

B
OK



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

07-11575

54 TÍTULO

COMPOSICION FARMACEUTICA CONTENIENDO FRAGMENTOS

POLYPEPTIDICOS DE SERRALISINAS

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71 SOLICITANTE

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGICA

DOMICILIO

CIUDAD DE LA HABANA 10600, CUBA

74 APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22 BOGOTÁ, D. C.,

MS 98 02 2007

Coin

✓



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07/0115/5- -00000-0000 ción
Fec: 20/12/05 17:31:48 Dep. 20/20 NUECREACIONES
Itm. 11 PATENTE
Lvo: 3/8 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 10

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1 ☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, sociedad constituida y existente bajo las leyes de República Cuba. Dirección: Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana 10600, Cuba Domicilio: Ciudad de La Habana 10600, Cuba	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
--------------------------	--	---

3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@camyp.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 438.019 T.P 31.929
-----------------------------------	---	---

4 INVENTOR (ES) (72)	1. María ABRAHANTES PÉREZ, Calle 186 # 3112 Apto 68, Entre 31 y 33 , Reparto Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana 10600, Cuba 2. Jesús REYES GONZÁLEZ, Calle 186 # 3112 Apto 68, Entre 31 y 33, Reparto Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600, Cuba 3. Gloria VÉLIZ RÍOS, Calle 140 # 4514, Entre 45 y 49, Cocosolo, Marianao, Cuidad de la Habana 11500, Cuba 4. Eduardo MARTINEZ DÍAZ Calle 186 # 3117 Apto 14 E, Entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600, Cuba	7. Mónica BEQUET ROMERO, Zapata, # 1868 Apto 18, Entre 12 y 14, Plaza, Ciudad de la Habana 10400 Cuba 8. Luis Javier GONZALEZ LOPEZ, Calle 186 e/ 31 y 33, Apto 8C. #3115, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600, Cuba 9. Lila Rosa CASTELLANOS SERRA, Kohly 51, entre 28 y 30, Nuevo Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana 10600, Cuba 10. Manuel SELMAN-HOUSEIN SOSA, Calle 186 # 3117, Apto 6D, Entre 31 y 33 , Playa, Ciudad de la Habana 10600, Cuba
----------------------------	--	---

	9 Caridad GASMURI GONZÁLEZ Calle 84 # 516, Entre 5ta A y 5ta B, Playa, Ciudad de la Habana 11300, Cuba	11 Raúl GÓMEZ RIERA, Ave 51 # 10032, Entre 100 y 104, Marianao Ciudad de la Habana 11500 Cuba
	8 José GARCIA SUAREZ, Calle 186 # 3117 E/ 31 y 33 Apto 4B Entre 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600, Cuba	12 Jorge Victor GAVILONDO COWLEY, Calle G # 480, Entre 19 y 21 Apto 11 Vedado Plaza, Ciudad de la Habana 10400 Cuba

5 PCT (86)
 Solicitud Internacional No PCT/CU2005/000003 Fecha 05 de Julio de 2005
 Publicación Internacional No WO 2006/05268 A2 Fecha 19 de Enero de 2006

6 Título (54)
C MPOSICIÓN FARMACEUTICA CONTENIENDO FRAGMENTOS POLIPEPTIDICOS DE SERRALISINAS

7 Clasificación Internacional (51) A61K 38/16

8	Prioridad	(33) Pais de Ongen	(32) Fecha	(31) Numero de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>CU</u>	<u>08 de Julio de 2004</u>	<u>2004-0147</u>

