD 4120, AU**

⑦② Inventor/es: **Mynott, Tracey, L.;**  
**Engwerda, Christian y**  
**Peek, Keith**

⑦④ Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 288 762 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

Componente de bromelina.

5 La presente invención se refiere a una fracción de bromelina. En particular, la invención se refiere a una fracción de bromelina que comprende una proteína novedosa y que tiene actividad inmunomoduladora y antitumoral.

10 La bromelina de tallo (bromelina) es el nombre colectivo para las enzimas proteolíticas encontradas en los tejidos de la planta *Bromeliaceae*. Es una mezcla de diversos restos derivados del tallo de la planta de la piña (*Ananas comosus*). Se sabe que la bromelina contiene al menos cinco enzimas proteolíticas pero también enzimas no proteolíticas, incluyendo una fosfatasa ácida y una peroxidasa; también puede contener actividad amilasa y celulasa. Además, están presentes otros componentes diversos.

15 La bromelina se ha usado anteriormente en el tratamiento de una variedad de estados incluyendo inflamación y, en particular, se ha usado en el tratamiento de la diarrea. El uso de bromelina en el tratamiento de la diarrea infecciosa se describe en el documento WO-A-9301800, en el que sugiere que la bromelina funciona destruyendo los receptores intestinales para los patógenos mediante proteólisis, y en el documento WO-A-8801506, que enseña que la bromelina separa a los patógenos de los receptores intestinales.

20 Taussig *et al*, *Planta Medica*, 1985, 538-539 y Maurer *et al*, *Planta Medica*, 1988, 377-381 sugieren ambos que la bromelina puede ser de utilidad en la inhibición del crecimiento tumoral. Los documentos US 5.223.406, DE-A4302060 y JP-A-59225122 también enseñan el uso de bromelina en el tratamiento del cáncer. El documento US 5.223.406 enseña que la bromelina puede inducir el factor de necrosis tumoral (TNF) mientras que el documento DE-A4302060 enseña que la bromelina puede evitar la metástasis mediante la modificación estructural de la proteína de la superficie tumoral CD44.

25 En el documento WO-A-9400147, se describieron diversos experimentos que demuestran que las enzimas proteolíticas y, en particular, la bromelina, pueden inhibir la secreción. La solicitud también describe que la bromelina puede reducir la actividad de unión a toxinas y puede inhibir el efecto secretor de toxinas, tales como la toxina termolábil (TL) y la toxina colérica (TC) y también toxinas tales como la toxina termoestable (TE). Esto es a pesar del hecho de que la TE tiene un modo muy diferente de acción de TL y TC. Estas observaciones se explicaron mediante el hecho de que un componente de la mezcla de bromelina, la proteasa de bromelina de tallo, parece poder modular las rutas nucleotídicas cíclicas y esto se trata adicionalmente en el documento WO-A-9500169. Además, también se ha demostrado que la bromelina inhibe la secreción producida por la ruta dependiente del calcio.

30 El documento WO-A-960082 también se refiere a la bromelina y describe que la bromelina bruta puede interferir con las rutas de señalización que son importantes para el crecimiento, en particular, las rutas de señalización que conducen a la producción de factores de crecimiento tales como la interleucina 2 (IL-2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de tipo insulina (IGF). Este documento enseña que, como consecuencia de su capacidad para bloquear las rutas de señalización, la bromelina puede actuar como un agente anticancerígeno. Además, la bromelina puede usarse o bien como un agente inmunosupresor o bien como un inmunoestimulante, dependiendo del tipo de célula que se esté tratando y de si la célula se ha activado anteriormente.

35 A partir de la técnica anterior, está claro que la bromelina es una mezcla que tiene una variedad de diferentes efectos fisiológicos. No se han caracterizado todos los componentes de la mezcla de bromelina y, por tanto, a excepción de la proteasa de bromelina de tallo, cuya actividad se ha descrito, no está claro cuál de los componentes es responsable de cuál de los diversos efectos diferentes de la bromelina. Naturalmente, esto es una desventaja principal si la mezcla de bromelina va a administrarse como un producto farmacéutico porque mientras que un componente de bromelina podría facilitar el efecto deseado, podría haber también efectos secundarios no deseados que surgen de la acción de algún otro componente de la mezcla de bromelina.

40 Por tanto, sería beneficioso si pudieran aislarse los componentes individuales de bromelina que dan lugar a actividades medicinales particulares y administrarse por separado de manera que se redujera la posibilidad de efectos secundarios.

55 La presente invención se refiere a una fracción particular que se ha aislado de la mezcla de bromelina y que parece ser, al menos parcialmente, responsable de la actividad inmunomoduladora y anticancerígena.

60 La fracción descrita en el presente documento puede aislarse de la mezcla de bromelina mediante métodos convencionales, por ejemplo mediante cromatografía. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es adecuada para el fin y puede lograrse una separación particularmente buena de las proteínas de la bromelina mediante la cromatografía líquida para la separación rápida de proteínas (FPLC<sup>TM</sup>) usando un material de empaquetamiento de columna tal como SP-Sepharose. Tal como se describirá en más detalle en los ejemplos, en la cromatografía sobre SP-Sepharose usando un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0,8 M en tampón acetato sobre 300 ml, la proteína de la presente invención fue el tercer pico que se obtiene de la columna, apareciendo en el borde ascendente del primer pico principal de proteasa de la bromelina de tallo (el cuarto pico que se obtiene de la columna).

## ES 2 288 762 T3

En el presente documento se describe una fracción de bromelina que tiene un peso molecular de aproximadamente 27,45 kDa, tal como se determina mediante SDS-PAGE, y puede obtenerse mediante el método siguiente:

- 5 i. disolver la bromelina en tampón acetato 20 mM a pH 5,0 que contiene EDTA sódico 0,1 mM;
- ii. separar los componentes de la bromelina mediante cromatografía líquida para la separación rápida de proteínas en SP-Sepharose eluyendo con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0,8 M en tampón acetato sobre 300 ml y;
- 10 iii. recoger la fracción correspondiente al tercer pico que se obtiene de la columna, que aparece en el borde ascendente del primer pico principal de proteasa de la bromelina de tallo.

La fracción de bromelina descrita en el presente documento, denominada CCZ por los inventores, es responsable en gran medida de la actividad inmunoestimulante de la bromelina, ya que se ha encontrado que otros componentes conocidos tales como la proteasa de la bromelina de tallo (SBP), la comosaína y la ananaína tienen actividad inmunoestimulante insignificante y, de hecho, pueden actuar como inmunosupresores. Los inventores han encontrado que una fracción de bromelina denominada CCU por los presentes inventores tiene cierta actividad inmunomoduladora ya que tiene F9, que también está contenida en la bromelina (Garbin *et al*, *Int. J. of Oncology*, (1994) 5, 197-203).

Además, debido a que tiene un número mucho menor de componentes que la bromelina bruta, no es probable que la fracción de bromelina descrita en el presente documento tenga tantos efectos secundarios cuando se usa como agente farmacéutico y su actividad puede definirse más claramente.

Los presentes inventores han caracterizado y obtenido la secuencia de aminoácidos del principal componente de la fracción CCZ. Se cree que esta proteína es responsable de la actividad biológica de la fracción CCZ.

Por tanto, en un aspecto de la presente invención se proporciona una proteína tal como se define en las reivindicaciones que es un componente de bromelina, tiene un peso molecular de aproximadamente 27,45 kDa tal como se determina mediante SDS-PAGE, tiene un punto isoeléctrico de 9,7 tal como se determina mediante enfoque isoeléctrico y tiene la secuencia amino terminal.

Val Leu Pro Asp Ser Ile Asp Trp Arg Gln Lys Gly Ala Val Thr Glu Val Lys Asn Arg Gly

La fracción CCZ descrita en el presente documento puede actuar como un agente inmunoestimulante y como un agente anticancerígeno y se cree que la proteína de la invención puede ser responsable de estas actividades. Por ejemplo, se sabe a partir del documento WO-A-9301800, que la mezcla de bromelina es un agente inmunoestimulante no específico, pero anteriormente se había supuesto que uno de los componentes conocidos de la bromelina, probablemente la proteasa de la bromelina de tallo, era responsable de esta actividad. Ahora se ha encontrado que éste no es el caso y que la proteína de la presente invención es un agente inmunoestimulante, mientras que la proteasa de la bromelina de tallo tiene actividad inmunoestimulante insignificante.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica para la proteína de la invención, o que es una secuencia complementaria a ella. La secuencia de tales ácidos nucleicos puede determinarse usando métodos convencionales.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una proteína según la invención para su uso en medicina humana o veterinaria.

Un uso de la fracción CCZ descrita en el presente documento es como un agente inmunoestimulante y, por tanto, también se proporciona el uso de la proteína de la invención en la preparación de un agente inmunoestimulante.

Por tanto, la fracción CCZ o la proteína purificada que es su principal componente, puede usarse en un método para el tratamiento de estados en los que el sistema inmunitario está deprimido, comprendiendo el método la administración a un paciente de una cantidad eficaz de la fracción CCZ descrita en el presente documento o la proteína de la invención.

Debido a su capacidad para estimular respuestas inmunitarias, la fracción CCZ de la bromelina tiene un potencial considerable para su uso en varias situaciones clínicas en las que los pacientes están inmunocomprometidos. Las inmunodeficiencias primarias resultan de anomalías genéticas, mientras que la inmunodeficiencia secundaria puede surgir como resultado de desnutrición, infección (por ejemplo, por VIH y malaria), tumores (por ejemplo, linfoma, mieloma y otros), traumatismos (por ejemplo, quemaduras, heridas y cirugía), tratamiento médico (por ejemplo con fármacos tales como esteroides, ciclosporina y ciclofosfamida), pérdida de proteínas (tal como en la diarrea y en las quemaduras), diabetes y vejez.

La inmunodeficiencia produce un aumento de la vulnerabilidad frente a una variedad de infecciones virales, protozoarias, bacterianas y fúngicas, y está asociada a muchas muertes cada año así como es responsable de una proporción sustancial del gasto sanitario en la mayoría de los países.