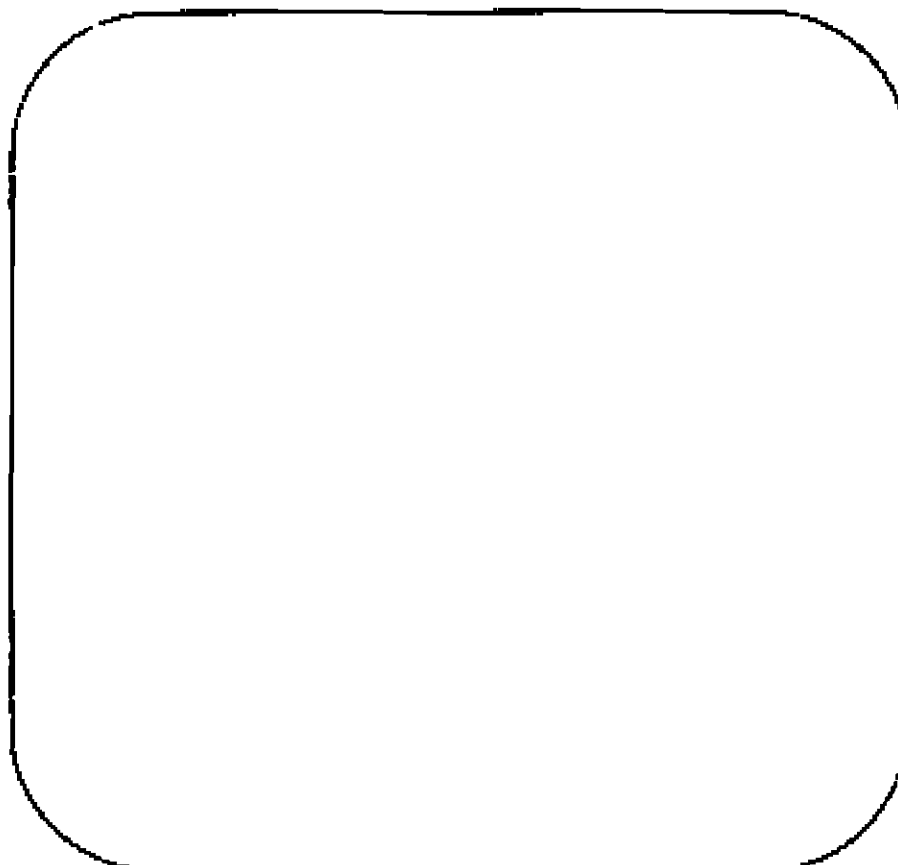
9 Comprobante de pago No _____ Fecha _____

10 Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 482 000 oo
☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
☒ Poderes, si fuere el caso.
☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
☐ Declaraciones
☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
☐ Arte final 12x12
☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

Figura Característica



12

Solicito la concesion de la patente

NOMBRE

EMILIO FERRERO

FIRMA


C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

QCB

Documentos anexos

- 1 ☒ Publicación Internacional WO 2006/05268 A2

Descripción

Páginas en el idioma original 38

Reivindicaciones Número (s) 12

Figuras Numero (s) 16

- 2 ☒ Traducción de los Anexos del IPRP

- 3 ☒ Listado de secuencias

- 4 ☒ Extracto de publicación

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**



5

REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCION JURIDICA

José D. Porras Chaparro, Jo Julio D. Alvarez Domínguez, Orlando F. Acosta Fay, María Silvia Ferrer de Villar, Jo Adela de Fuenzaldra, Jo Mariana Capas Ruiz, Jo J. Fernández Porras, Funcionarios autorizados para certificar Autenticaciones de firma en Documentos expedidos para circulación en el extranjero.

DECLARO QUE AL PRESENTE AUTENTICA DEL FUNCIONARIO AUTORIZADO DE ESTE DOCUMENTO LA FIRMA QUE ANTECEDE POR LA SEMEJANZA QUE GUARDA CON LA QUE ESTA REPRESENTADA EN ESTE CENTRO COMO LA QUE EL MISMO ACOSTUMBA A USAR EN SUS ACTOS OFICIALES.

EN FE DE LO CUAL AUTORIZO LA PRESENTE CON LA FIRMA Y EL SELLO DE ESTE MINISTERIO.

LA HABANA 28 NOV 1997



CAVELIER

ABOGADOS

IDIFICIO SIEKI

CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, S. COLOMBIA

Para patentes, modelos de utilidad y diseños industriales, marcas de fábrica y de servicio, nombres comerciales, enseñas y lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

La que suscribe, CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,

sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Cuba,

domiciliada en 31 Street 1/150 & 190, Cubanacan, Playa, Habana, Cuba, designa a GERMAN CAVELIER, tpa. 832, GONZALO PERDOMO, tpa. 831, EMILIO FERRERÓ, tpa. 31929, y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Consúl de Colombia, en el extranjero, y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de nuestra propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizamos a los dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales, el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, renuncia voluntaria, y registro de licencias de uso de esos derechos, b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con estos derechos, acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan, y en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes, oficiales,

Firmado en la ciudad de La Habana

el 17 de Noviembre de 1997

Dr. Manuel de Jesús Lindero Vidal



© CAVELIER ABOGADOS

WPPODERE-10 (MINUTA N° 1211141)

Notario de la Oficina de Registro y Conservación del Ministerio de Justicia y Poder Judicial de Cuba

Dijé 49. Glosa final para el que ante el presente se le da fe y se le da fe de la Oficina de Registro y Conservación del Ministerio de Justicia y Poder Judicial de Cuba

La Habana, a los 17 de Noviembre de 1997

Para los países que no son parte del Protocolo Interamericano de 1940 sobre Uniformidad del Régimen Legal de los Poderes, el Cónsul Colombiano debe certificar como sigue*

Fecha

Nº _____

El suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

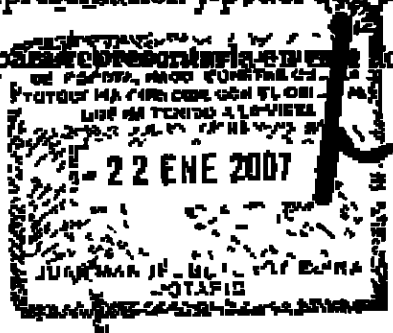
CERTIFICA

1º Que el señor
quien autentica el documento anterior, ejercía legalmente en la fecha allí indicada, las funciones de

y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus
actos oficiales

2º Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía
que actualmente ejerce su objeto social y, existe legalmente, y

3º Que el señor
quien firmó la representación y poder que preceden en su carácter de
de la Compañía
está autorizado para representarla en este acto, y otorgar el poder



Cónsul de Colombia

* Son parte del Protocolo Colombia, El Salvador, México, Venezuela y los Estados Unidos. En los demás países el Señor Cónsul de Colombia debe otorgar el certificado según el modelo de esta página

FECHA

No

Es suscrito CONSUL DE COLOMBIA en

C E R T I F I C A

1o Que el señor
quien autoriza el documento anterior, ejercía legalmente
en la fecha allí indicada, las funciones de
y que la firma
y sello que en el documento aparecen como suyos son los que
usa y acostumbra en sus actos oficiales

2o) Que tuvo a la vista las pruebas de que la Compañía

" CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,

domiciliada en 31 Street 1/156 A 1805, Habana, Cuba,

existe legalmente y que actualmente ejerce su objeto social
de acuerdo con las leyes del respectivo país.

3o) Que el señor

firmó el poder que precede en su carácter de

está autorizado para

representarla en este acto y otorgar el poder

DERECHOS US\$

CONSUL

10100 REC
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
51 52 53 54 55 56 57 58 59 60
61 62 63 64 65 66 67 68 69 70
71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

COMO GUARDAR EN TU DEL...
DE AMERICA HAGO FOMELAR DE LA
FOTOCOPIA CONECTOS CON EL...
QUE ME TENGAS A LA V...
22 ENE 200...
JUAN MAN...
ROTA...



Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No 68/97

La Habana, Diciembre 26 de 1997

El suscrito Consul General de Colombia, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA**

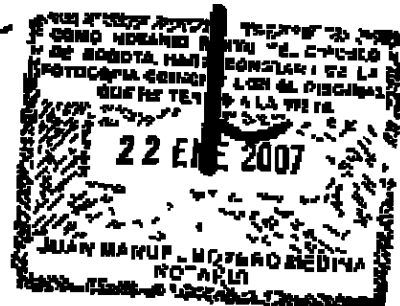
Que el Señor Jesús Fernández Ponca, quien como funcionario de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autentico la firma del signatario del poder precedente, ejercia en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado. Que el CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA es una unidad presupuestada constituida de acuerdo con las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas, Que el Señor Manuel de Jesús Linares Vidal, quien en su carácter de Director de la citada unidad presupuestada confiere el poder precedente en su representante legal en este país.