## ES 2 288 762 T3

La respuesta inmunitaria tiene dos divisiones funcionales: el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo. Cuando un patógeno invade el organismo, se activan tanto la respuesta inmunitaria adaptativa como la respuesta inmunitaria innata. La inmunidad innata proporciona la primera línea de defensa frente a los agentes infecciosos y la mayor parte de los patógenos potenciales antes de que establezcan una infección. Durante esta fase inicial de la inmunidad innata, se está desarrollando la respuesta inmunitaria adaptativa. Si las primeras defensas se debilitan, el sistema inmunitario adaptativo debe estar lo suficientemente desarrollado como para producir una reacción específica frente al agente infeccioso, lo que normalmente erradica a este agente.

La fracción de bromelina descrita en el presente documento puede actuar como un agente inmunomodulador mediante la estimulación tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa.

En primer lugar, potencia la inmunidad adaptativa mediante el aumento de la activación de las células T y el aumento de la producción de anticuerpos por las células B. La activación aumentada de las células T conduciría a una producción aumentada de citocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, interferón- $\gamma$ , (IFN- $\gamma$ ), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y TNF- $\alpha$ . Además, la proteína puede potenciar la respuesta inmunitaria innata mediada por macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (células natural killer (NK)) y neutrófilos durante el tiempo que tarda en desarrollarse la respuesta inmunitaria adaptativa específica para el patógeno.

La estimulación de la respuesta inmunitaria innata permite que la fracción CCZ de bromelina se utilice en situaciones en las que, o bien la respuesta de las células T o de las células B, no es completamente funcional. Esto puede producirse en muchas inmunodeficiencias secundarias, tales como las mencionadas anteriormente, así como en estados producidos por anomalías genéticas, tales como las encontradas en pacientes con deficiencia inmunitaria combinada grave que carecen de células T y/o B funcionales.

La fracción de bromelina descrita en el presente documento también puede potenciar la diferenciación del subconjunto de células T y compensar la deficiencia selectiva del subconjunto de células T.

Las células T se dividen en dos subpoblaciones, células CD4<sup>+</sup> o células T “cooperadoras” que potencian tanto las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos como por células, y células CD8<sup>+</sup> o células T “citotóxicas” que eliminan células. Ambos grupos de células T son esenciales para la defensa del huésped frente a varios patógenos y una reducción en cualquiera de las poblaciones de células T puede tener efectos devastadores. Esto se ilustra mediante la alta vulnerabilidad de los pacientes con SIDA, que tienen números reducidos de células T CD4<sup>+</sup>, frente a las infecciones oportunistas.

La capacidad de la fracción CCZ para estimular una población de células T en ausencia de la otra significa que puede usarse para tratar pacientes con estados en los que está reducida una subpoblación de células T; por ejemplo pacientes con síndrome del linfocito desnudo (carencia de células CD8<sup>+</sup> funcionales) o pacientes con deficiencia de MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase I (carencia de células CD4<sup>+</sup> funcionales) o con diversas inmunodeficiencias secundarias, tal como se produce en los pacientes con SIDA.

Tras la estimulación, las células T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse, o bien en células Th1 que participan en las respuestas inmunitarias mediadas por células, o bien en células Th2 que están implicadas en la generación de respuestas humorales (medidas por anticuerpos). Se sabe que la proteína de la invención estimula las células T y puede afectar selectivamente al desarrollo de las células Th1 y/o Th2. Por tanto, es probable estimular las respuestas mediadas por citocinas producidas por las células Th1, por ejemplo IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ , TNF y GM-CSF y/o citocinas producidas por las células Th2, por ejemplo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$ .

Finalmente, la fracción CCZ también tiene potencial para estimular respuestas inmunitarias mediadas por células T y, por tanto, para actuar como un adyuvante de vacuna.

Además de su uso como un agente inmunoestimulante, los presentes inventores han demostrado que la fracción CCZ puede aumentar la producción de óxido nítrico (NO) mediada por el interferón  $\gamma$ . Por tanto, la fracción CCZ de la bromelina puede utilizarse para tratar enfermedades o estados que responden a un aumento en la producción de NO.

El NO y sus derivados tienen una potente actividad antimicrobiana frente a muchos patógenos incluyendo hongos, bacterias y virus. Éstos incluyen parásitos tales como *Baesia*, *Brugia*, *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon*, *Entamoeba*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Ochocerca*, *Opisthorchis*, *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma*. Las bacterias afectadas por el NO incluyen *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Ehrlichia*, *Francisella*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Chlamydia* especialmente *C. trachomatis* y micobacterias tales como *M. avium*, *M. leprae* y *M. tuberculosis*. El NO tiene actividad frente a hongos tales como *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* y *Saccharomyces* y frente a virus, por ejemplo, Coxsackievirus, virus Ectromelia, virus de la encefalomiocarditis, virus de Epstein-Barr, virus herpes simples, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1, virus de la encefalitis japonesa, virus de la hepatitis de ratón, parvovirus, poliovirus, virus de la rabia, virus del simio 40, virus vaccinia y virus de la estomatitis vesicular.

## ES 2 288 762 T3

La actividad de la fracción CCZ para aumentar la producción de NO complementa su actividad inmunoestimulante y significa que CCZ puede usarse como un agente antimicrobiano frente a parásitos, bacterias, hongos y virus, tales como los enumerados anteriormente.

5 Por tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de la proteína de la invención en la preparación de un agente antimicrobiano.

Los presentes inventores también han encontrado que la fracción CCZ de la bromelina tiene actividad anticancerígena. Diversas publicaciones también han asociado la producción de NO a la actividad antitumoral. Por ejemplo, 10 Hibbs (1991, *Res. Immunol.* 142, 565-569) ha demostrado que cuando los macrófagos producen NO, eliminan las células tumorales *in vitro*. Por tanto, la producción aumentada de NO puede ser el mecanismo por el que la fracción CCZ actúa frente a los tumores. Sin embargo, la eficacia de CCZ como agente antitumoral no depende de la exactitud de esta proposición.

15 La invención proporciona, en un aspecto adicional, el uso de la proteína de la invención en la preparación de un agente anticancerígeno.

La fracción CCZ o la proteína pueden usarse para tratar tumores sólidos o blandos u otros cánceres. Ejemplos de cánceres que pueden tratarse usando la proteína de la invención incluyen cánceres de ovario, mama, colon o pulmón, 20 melanomas, leucemia y linfomas. Además, la proteína puede administrarse a pacientes que reciben quimioterapia para el cáncer para protegerlos frente a infecciones oportunistas.

La fracción CCZ o la proteína normalmente se formularán antes de la administración al paciente y, por tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende la 25 proteína de la invención, junto con un excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Además de su uso como un agente farmacéutico por derecho propio, la fracción CCZ o la proteína que es su principal componente pueden usarse como un adyuvante de vacuna, puesto que estimulan al sistema inmunitario para producir un mayor número de anticuerpos una vez que se administra la vacuna.

30 Cuando se usa como adyuvante, la fracción CCZ puede administrarse por separado, o bien antes o bien después de la vacuna. Alternativamente, puede incluirse en una composición de vacuna.

Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende una vacuna, la 35 proteína de la invención como adyuvante y un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptables.

La fracción CCZ de la bromelina puede usarse como un adyuvante tanto en vacunas humanas como animales. La vacuna puede ser una vacuna frente a una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad producida por un agente viral, bacteriano, fúngico o protozario o una enfermedad tal como un cáncer. Alternativamente, la vacuna puede ser un 40 agente diseñado para hacer surgir anticuerpos para algún otro fin, por ejemplo, en animales de laboratorio. La proteína también puede usarse en tratamientos diseñados para hacer tolerante al sistema del huésped frente a antígenos propios, por ejemplo, en la autoinmunidad.

La fracción CCZ o la proteína pueden administrarse mediante una variedad de vías incluyendo la administración 45 enteral, por ejemplo, oral, nasal, sublingual, tópica o anal o la administración parenteral, por ejemplo mediante las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

En muchos casos, puede preferirse la vía oral puesto que a menudo es la vía que los pacientes encuentran más aceptable. La vía oral puede ser particularmente útil si se requieren muchas dosis de la proteína, por ejemplo cuando 50 CCZ se está usando para tratar un estado en el que el sistema inmunitario está deprimido.

Cuando se escoge la administración oral, puede ser deseable formular la fracción CCZ o la proteína en una preparación recubierta entérica con el fin de ayudar a su supervivencia a través del estómago. Alternativamente, puede usarse otra forma farmacéutica que se puede administrar por vía oral, por ejemplo, un jarabe, elixir o una cápsula de 55 gelatina blanda o dura, cualquiera de los cuales puede tener recubrimiento entérico.

Sin embargo, si se desea administrar sólo una única dosis, por ejemplo cuando la fracción CCZ o la proteína se usan como un adyuvante de vacuna, entonces puede ser más conveniente usar una vía parenteral.

60 Para la administración parenteral, la fracción CCZ o la proteína pueden formularse en agua destilada u otro disolvente u agente de suspensión farmacéuticamente aceptables.

El médico puede determinar una dosis adecuada de la fracción CCZ o la proteína para administrarse a un paciente. Sin embargo, como guía, una dosis adecuada puede ser desde aproximadamente 0,5 hasta 20 mg por kg de peso 65 corporal. Se espera que en la mayoría de los casos, la dosis será desde aproximadamente 1 hasta 15 mg por kg de peso corporal y preferiblemente desde 1 hasta 10 mg por kg de peso corporal. Para un hombre que tiene un peso de aproximadamente 70 kg, una dosis típica sería por tanto desde aproximadamente 70 hasta 100 mg.

## ES 2 288 762 T3

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos y a los dibujos, en los que:

5 la figura 1 es un perfil de elución ultravioleta de la bromelina bruta tras la cromatografía de intercambio catiónico en medios de alta resolución de SP-Sepharose;

la figura 2 es un gráfico que muestra la actividad proteolítica y el contenido en proteínas de las fracciones de bromelina bruta tras la cromatografía de intercambio catiónico en medios de alta resolución de SP-Sepharose;

10 la figura 3 es un SDS-PAGE de las fracciones reunidas de la cromatografía de alta resolución en SP-Sepharose llevada a cabo en geles T de gradiente 4-20%, conteniendo los carriles 1 a 4 y 6 a 9 las fracciones CCT, CCV, CCX y CCZ y CCY, CCW, CCU y CCS, respectivamente, y conteniendo los carriles 5 y 10 marcadores de peso molecular;

15 la figura 4 muestra el enfoque isoeléctrico de las fracciones reunidas llevado a cabo sobre geles de gradiente de pH 3-11 mostrando los carriles 1, 11 y 12 marcadores de alto IEF, mostrando los carriles 2 y 13 la bromelina bruta y mostrando los carriles 3 a 10 las fracciones CCT, CCV, CCX, CCZ, CCY, CCW, CCU y CCS, respectivamente; y

20 la figura 5 es un gráfico que muestra la actividad inmunomoduladora comparativa de las fracciones obtenidas a partir de HPLC de la bromelina bruta. CCZ y CCU aumentan las respuestas de las células B frente a antígenos dependientes de células T y, por tanto, potencian la inmunidad adaptativa;

la figura 6 muestra la capacidad de CCZ para aumentar la producción de nitrito mediada por IFN- $\gamma$  mediante los macrófagos y, por tanto, para estimular la inmunidad innata;

25 la figura 7 es una serie de gráficos que muestran el efecto de la proteasa de la bromelina de tallo (SBP) y CCZ sobre la inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vitro*. Los resultados se presentan mediante cantidad de proteína equivalente;

30 la figura 8 es una serie de gráficos similares a los de la figura 7, pero en los que los datos se han transformado para representar la actividad proteolítica equivalente de la proteasa de la bromelina del tallo y CCZ;

la figura 9 es una comparación de la actividad inhibitoria del crecimiento de la proteasa de la bromelina del tallo y CCZ frente al crecimiento del tumor de ovario CH1 *in vitro*.

### 35 Ejemplo 1

#### *Purificación de las proteínas de la bromelina*

##### a. *Materiales*

40 La bromelina se obtuvo de Solvay Enzymes Inc. (Alemania). Los marcadores de Fast Flow S Sepharose, Pharmalyte 3-10<sup>TM</sup>, Ampholine 9-11<sup>TM</sup>, Ready Mix IE<sup>FM</sup> (acrilamida, bisacrilamida) e IEF<sup>TM</sup> se obtuvieron de Pharmacia Biotech. Los geles de acrilamida premoldeados 4-20% y los marcadores de peso molecular de amplio intervalo se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories. El resto de los reactivos fueron de calidad analítica y se obtuvieron o bien de  
45 Sigma Chemical Co. o bien de British Drug House.

##### b. *Ensayo de proteinasa*

50 La actividad proteolítica de la bromelina se determinó mediante el uso de un ensayo interno basado en una placa de microtitulación usando el sustrato sintético Z-Arg-Arg-pNA. Este ensayo se basó en lo descrito por Filippova *et al* en *Anal. Biochem.*, 143, 293-297 (1984). El sustrato fue Z-Arg-Arg-pNA tal como describen Napper *et al* en *Biochem. J.*, 301, 727-735, (1994).

##### c. *Ensayo de proteína*

55 La proteína se midió usando un kit suministrado por Bio-Rad que es un método modificado de Lowry *et al* (*J. Biol. Chem.* (1951) 193, 265-275). Las muestras se compararon con patrones de albúmina sérica bovina (de 0 a 1,5 mg/ml) preparada o bien en solución salina al 0,9% o bien en tampón acetato 20 mM, pH 5,0, según sea apropiado.

##### d. *Preparación de bromelina*

60 Todas las etapas siguientes se realizaron a temperatura ambiente (de 20 a 25°C). Se preparó una disolución de bromelina (30 mg/ml) disolviendo 450 mg de polvo en 15 ml de tampón acetato 20 mM (pH 5,0) que contenía EDTA sódico 0,1 mM. La disolución se dispensó en tubos de microcentrífuga 10 x 1,5 ml y se centrifugó a 13.000 x g durante 10 minutos para eliminar el material insoluble. Se reunieron los sobrenadantes transparentes y se utilizaron  
65 para la cromatografía

## ES 2 288 762 T3

### e. Cromatografía de alta resolución en SP-Sepharose

Se preparó una columna de SP-Sepharose empaquetando 25 ml de medio en una columna XK 16/20<sup>TM</sup> (Pharmacia Biotech) y se equilibró con tampón acetato 20 mM (pH 5,0) que contenía EDTA 0,1 mM en un sistema FPLC<sup>TM</sup> a 3 ml/min. Se inyectaron 5 ml de disolución de bromelina en la columna. Se recogió la proteína no unida y se lavó la columna con 100 ml de tampón acetato. La proteína unida a la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,8 M en tampón acetato sobre 300 ml. Se recogieron fracciones de 5 ml en todo el gradiente y la figura 1 muestra un cromatograma U.V. típico de la bromelina bruta obtenida a partir de este procedimiento.

Entonces se analizaron las fracciones para la determinación de la proteína y de la actividad proteolítica, tal como se describió anteriormente y la figura 2 muestra la actividad proteolítica frente al péptido sintético Z-Arg-Arg-pNA y el contenido en proteínas de las fracciones individuales. El perfil del contenido en proteínas refleja rigurosamente el de U.V., tal como se esperaba, pero la principal actividad proteolítica está limitada a los dos picos principales que corresponden al de la proteinasa de la bromelina (SBP). Se observaron pequeñas actividades en otras zonas del cromatograma que pueden corresponder a otras proteinasas distintas a la de la bromelina, tales como las últimas que eluyen Ananaína y Comosaína (CCS).

Los picos principales identificados del perfil U.V. se reunieron de tres series sucesivas y se nombraron tal como se indica en la tabla 1. Las fracciones reunidas se utilizaron para la caracterización físico-química. Las fracciones reunidas se concentraron mediante ultrafiltración y se cambió el tampón usando columnas PD10 en solución salina isotónica (NaCl al 0,9% p/v). El contenido en proteínas y la actividad de Z-Arg-Arg-pNA se calcularon antes de las pruebas biológicas y se muestran en la tabla 2.

Las fracciones reunidas se procesaron para su análisis tal como se describió anteriormente.

TABLA 1

*Resumen de las fracciones reunidas a partir de bromelina fraccionada en SP-Sepharose HP (QC2322)*

Componente	Descripción	Fracciones reunidas (inclusive)
CCT	Flujo a través (componentes no unidos)	Flujo a través de columna no unida
CCV	Primer pico que sale de la columna	8-9
CCX	Segundo pico muy marcado que sale de la columna	13-14
CCZ	Pequeño pico en el borde ascendente del tercer pico principal de la bromelina	19-20
CCY	Primer pico principal de bromelina	23-24
CCW	Segundo pico principal de bromelina	27-29
CCU	Pequeño pico en el borde descendente del segundo pico principal de bromelina	33-34
CCS	Último doble pico que sale de la columna	39-44

## ES 2 288 762 T3

TABLA 2

*Contenido en proteínas calculado y actividad de Z-Arg-Arg-pNa de las fracciones reunidas usadas para probar la actividad biológica*

<b>Fracciones reunidas</b>	<b>Actividad de Z-Arg-Arg-pNa (<math>\mu</math>moles/min/ml)</b>	<b>Contenido en proteínas (mg/ml)</b>
CCT	11,30	1,00
CCV	9,78	1,00
CCX	71,71	1,00
CCZ	688,81	1,00
CCY	1500,0	0,574
CCW	1500,0	0,543
CCU	1500,0	0,421
CCS	379,76	1,00

### *f. Procesamiento de las fracciones reunidas*

Se determinó la actividad proteolítica y el contenido en proteínas de las fracciones reunidas y se ajustaron las concentraciones a aproximadamente o bien 1,4 mg/ml de proteína o bien 105 nmoles/min/ml de actividad de proteinasa usando una celda agitada Filtron™ que contenía una membrana de ultrafiltración de punto de corte de peso molecular nominal de 10 kDa. Las fracciones se cambiaron entonces de tampón usando columnas PD10™ (Pharmacia Biotech) en solución salina isotónica (NaCl al 0,9% p/v), se filtraron en condiciones estériles (0,2  $\mu$ m) y se ajustaron para el contenido en proteínas o la actividad proteolítica. Las muestras se congelaron entonces a -20°C y se sometieron a prueba para determinar la actividad inmunomoduladora mediante el ensayo en placa hemolítica de Jerne.

### *g. Electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)*

Las muestras de FPLC™ reunidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en geles T premoldeados con gradiente del 4% al 20%. Las muestras se prepararon para la electroforesis mediante precipitación ácida en la que se mezclaron 100  $\mu$ l con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 20% p/v. La proteína precipitada se recogió mediante centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El sedimento se lavó dos veces con 0,5 ml de dietil éter y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Entonces se disolvieron los sedimentos en 300  $\mu$ l de tampón de muestra de SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 que contenía glicerol al 10% v/v, dodecilsulfato de sodio al 2% p/v y ditiotretitol 40 mM) y se calentaron a 95°C en un baño de agua.

Los patrones de peso molecular de amplio intervalo de SDS-PAGE diluidos a 1:20 en el tampón de muestra de SDS-PAGE se trataron de manera similar y se procesaron con las muestras. Los geles se procesaron en un sistema de electroforesis mini Protean II™ según el protocolo de Bio-Rad a 240 V y hasta que el frente de colorante alcanzó el final del gel (de 30 a 45 min).

Tras la electroforesis, las proteínas separadas se tiñeron durante la noche con mezclado orbital en una disolución de azul brillante coloidal G-250 al 0,075% p/v que contenía ácido fosfórico al 1,5% v/v, sulfato de amonio al 11,25% p/v y metanol al 25% v/v. Se eliminó el tinte de los geles para obtener un fondo transparente, en una disolución de metanol al 25% v/v y ácido acético al 10% v/v.