La Cónsul General de Colombia no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



Martha Niño de Stand

Martha Niño de Stand
Consul General



PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

US\$ 5.00 (cinco dólares)
US\$ 100.00 (cien dólares)
US\$ 105.00 (ciento cinco dólares)

CENTRO DE INC. GENÉT. Y BIOLÓG.
C/ D. OSGOZ EC" 234

11-11-11

NO SE ADONE.
RESPONSABLE ADMINISTR. TEXTE

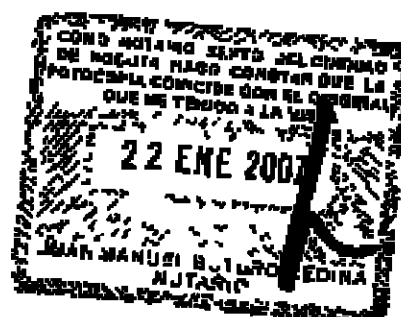
1990 ENE 13/12/12

JEFE DE LEGALIZACIONES
GABINETE DE GOBIERNO D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

202497

UNA FUERZA APARECE EN EL
MOMENTO DE SE EMPEÑA
FUNCIONES VARIAS



9

CAVELIER

ABOGADOS

TELÉFONO 177 11 7777
CALLE CAVALIERES
BOGOTÁ 40478

EDIFICIO SISM
CALLE 47 No 75 35
BOGOTÁ 8 COLOMBIA

COMPRO ELECTRONICO MUNDIAL CAVE
TELÉFONO 187101 PIEDICQ

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D

Poderdante CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Poder conferido el 19-11-97

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, sténtamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No 31 929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T P A No 832

C C No 2 877 924 de Bogotá

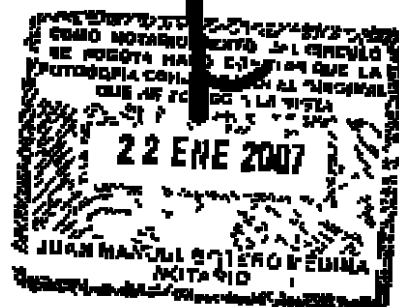
Acepto,



EMILIO FERRERO

T P A No 31 929

C C No 438 019 de Usaquén



2e-780-2

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

ACTA DE MATRIMONIO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá D. C. 22 ENE 2000

1. Los señores MANUEL BOTERO MEDINA

2. Y LA SEÑORA DEL CIRCULO DE BOGOTA

3. En presencia de los señores

4. Los señores

5. Los señores

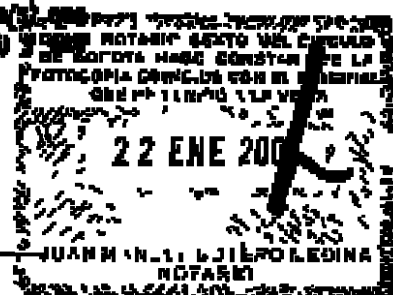
6. Los señores

7. Los señores

8. Los señores

9. Los señores

10. Los señores



11. Los señores



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de Enero de 2006 (19.01.2006)

PC1

(18) Número de Publicación Internacional
WO 2006/005268 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 38/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/265 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

(11) Número de la solicitud internacional
PCT/AR2004/000003

(22) Fecha de presentación internacional
5 de Julio de 2005 (05.07.2005)

(25) Idioma de presentación español

(26) Idioma de publicación español

(30) Datos relativos a la prioridad:
MXM 0147 8 de Julio de 2004 (08.07.2004) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados antes de la CLASIFICACION DE INGENIERIA GENETICA Y PROTECCION DE LA VIDA) (CU) Ave 3 entre 158 y 190 Cabañeta Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU).