### *Resultados*

La pureza de las fracciones se muestra mediante SDS-PAGE en la figura 3. Todas las fracciones reunidas excepto el flujo a través de la columna (CCT) mostraron que la proteína principal presente fue de peso molecular entre aproximadamente 25-28 kDa. Esto corresponde al peso molecular de las cisteína proteinasas de la bromelina obtenido por los autores (Rowan *et al*, *Methods in Enzymology*, (1994), 244, 555-568). La pureza de las fracciones CCX, CCZ, CCY y CCW parece ser alta. En algunas fracciones pueden observarse componentes minoritarios de peso molecular inferior, particularmente CCT, CCV, CCX y CCS. Las fracciones reunidas CCU y CCS contienen un doblete entre 25-28 kDa; las cargas superiores del gel de las fracciones CCX, CCZ, CCY y CCW significan que las bandas de doblete también pueden estar presentes en estas fracciones. En la tabla 3 se muestra un resumen de los componentes y sus pesos moleculares calculados en las fracciones reunidas, tal como se determina mediante SDS-PAGE.

## ES 2 288 762 T3

Las proteínas en las fracciones reunidas CCX, CCZ, CCY+CCW y CCU se transfirieron a nitrocelulosa tras el SDS-PAGE mediante inmunotransferencia de tipo Western y se sondaron con antisueros de conejo surgidos frente a proteasa de bromelina de tallo (SBP) purificada (resultados no mostrados). Todas las bandas de proteína en estas fracciones reunidas se reconocieron por los anticuerpos en los sueros, lo que indica proteínas inmunológicamente similares, que pertenecen probablemente a la familia de enzimas de la cisteína proteinasa.

TABLA 3

Resumen de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en las fracciones reunidas en SP-Sepharose HP tal como se determina mediante SDS-PAGE

Fracciones reunidas	Peso molecular (kDa) de la(s) banda(s) principal(es) de proteínas	Peso molecular (kDa) de la(s) banda(s) minoritaria(s) de proteínas
CCT	76,03	15,07
CCV	15,07, 25,85, 28,28, 76,03	
CCX	25,08	15,07, 76,03
CCZ	27,45	13,37, 16,49, 76,03
CCY	27,45	6,5
CCW	27,45	
CCU	27,45, 28,28	
CCS	15,07, 25,85, 27,45	

### h. Enfoque isoeléctrico

Las fracciones reunidas (de 0,5 a 1,0 mg/ml) se diluyeron 1:3 con agua desionizada y se sometieron a geles de gradiente de pH 3 a 11. Los geles se moldearon usando Ready Mix IEF<sup>TM</sup> para producir un gel de poliacrilamida T al 5,5%, C 3% que contenía glicerol al 10% v/v, Pharmalyte 3-10<sup>TM</sup> al 5,0% y Ampholine 9-11<sup>TM</sup> al 2,5%. En resumen, se cargaron 10 µl de muestra y marcadores de alto pI en el gel tras un preenfoco a 700 V. La entrada de la muestra fue a 500 V durante 10 min, el enfoque fue a 2500 V durante 1,5 horas y el afilado de la banda fue a 3000 V durante 10 min. Tras la electroforesis se fijaron las proteínas con una disolución de TCA al 20% p/v durante 30 min, se lavaron en disolución para eliminar la tinción durante 30 min para eliminar el TCA y se tiñeron con azul brillante G-250 tal como se describe para SDS-PAGE (véase anteriormente).

### Resultados

La figura 4 muestra que todas las fracciones excepto CCX contenían proteínas básicas de enfoque más allá del marcador de pI 9,3. Las interacciones de carga localizadas con los grupos funcionales de los medios cromatográficos pueden explicar por qué las proteínas de pI 3,8 y 3,85 en CCX, se adsorbían en una resina de intercambio catiónico a pH 5,0. CCZ estaba presente como una única banda de pI 9,7, mientras que las fracciones reunidas CCY, CCW, y CCU contenían múltiples bandas de puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 9,5-9,8. Al menos parte de esta heterogeneidad puede explicarse mediante la variación en el resto de hidrato de carbono de una estructura principal común de proteína de la bromelina de tallo. Los valores están de acuerdo con los notificados en la bibliografía de pI 9,45-9,55 para bromelina (Rowan *et al*, *Methods in Enzymology*, (1994), 244, 555-568). Las fracciones reunidas CCS contienen dos proteínas básicas de pI mayor a 10,25. Las estimaciones mediante extrapolación dan pI de 10,4 y 10,45. Éstos corresponden a la ananaína y la comosaína, y están de acuerdo con otras estimaciones (Rowan *et al*, tal como anteriormente) de pI mayores de 10. En la tabla 4 se resumen los pI de las proteínas en cada una de las fracciones reunidas.

## ES 2 288 762 T3

TABLA 4

*Resumen de los puntos isoeléctricos estimados de las proteínas encontradas en las fracciones reunidas de SP-Sepharose HP*

Fracciones reunidas	Puntos isoeléctricos de las proteínas
<b>CCT</b>	No detectado
<b>CCV</b>	No detectado
<b>CCX</b>	3,8, 3,85
<b>CCZ</b>	9,7
<b>CCY</b>	9,6, 9,7
<b>CCW</b>	9,57, 9,6, 9,7
<b>CCU</b>	9,57, 9,6, 9,75
<b>CCS</b>	10,4, 10,45

### *i. Inmunotransferencia de tipo Western*

Las muestras sometidas a SDS-PAGE tal como se describió anteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,45  $\mu$ m de tamaño de poro) usando un aparato Transblot™ (BioRad) a 100 V durante 1 hora en tampón de Towbin tal como se describe por el fabricante. Tras transferir la proteína, la membrana se enjuagó en agua destilada y después se secó en un incubador a 60°C durante la noche. Tras el secado, la membrana se bloqueó durante 30 min en una disolución al 1% de BSA en Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 500 mM (tampón Tris), seguido de dos lavados de 10 min en tampón Tris. La membrana se sondó entonces con una dilución 1:50 de antisuero anti-bromelina (conejo) en tampón Tris, que contenía Tween 20™ al 0,05% v/v durante 2 h. La inmunotransferencia se desarrolló tras lavar tres veces en tampón Tris que contenía Tween 20™ e incubar con peroxidasa de rábano picante - anti-conejo durante dos horas. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante incubación con sustrato de 4-cloronaftol.

### Ejemplo 2

#### *Análisis de aminoácidos del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína CCZ*

En un experimento separado, las fracciones reunidas de CCZ se sometieron a SDS PAGE y a inmunotransferencia tal como se explicó anteriormente en la membrana de PVDF. La membrana se tiñó con azul de Coomassie R-250 al 0,025% p/v, se disolvieron en metanol al 40% v/v durante 10 min, seguido por eliminación de la tinción en metanol al 50% v/v. La membrana se secó al aire a temperatura ambiente y se llevó a cabo la secuenciación de los aminoácidos del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de las proteínas teñidas. En resumen la banda de proteína se cortó de la membrana y se colocó en el cartucho superior del secuenciador. El análisis de los aminoácidos del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína CCZ se determinó mediante degradación de Edman usando un secuenciador en fase gaseosa (Applied Biosystems), equipado con un analizador de aminoácidos de feniltiohidantoína en línea.

La tabla 5 muestra los 21 primeros aminoácidos del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de CCZ, y su comparación con las secuencias publicadas de la proteasa de la bromelina de tallo, ananaína y comosaína.

# ES 2 288 762 T3

TABLA 5

*Similitudes en la secuencia del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína CCZ y las de las proteinasas conocidas aisladas de la bromelina*

Proteinasa	Posición desde el extremo N-terminal
CCZ	V L P D S I D W R Q K G A V T E V K N R G 1            5            10            15            20
Proteasa de la bromelina de tallo	A V P Q S I D W R D Y G A V T S V K N Q N 1            5            10            15            20
Ananaína	V P Q S I D W R D S G A V T S V K N Q G 1            4            9            14            19
Comosaína	V P Q S I D W R N Y G A V T S V K N Q G 1            4            9            14            19

Todas las proteínas comparten homologías de secuencia. La ananaína y la comosaína difieren en 2 de 20 aminoácidos cuando se comparan con la proteasa de la bromelina de tallo. Por el contrario, CCZ difiere en 8 de 21 aminoácidos cuando se compara con la proteasa de la bromelina de tallo. CCZ difiere de la ananaína y la comosaína en 6 de 20 aminoácidos. Aunque está claro que estas proteínas están estructuralmente relacionadas, la proteína CCZ es la más diferente, mostrando divergencia significativa de las otras proteinasas aisladas de la bromelina. CCZ representa una proteína novedosa desconocida anteriormente en los extractos de bromelina bruta y, por tanto, parece ser un nuevo miembro de la familia de la cisteína proteinasa de plantas.

### Ejemplo 3

*Ensayo de proteínas fraccionadas para determinar la actividad inmunomoduladora*

#### a. Materiales

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de A. Tuck and Son Ltd (RU). Se usaron ratones de entre 8 y 10 semanas de edad en todos los experimentos. Los glóbulos rojos de oveja (SRBC) en disolución de Alsevers se adquirieron de TCS Biologicals (Buckingham, RU). El complemento de cobaya se adquirió de los laboratorios Harlan Sera y el medio de cultivo tisular RPMI 1640 se adquirió de laboratorios Gibco. El resto de los reactivos fueron de calidad analítica y se adquirieron de Sigma Chemical Co.

#### b. Ensayo en placa hemolítica de Jerne

Se utilizó el ensayo en placa hemolítica de Jerne (Weir, D. M. (ed.). 1986. *Handbook of Experimental Immunology*, 1-4, 4ª Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, RU) para someter a ensayo el potencial de adyuvante de las proteínas fraccionadas. Los experimentos se realizaron en las muestras fraccionadas de bromelina que se prepararon en dos ocasiones separadas. A cada muestra se le dio un único código (tabla 1), se sometió a diafiltración y se concentró cuando fue apropiado en solución salina isotónica mediante ultrafiltración (véase el ejemplo 1(f)). Todos los experimentos se llevaron a cabo de un modo doble ciego.

Se administró a los ratones una única inyección intravenosa de, o bien bromelina bruta, proteína fraccionada, o bien solución salina, tal como se muestra en la tabla 6. La bromelina bruta (200 µg; 1500 µmoles/min/ml) se suspendió en solución salina al 0,9% (200 µl) y se esterilizó mediante filtración inmediatamente antes de la administración. Las muestras fraccionadas (200 µl) se esterilizaron mediante filtración de manera similar. Los ratones a los que se administró solución salina sola se usaron como controles. La tasa de dosis para la bromelina bruta de 1500 µmoles/min/ml corresponde aproximadamente a un tercio de la DL<sub>50</sub> para la bromelina tal como se facilita en la Hoja de Datos de Seguridad de los Materiales (Materials Safety Data Sheet) disponible de Sigma Aldrich Ltd. Tras la administración de la bromelina bruta, las proteínas fraccionadas o la solución salina, los ratones se inmunizaron mediante inyecciones interperitoneales con glóbulos rojos de oveja (SRBC) (100 µl; 10<sup>7</sup> células). A los ratones usados como controles negativos se les administró solución salina sola (100 µl). Los ratones se sacrificaron 3 días tras la inmunización, momento en el que extrajeron los bazos y los esplenocitos se aislaron mediante filtración a través de un filtro de malla de nylon. Se determinó el número de células B que producían anticuerpos específicos frente al antígeno SRBC (es decir, células formadoras de placa (CFP) por 10<sup>6</sup> esplenocitos) usando el ensayo en placa hemolítica de Jerne.

## c. Análisis de los datos

Los valores numéricos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar. Se utilizaron pruebas de la t independientes (prueba de la t de Student; 2 vías) para probar las diferencias entre las medias en CFP. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) cuando se comparó la media de más de un tratamiento con los controles.

## d. Resultados

Los resultados del ensayo en placa hemolítica de Jerne se muestran en la figura 5 y en la tabla 6.

TABLA 6

Formación de CFP (número de células B que secretan anticuerpos frente a SRBC)

Grupo	Tratamiento	Nº de animales	CFP medias/10 <sup>6</sup> esplenocitos	Mediana (intervalo)	D.E.
<b>F</b>	brom + SRBC	8	68	65 (1-147)	47
<b>L</b>	s. salina + SBRC	8	29	28 (21-40)	7
<b>S</b>	CCS + SBRC	6	50	47 (13-90)	28
<b>T</b>	CCT + SRBC	3	42	26 (13-86)	32
<b>U</b>	CCU + SRBC	6	86	94 (25-123)	35
<b>V</b>	CCV + SRBC	6	44	35 (3-90)	34
<b>W/Y</b>	SBP + SRBC	9	46	37 (4-112)	29
<b>X</b>	CCX + SRBM	6	49	39 (8-98)	33
<b>Z</b>	CCZ + SRBM	6	102	95 (68-106)	31

La administración de bromelina bruta (QC2322) produjo un aumento significativo en las CFP en comparación con los controles con solución salina (CFP de bromelina/10<sup>6</sup> esplenocitos,  $68 \pm 47$ ; control con solución salina  $29 \pm 7$ ;  $P > 0,05$ ). Las proteínas fraccionadas CCZ y CCU también indujeron CFP significativamente superiores que los controles con solución salina ( $102 \pm 31$  y  $86 \pm 31$  CFP/10<sup>6</sup> esplenocitos, respectivamente;  $P < 0,002$ ) y produjeron más CFP que el extracto de bromelina bruta. Los componentes CCZ y CCU eluyen de manera diferente de la columna FPLC<sup>TM</sup> que la proteasa de la bromelina de tallo, la comosaína y la ananaína y las enzimas F9 bien descritas, lo que sugiere que CCZ y CCU son moléculas distintas. Cuando se sometió a ensayo la proteasa de la bromelina de tallo purificada (componentes combinados CCW y CCY) para determinar su efecto adyuvante, los resultados demuestran sólo un pequeño aumento en las CFP ( $46 \pm 29$  CFP/10<sup>6</sup> esplenocitos), lo que sugiere que la proteasa de la bromelina de tallo no es el componente responsable de la actividad adyuvante de la bromelina. De manera similar, la ananaína y la comosaína (CCS) también tienen actividad inmunomoduladora insignificante. Por tanto, el efecto adyuvante de la bromelina bruta no parece atribuirse a los componentes en la mezcla bruta que anteriormente se consideraba que tenía un papel inmunológico. Algunos componentes probados tenían valores de CFP superiores a los controles (y similares a la proteasa de la bromelina de tallo); sin embargo estos valores no fueron diferentes de manera significativa. El ligero aumento en las CFP observado con estos componentes y la proteasa de la bromelina de tallo es similar al observado anteriormente cuando a los ratones se les administraba tripsina y las respuestas pueden atribuirse a efectos proteolíticos no específicos.

## Ejemplo 4

*CCZ aumenta la producción de nitrato mediante los macrófagos y, por tanto, puede estimular la respuesta inmunitaria innata*

El ejemplo 3 demuestra que CCZ podría aumentar la respuesta inmunitaria adaptativa mejorando las respuestas de las células B frente a los antígenos dependientes de células T. A continuación, se deseó investigar si CCZ también podría mejorar la inmunidad innata investigando su efecto sobre los macrófagos, la principal población de células implicada en la inmunidad innata.

Un mecanismo de defensa importante del huésped frente a los parásitos intracelulares es la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos. Por tanto, se investigó si CCZ podría afectar a la producción de NO.

## ES 2 288 762 T3

### a. Materiales

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264 se estimuló en cultivo con IFN- $\gamma$  (100 U/ml) recombinante. Se midieron los niveles de nitrito en los sobrenadantes en cultivo usando el ensayo de Greiss (Roach *et al* (1991), *Infection and Immunity*, 59, 3935-3944).

### b. Método

Los macrófagos RAW 264 se trataron con, o bien CCZ (50  $\mu\text{g/ml}$ ), bromelina bruta (50  $\mu\text{g/ml}$ ) o proteasa de la bromelina de tallo (50  $\mu\text{g/ml}$ ) o se trataron de manera simulada con solución salina. Las células se lavaron entonces tres veces para eliminar el tratamiento y después se estimularon con IFN- $\gamma$ .

### c. Resultados

Se encontró que la bromelina bruta y CCZ, pero no la proteasa de la bromelina de tallo, aumenta significativamente la producción de nitrito mediada por IFN- $\gamma$  (figura 6). En las células tratadas con CCZ, el aumento en la producción de nitrito mediada por IFN- $\gamma$  fue significativamente mayor que en las células tratadas con solución salina, lo que sugiere que CCZ produce un efecto sinérgico con IFN- $\gamma$  para aumentar la producción de NO. Se produjo nitrito insignificante cuando los macrófagos se estimularon con CCZ o bromelina solo, lo que indica que ni CCZ ni bromelina activan la producción de nitrito. Para garantizar que la endotoxina contaminante potencial, que puede estar presente en la mezcla de CCZ, no era responsable del aumento en NO, se incluyó polimixina B (un potente inhibidor de la endotoxina) en los experimentos. La inclusión de polimixina B no afectó al aumento inducido por IFN- $\gamma$  en la producción de NO por las células tratadas con CCZ, lo que indica que la endotoxina contaminante potencial no era responsable del efecto observado (datos no mostrados).

Dada la importancia de la producción del óxido nítrico en la defensa del huésped frente a los patógenos intracelulares, la capacidad de CCZ para estimular la producción específica de este metabolito por los macrófagos indica que puede controlar diversas infecciones intracelulares.

### Ejemplo 5

#### *Inhibición del crecimiento in vitro de fragmentos de bromelina frente a un panel de líneas de células tumorales humanas*

Además del papel crítico del NO en la defensa del huésped frente a la infección, también se ha demostrado que es un potente agente de eliminación de las células tumorales. Hibbs (1991, *Res. Immunol*, 142, 565-569) ha demostrado que cuando los macrófagos producen NO, eliminan células tumorales *in vitro*. Por tanto, se ha propuesto que el óxido nítrico pueda usarse en el tratamiento contra el cáncer (Sagar *et al*, (1995), *Cancer Treatment Reviews*, 21, 159-181). Por tanto, se investigó si CCZ podía bloquear el crecimiento tumoral de varias líneas de células tumorales humanas diferentes *in vitro* y, por tanto, actuar como un agente antitumoral. Se determinaron las propiedades inhibitorias sobre el crecimiento comparativas de la proteína CCZ y la proteasa de la bromelina de tallo frente a un panel de quince líneas de células tumorales humanas representativas de cinco de los cánceres sólidos más comunes en seres humanos: de ovario, colon, mama, pulmón y melanoma.

Las líneas celulares se trataron con tripsina y se sembraron células viables individuales en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad de  $4 \times 10^3$  por pocillo en 160  $\mu\text{l}$  de medio de crecimiento. Tras permitir la unión durante toda la noche, se añadieron CCZ, SBP o bromelina a los pocillos por cuadruplicado en el medio de crecimiento para dar un intervalo de concentraciones finales en los pocillos de 50, 10, 2,5, 1 y 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . Ocho pocillos se asignaron como células no tratadas control. Los extractos se diluyeron inmediatamente antes de la adición a las células en agua estéril. La exposición del extracto fue durante 96 horas, con lo cual el número de células en cada pocillo se determinó usando tinción con sulforhodamina B al 0,4% en ácido acético al 1%, tal como se describió anteriormente (Kelland *et al*, *Cancer Res.* 53, 2581-2586 (1993)). Entonces se calcularon las concentraciones inhibitorias al 50% ( $\text{CI}_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ) a partir de las representaciones gráficas de la concentración frente al % de la absorbancia control (lectura a 540 nm).

### Resultados

Los extractos se disolvieron satisfactoriamente y los valores de  $\text{CI}_{50}$  se muestran en la figura 7.