(72) Inventores:

(75) Inventores/Colaborantes (para US solamente) ABRA ELAYTES PÉREZ, Muru del Carmen (CU) Calle 186 # 3112 Aptn 68 Entre 31 y 33, Reparto Cabañeta Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU) REYES GONZALEZ, Isaac (CU) Calle 186 # 3112 Aptn 68 Entre 31 y 33 Reparto Cabañeta Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU) VÍCTOR MORALES, Graciela (CU) Calle 140 # 4514 Entre 45 y 49 Cacosolo Matanzas, Ciudad de La Habana 11500 (CU) MARTINEZ DÍAZ Edmaria (CU) Calle 186 # 3117 Aptn 142, Entre 31 y 33 Cabañeta Playa Ciudad de La Habana 10600 (CU) GABRIELA GONZALEZ, Carolina Arufo (CU) Calle 84 # 316 entre 50 A y 50 B, Playa, Ciudad de La Habana 11500 (CU) GARCÍA SUÁREZ, Tere (CU) Calle 186 # 3117 entre 31 y 33 Aptn 48

Entre 31 y 33 Cabañeta Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU) BRIGITTE ROMERO, Mónica (CU) Zapala # 1868 apta 18 entre 12 y 14 Playa, Ciudad de La Habana 10400 (CU) GONZALEZ LÓPEZ, Luis Javier (CU) Calle 186 entre 31 y 33, Aptn 68 Cabañeta Playa Ciudad de La Habana 10600 (CU) CAROL LAMON MORA, Lila Rosa (CU) Calle 11 entre 28 y 30, Nuevo Vedado Pura de la Revolución (Ciudad de La Habana 10600 (CU) ESTEBAN DOMINGUEZ MORA, Manuel (CU) Calle 186 # 3117, Aptn 68, entre 31 y 33 Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU) ROSALY MORA, María (CU) Ave 51 # 10002 Entre 100 y 102, Miramar Ciudad de La Habana 11500 (CU) CAYETANO COMPLEY, Jorge Victor (CU) Calle 6 # 460 Entre 19 y 21 Aptn 11 Vedado Plaza, Ciudad de La Habana 10400 (CU)

(74) Mandatario BELMA Y KOURIN MORA, Mandat: Ave 31 entre 158 y 190 Cabañeta, Playa, Ciudad de La Habana 10600 (CU)

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para cada clase de protección nacional aplicable) AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GT, HK, HN, HU, ID, IG, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NG, NI, NO, NL, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SV, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(86) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para la clase de protección regional aplicable) AEPO (RW, CH, CN, KR, LA, MW, NL, NA, SI, SL, SZ, TZ, TN, ZM, ZW) suiza (AT, BE, CH, CY, CZ, DE, DK, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, NO, PT, SE, SI, SK, SM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VE, VN, YU, ZA, ZM, ZW)

(Continúa en la página siguiente)

(54) TITLE PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING POLYPEPTIDE FRAGMENT OF SERPINE

(54) Título COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA CONTIENIENDO FRAGMENTOS DE PÉPTIDOS DE SERPINA

(57) Abstract: The invention relates to a composition that can inhibit the growth of tumor cells of different histological origin and cancer epithelial cells. The composition of said composition are polypeptide fragments of serpins, corresponding to the C-terminal fragment, from the internal methionine of the sequence to the end of the molecule, which can be combined with one another and optionally with proligands which potentiate the anti-tumor effect of the composition. The proportions in the composition can be at a concentration of between 0.1 - 100 µM. The anti-proliferative action of the composition is provided by specific mechanisms. The *in vivo* administration of the inventive composition has an anti-tumor effect, an anti-angiogenic effect and protects against malignant tumors.

(57) Resumen: La presente invención está relacionada con una composición capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales de diferentes orígenes histológicos y de células epiteliales cancerígenas. Los componentes de dicha composición son fragmentos peptídicos de serpinas correspondientes al fragmento C-terminal, a partir de la metionina interna de la secuencia hasta el final de la molécula, los cuales pueden combinarse entre ellos y opcionalmente con proligandos que potencian el efecto anti-tumoral de la composición. Las proporciones en la composición pueden estar a una concentración de 0.1 - 100 µM. La acción anti-proliferativa de la composición está mediada por mecanismos específicos. La administración *in vivo* de la composición tiene un efecto anti-tumoral, un efecto anti-angiogénico y protege contra tumores malignos.