Como puede observarse a partir de la figura 7, la proteína CCZ mostró una potencia *in vitro* comparable a la de QC2322 (bromelina bruta) y la proteasa de la bromelina de tallo frente a todas las líneas celulares. CCZ mostró una  $\text{CI}_{50}$  media a través de la totalidad de las 15 líneas de 11,9  $\mu\text{g/ml}$ , generalmente con menos actividad frente a SKOV-3 (de ovario), LOVO (de colon), MDA231 (de mama), MDA361 (de mama) y MOR (de pulmón).

El método utilizado en este ejemplo se basa en la detección de las células inmovilizadas a los pocillos de la bandeja de microtitulación. La actividad inhibitoria sobre el crecimiento se determina mediante la tinción de las células tras el tratamiento con las fracciones de bromelina. Las células muertas o moribundas llegan a desprenderse de los pocillos y, por tanto, no se tiñen. Las células también pueden extraerse de los pocillos mediante tratamiento con altas concentraciones de enzimas tales como tripsina; un procedimiento denominado "tripsinización". Por tanto, es posible

## ES 2 288 762 T3

que la actividad inhibidora sobre el crecimiento de CCZ y bromelina esté producida por una eliminación no específica de las células de los pocillos que surge a partir de la actividad proteolítica, en lugar de un efecto “anticancerígeno” específico de las fracciones.

5 En vista de esto, se ajustaron los resultados facilitados en la figura 7 para la actividad proteolítica de cada una de las fracciones. Los resultados ajustados se facilitan en la figura 8.

10 Usando esta interpretación, puede observarse a partir de la figura 8 que se obtiene un análisis de los resultados algo diferente. Una vez que se ha tenido en cuenta la actividad proteolítica de cada una de las fracciones, puede observarse que CCZ tiene una actividad anticancerígeno significativamente mayor que cualquiera de la bromelina bruta o proteasa de la bromelina de tallo.

15 Para confirmar que CCZ sí tiene de hecho actividad inhibidora del crecimiento se diluyeron la bromelina bruta, la proteasa de la bromelina de tallo y CCZ para que contuvieran actividad proteolítica equivalente ( $5,7 \mu\text{moles/min/ml}$ ) y se probaron para determinar su capacidad para evitar el crecimiento del tumor de ovario CH1. La figura 9 confirma que CCZ sí tiene, de hecho, actividad inhibidora más potente del crecimiento que cualquiera de la bromelina bruta o la proteasa de la bromelina de tallo.

20

25

30

35

40

45

50

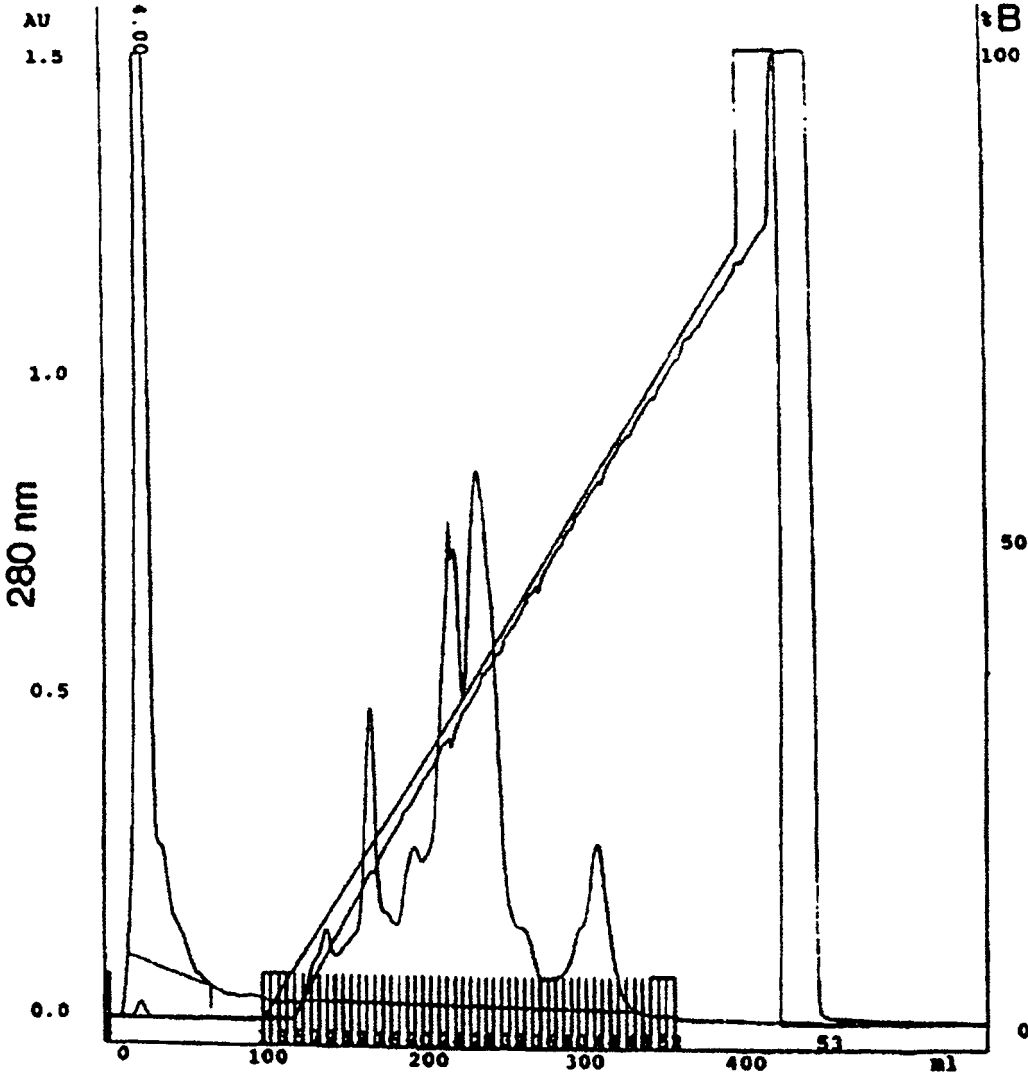
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína aislada que tiene un peso molecular de aproximadamente 27,45 kDa tal como se determina mediante SDS-PAGE, un punto isoeléctrico de 9,7 tal como se determina mediante enfoque isoeléctrico y una secuencia de aminoácidos N-terminal Val Leu Pro Asp Ser Ile Asp Trp Arg Gln Lys Gly Ala Val Thr Glu Val Lys Asn Arg Gly, proteína aislada que es un componente de la bromelina que puede obtenerse mediante el método siguiente:
- (i) disolver la bromelina en tampón acetato 20 mM a pH 5,0 que contiene EDTA sódico 0,1 mM;
  - (ii) separar los componentes de la bromelina mediante cromatografía líquida para la separación rápida de proteínas en SP-Sepharose HP, eluyendo con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0 a 0,8 M en tampón acetato sobre 300 ml;
  - (iii) recoger la fracción correspondiente al tercer pico que se obtiene de la columna, que aparece en el borde ascendente del primer pico principal de proteasa de la bromelina de tallo; y
  - (iv) aislar la proteína de la fracción obtenida en la etapa (iii).
2. Ácido nucleico aislado que codifica para la proteína aislada según la reivindicación 1.
3. Ácido nucleico aislado que es complementario al ácido nucleico aislado según la reivindicación 2.
4. Proteína recombinante que tiene un peso molecular de aproximadamente 27,45 kDa tal como se determina mediante SDS-PAGE, un punto isoeléctrico de 9,7 tal como se determina mediante enfoque isoeléctrico y una secuencia de aminoácidos N-terminal Val Leu Pro Asp Ser Ile Asp Trp Arg Gln Lys Gly Ala Val Thr Glu Val Lys Asn Arg Gly, producida usando el ácido nucleico aislado según la reivindicación 2.
5. Proteína aislada según la reivindicación 1 o proteína recombinante según la reivindicación 4, para su uso en la medicina humana o veterinaria.
6. Uso de la proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína recombinante según la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para la medicina humana o veterinaria.
7. Uso de la proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína recombinante según la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento inmunoestimulante.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento inmunoestimulante es para el tratamiento de inmunodeficiencias primarias o inmunodeficiencias secundarias que resultan de desnutrición, infección, tumores, traumatismos, tratamiento médico con fármacos, pérdida de proteínas, diabetes y vejez.
9. Uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento inmunoestimulante es un adyuvante de vacuna.
10. Uso de la proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína recombinante según la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para tratar una infección microbiana.
11. Uso de la proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína recombinante según la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer es cáncer de ovario, mama, colon o pulmón, melanoma, leucemia o linfoma.
13. Composición farmacéutica o veterinaria que comprende la proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína recombinante según la reivindicación 4, junto con un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.
14. Composición de vacuna que comprende una vacuna, un adyuvante que comprende la proteína aislada según la reivindicación 1 o la proteína recombinante según la reivindicación 4, junto con un excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.
15. Composición de vacuna según la reivindicación 14, que está formulada para la administración enteral, nasal, oral o anal.
16. Composición de vacuna según la reivindicación 14, que está formulada para la administración parenteral.
17. Composición de vacuna según la reivindicación 16, en la que la administración parenteral es mediante una vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.



Volumen  
FIG. 1

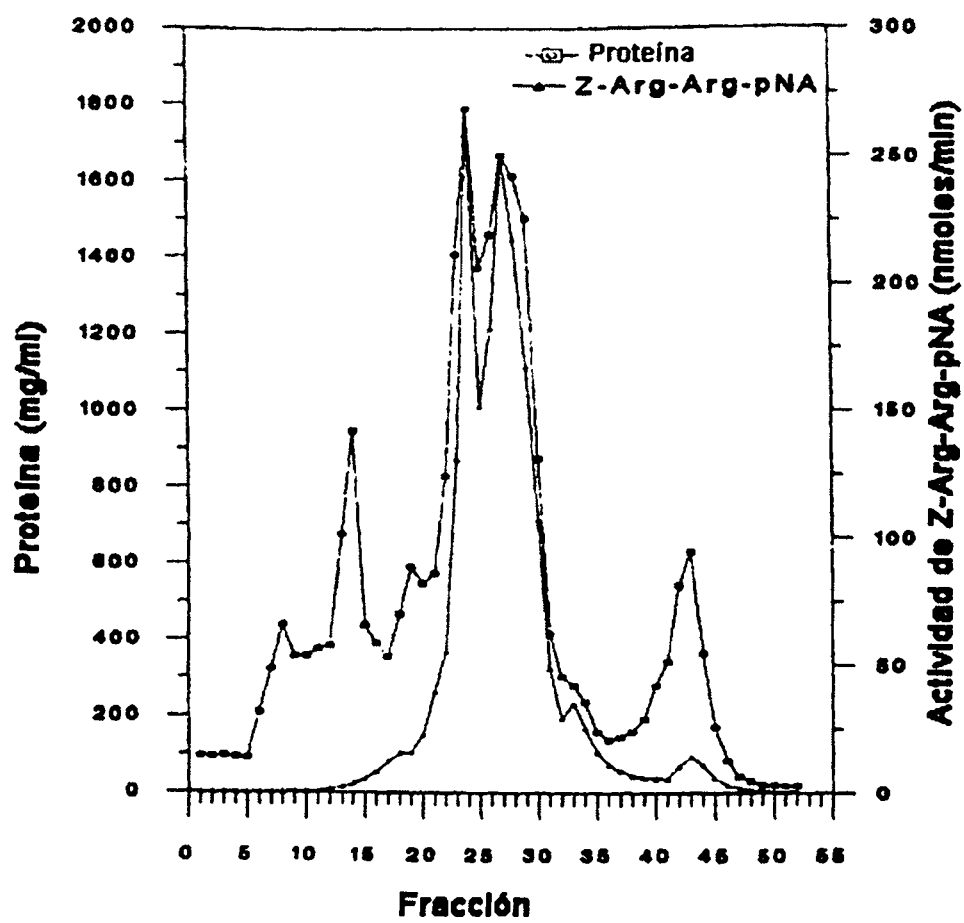


FIG. 2

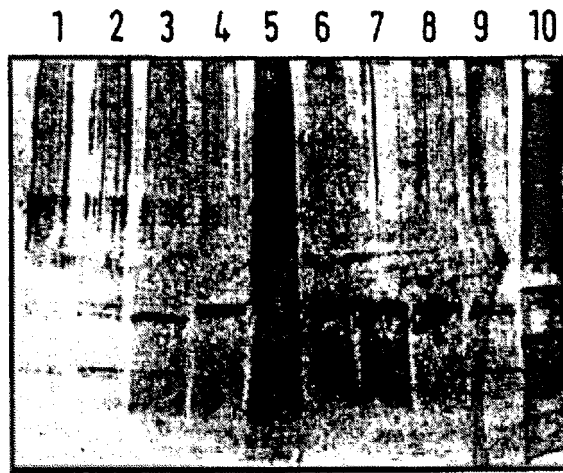


FIG. 3

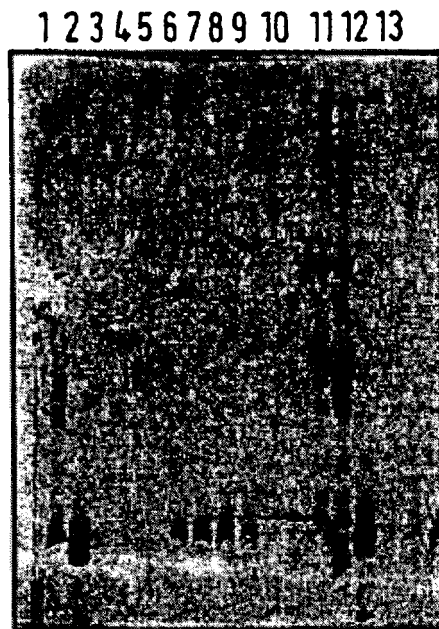


FIG. 4

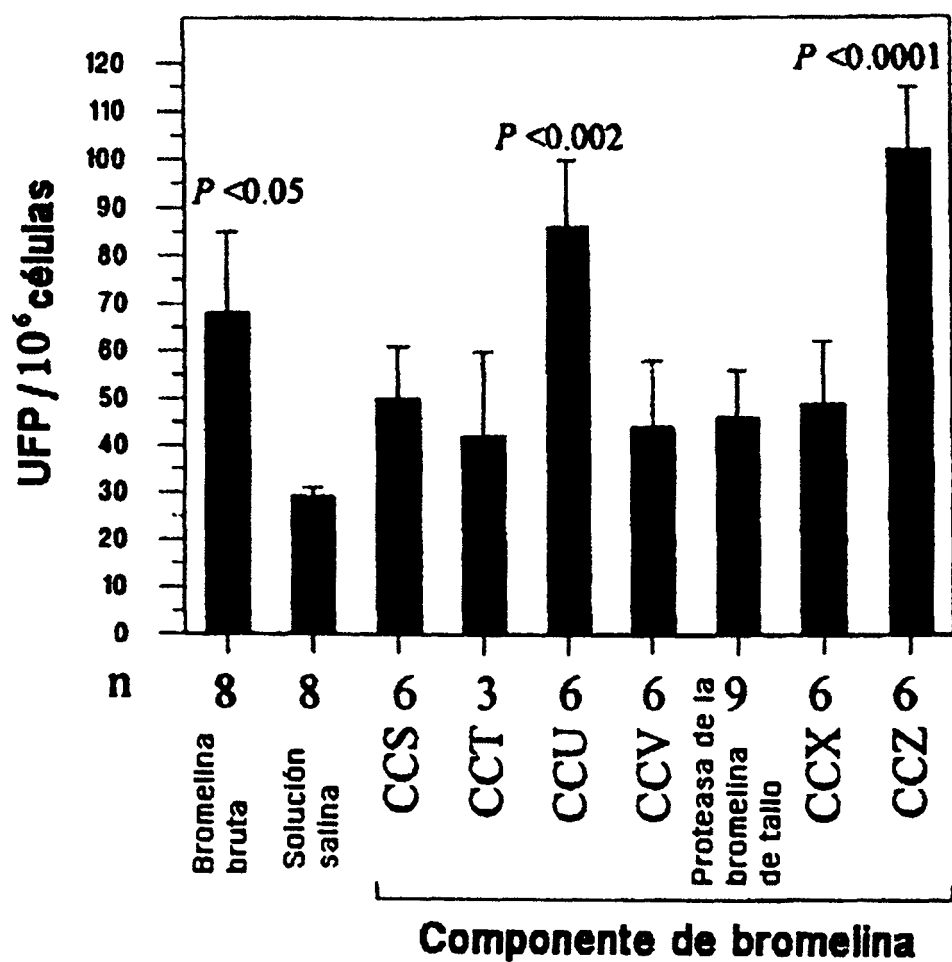


FIG. 5

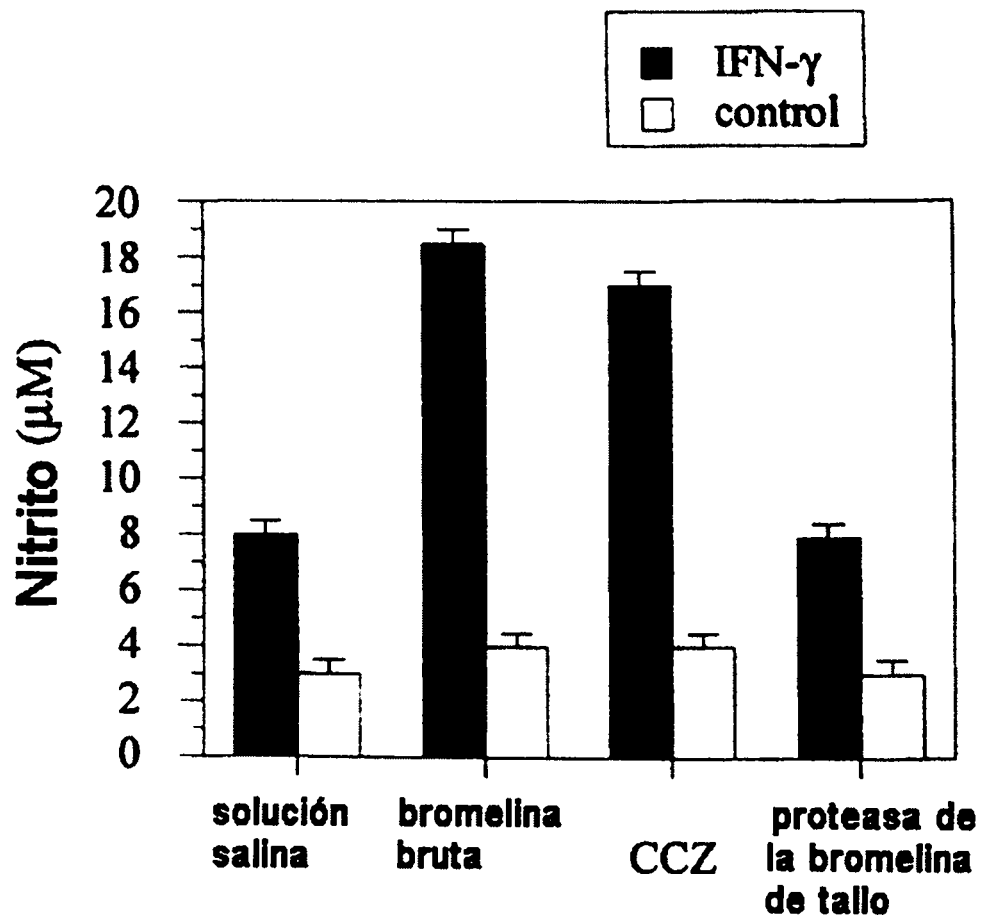


FIG. 6

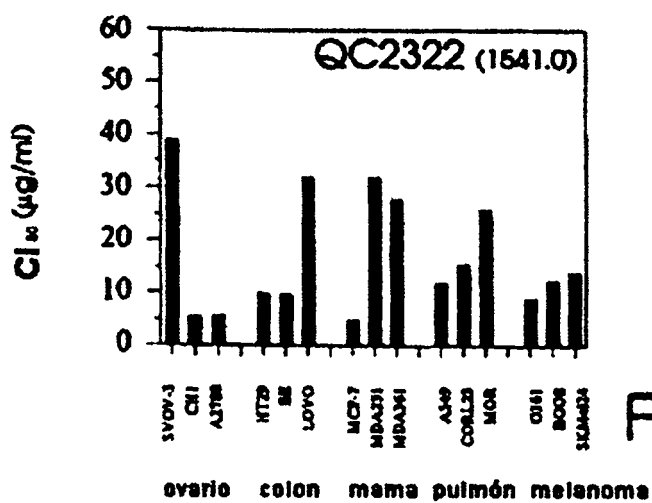
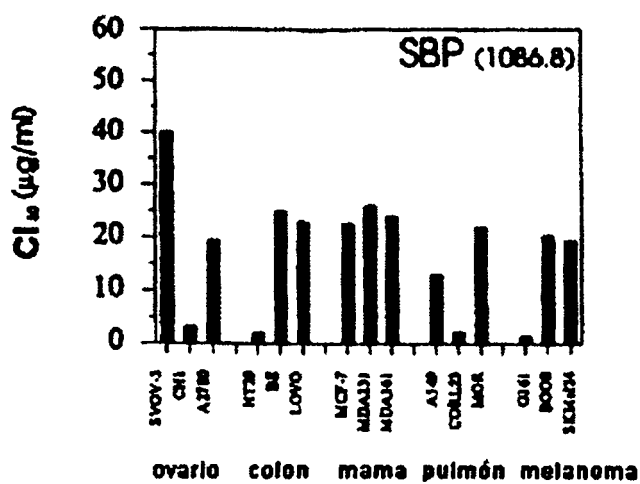
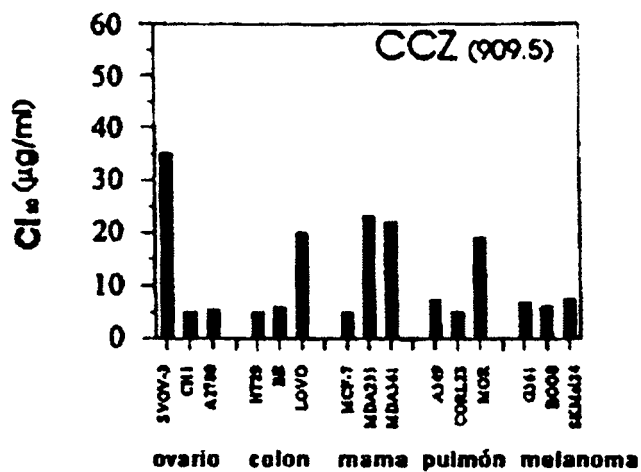


FIG. 7

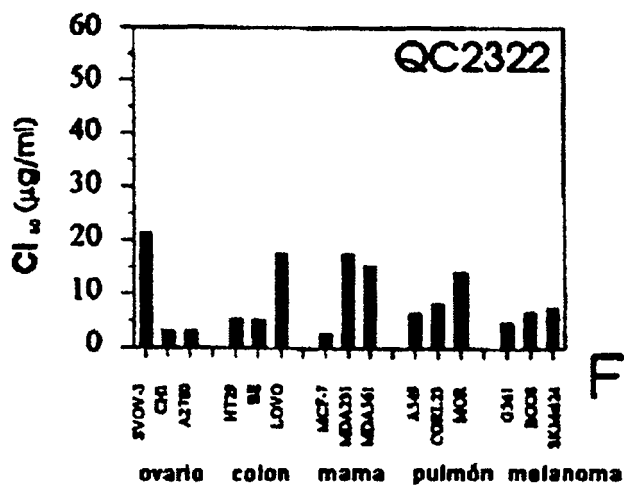
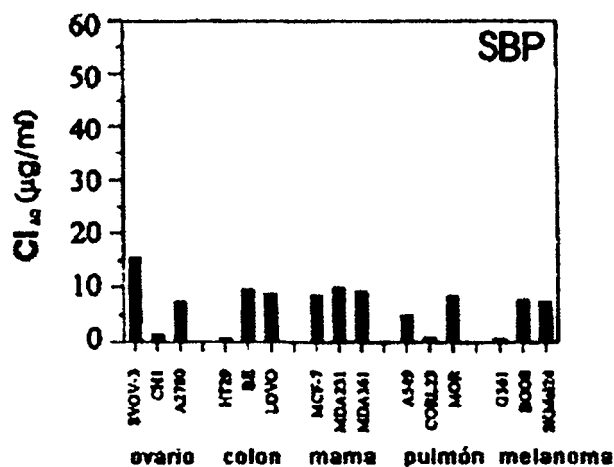
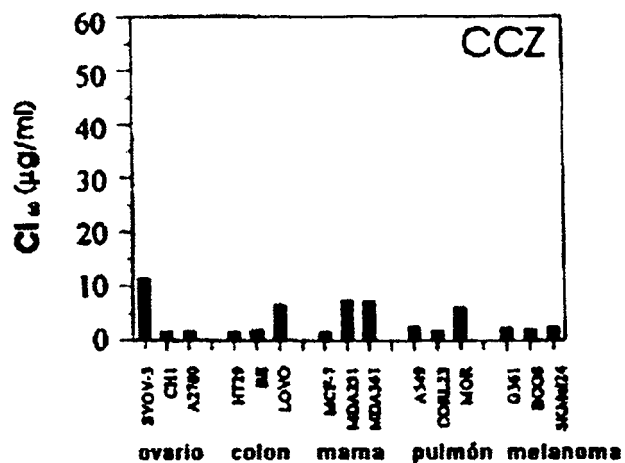


FIG. 8

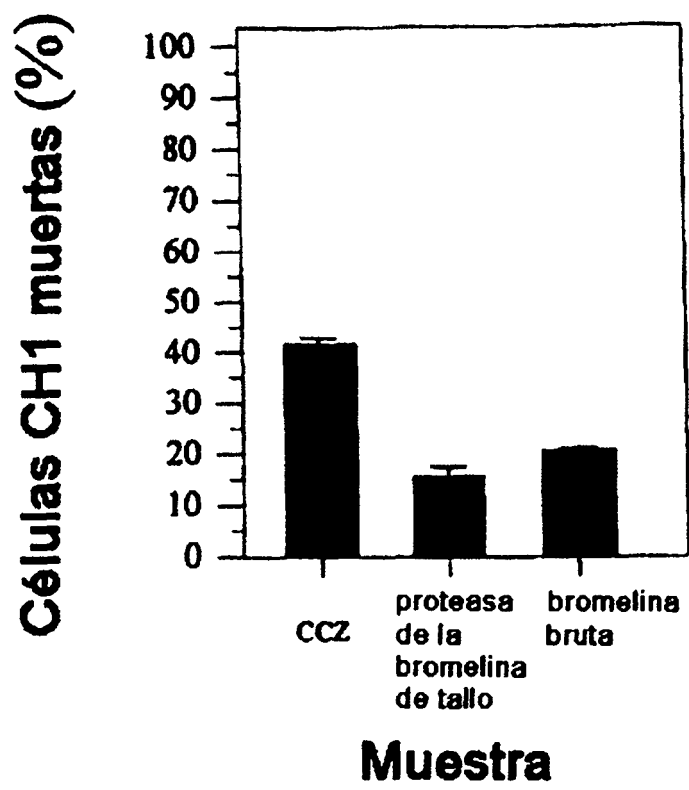


FIG. 9

# ES 2 288 762 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: CORTECS (UK) LIMITED
  - (B) CALLE: FIRST FLOOR, OSPREY HOUSE
  - 10 (C) CIUDAD: LOWER SQUARE
  - (D) ESTADO: ISLEWORTH, MIDDLESEX
  - (E) PAÍS: LONDRES, INGLATERRA
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): TW7 6BN
- 15
- (A) NOMBRE: MYNOTT, Tracey, Lehanne
  - (B) CALLE: IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE TECHNOLOGY & MEDICINE
  - 20 (C) CIUDAD: DEPT OF BIOCHEMISTRY
  - (D) ESTADO: EXHIBITION RD
  - (E) PAÍS: LONDRES, REINO UNIDO
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): SW7 2AZ
- 25
- (A) NOMBRE: ENGWERDA, Christian
  - (B) CALLE: LONDON SCHOOL OF HYGIENE & TROPICAL MEDICINE
  - 30 (C) CIUDAD: DEP. OF MEDICAL PARASITOLOGY
  - (D) ESTADO: KEPPEL STREET
  - (E) PAÍS: LONDRES, REINO UNIDO
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): WC1E 7HT
- 35
- (A) NOMBRE: PEEK, Keith
  - (B) CALLE: CORTECS (UK) LIMITED
  - 40 (C) CIUDAD: RESEARCH & DEVELOPMENT DIV
  - (D) ESTADO: NEWTECH SQUARE
  - (E) PAÍS: DEESIDE IND PARK, UK
  - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH5 2NT
- 45 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: COMPONENTE DE BROMELINA
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 50 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - 55 (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.30 (EPO)
- (v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- NÚMERO DE SOLICITUD: WO PCT/GB98/00591
- 60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - 65 (A) LONGITUD: 21 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) TIPO DE CADENA: sencilla

## ES 2 288 762 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

Val Leu Pro Asp Ser Ile Asp Trp Arg Gln Lys Gly Ala Val Thr  
1 5 10 15  
Glu Val Lys Asn Arg Gly  
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Ala Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Tyr Gly Ala Val Thr  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Asn Gln Asn  
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

Val Pro Gln Ser Ile Asp Trp Arg Asp Ser Gly Ala Val Thr  
1 5 10  
Ser Val Lys Asn Gln Gly  
15 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