WO 2006/005268 A2

Para códigos de dos letras y otros abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

— sin informe de la segunda Internacional, será publicada solamente cuando se reciba dicho informe

52
12

1

COMPOSICIÓN FARMACEUTICA CONTENIENDO FRAGMENTOS POLIPEPTIDICOS DE SERRALISINAS

Campo de la invención

- 1 La presente invencion esta relacionada con el campo de la biotecnologia, la industria farmaceutica y en particular con la obtencion de una composicion capaz de inhibir el crecimiento de celulas tumorales. Esta composicion contiene fragmentos polipéptidicos de Serralisinas, obtenidos de la degradación de la proteína integra los cuales tienen un mayor efecto anti-proliferativo que las moléculas de Serralisinas integras. Dichos
- 10 fragmentos pertenecen al C-terminal de las Serralisinas a partir de la metionina interna de la secuencia hasta el final de la molecula y la combinacion de los mismos con prodigiosinas que potencian el efecto anti-tumoral de esta composición

Arte previo

- 15 La quimioterapia del cáncer se ha dirigido tradicionalmente a la inhibición de la proliferacion de celulas cancerigenas. Sin embargo, en los ultimos años se ha incrementado el interés por los productos antitumorales inductores de apoptosis, ya que el cancer se ha instituido como una patologia relacionada con la deficiencia relativa de los mecanismos de apoptosis en lugar de un exceso de proliferacion.

- El uso de bacterias o sus extractos en el tratamiento del cáncer se remonta a más de
- 20 100 años. El reporte más citado es el del físico y cirujano William B. Coley del Hospital Memorial en la ciudad de New York, ahora llamado Hospital Memorial Sloan-Kettering. El observó que muchos de sus pacientes con varios tipos de cancer presentaron regresion tumoral despues de ser infestados por bacterias patógenas (Coley, W. B. 1991-reprinted from 1893- Clin Orthop 262:3).

- 25 La resistencia a los tumores en pacientes o animales infestados se atribuía a la inmunidad antitumoral concomitante mediada por celulas (Paglia, P. and Guzman, C. A. 1988. Cancer Immunol Immunother 46:88). La idea de que la infección con bacterias o protozoos patógenos pueden activar la regresión del cáncer a través de la activación de la inmunidad innata o adaptativa ha sido cuestionada recientemente por
- 30 Hunter et al. (Hunter, C. A., Yu, D., Gee, M., Ngo, C. V., Seignani, C., Goldschmidt, M., Golovkina, T. V., Evans, S., Lee, W. F. and Thomas-Tekchonenko, A. 2001. J Immunol 166:5878). Ellos demostraron que los tejidos infestados con *T. Gondii* producen algunos factores solubles anti-angiogénicos que evitan la formación de vasos sanguíneos en los tumores los cuales podrían ser de potencial interés terapéutico.

8313
13

Este proceso de formación de nuevos capilares conocido como angiogénesis, se ha convertido en un foco de atención importante para la implementación de nuevas terapias para el cáncer y sus metástasis. La búsqueda de factores anti-angiogénicos constituye la base de nuevas estrategias terapéuticas anticancerígenas (Folkman, J 2003 *Seminars in Cancer Biology* 13:159). Recientemente, el uso de bacterias anaerobias como agentes quimioterapéuticos y anti-vasculares selectivos ha ocasionado la regresión de tumores subcutáneos (sc) en ratones de manera significativa. Este tratamiento es llamado terapia bacteriolítica combinada (COBALTO) (Dang, L. H., Bettegowda, C., Huso, D. L., Klinzler, K. W. and Vogelstein, B. 2001 *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15155). Sin embargo, las bacterias vivas producen importante toxicidad y reacciones colaterales que limitan su uso contra el cáncer humano.

En los últimos años, han aparecido reportes que indican que las bacterias anaerobias liberan proteínas redox que inducen la apoptosis de células tumorales (Yamada, T. Goto, M., Punj, V., Zaborna, O. and Chen, M. L. 2002 *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14088; Goto, M., Yamada, T., Kimbara, K., Homer, J., Newcomb, M., Gupta, T. K. and Chakrabarty, A. M. 2003 *Mol Microbiol* 47:549). Se ha postulado que estas proteínas redox pudieran formar parte de un conjunto de proteínas solubles que eran secretadas por los antecesores de las células procariotas actuales, y cuya función pudiera haber sido la eliminación de las células eucariotas ancestrales (Punj, V. and Chakrabarty, A. M. 2003 *Cellular Microbiology* 5:225). En general se conoce poco sobre la producción de factores solubles secretados por estos organismos procarionotas que pudieran actuar de forma específica sobre células cancerígenas, ocasionando su muerte y de manera concomitante, la regresión del tumor.

Serratia marcescens es una bacteria anaerobia facultativa. A partir de algunas de sus cepas se han obtenido varias preparaciones con propiedades antitumorales, las más estudiadas son [a] el ImuVert[®] (Budagov, R. S. and Ulianova, L. P. 2001 *Radiat Biol Radioecol Russian* 41:38), una preparación de membranas ribosomales que activan el sistema inmune de los pacientes, [b] la proteasa Serratial Mr 56,000 (Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Okamoto, T., Okuyama, A. and Maeda, H. 2001 *Jpn J Cancer Res* 92:439), la cual induce muerte celular por necrosis dependiente de la expresión de α -2 macroglobulina, y [c] las prodigiosinas, una familia de pigmentos que actúan como inmunosupresores y anti-cancerígenos a través de la inducción de

apoptosis (Montaner, B and Pérez Tomas, R 2003 Curr Cancer Drug Targets 3 57, Pérez Tomas, R y Montaner, B 2003 Histo Histochem 18 379)

Nosotros obtuvimos fragmentos de Serralisinas no proteolíticos con mayor actividad citotóxica que las moléculas que las moléculas integra. Esto permitió realizar la combinación de estos fragmentos con bajas dosis de prodigiosinas, disminuyendo la toxicidad reportada del pigmento y potenciando el efecto antiproliferativo sobre células tumorales

Descripción detallada de la invención

Las composiciones de esta invención son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales y están compuestas por fragmentos polipeptídicos de Serralisinas, con mayor efecto anti-proliferativo que las moléculas de Serralisinas integra, los cuales pueden combinarse con prodigiosinas que potencian su efecto anti-tumoral

En esta invención se describe la obtención del preparado MG2327, donde se encuentran presente tanto polipeptidos y prodigiositas, que tiene amplio espectro de acción citotóxica sobre líneas de células malignas, con efecto selectivo sobre células tumorales/transformadas y específicamente sobre células activadas para su crecimiento. El estudio de sensibilidad realizado en diferentes líneas celulares, cancerígenas o no, demostro que las líneas de células normales son poco sensibles a la acción del preparado MG2327, mientras que las células derivadas de melanoma, carcinoma laríngeo, fibrosarcomas, hepatocarcinomas, y carcinomas cervico-uterinos (portadores o no del virus del papiloma humano), son muy sensibles. Los carcinomas de origen hematopoyético son menos sensibles. Las células HUVEC activadas para su crecimiento son mas sensibles a la preparacion MG2327 que las no activadas. La preparación MG2327 es capaz de actuar específicamente sobre factores expresados o sobre-expresados durante el proceso de división celular. Estos factores constituyen blancos terapéuticos contra el cancer u otras enfermedades de origen proliferativo. Además, estos factores tambien constituyen dianas para el diagnóstico temprano de enfermedades originadas por el exceso de proliferación, o la proliferación descontrolada de células diferenciadas o no diferenciadas. Formulaciones de liberación controlada que contienen estas moléculas pueden ser dirigidas a estos blancos proliferantes actuando de forma específica sobre ellos, ya que las células normales son mas resistentes a su acción.

Para demostrar la actividad antitumoral de la preparacion MG2327 se emplearon ratones BALB/c, a los que se les implantó intraperitonealmente (I.p.) las células

tumorales CB Hep 1 de origen mielóide, capaces de originar tumores ascíticos
 murinos (Fontúrrochi, Dueñas M, Fernández de Cossio M.E, Fuentes, P, Pérez
 M, Mainel, D, Ayala M, Gavilondo, J.V and Duarte, C 1993 Biotecnol Aplic 10 24-
 30). Después de 10 días, a los ratones se les inyectó intraperitonealmente la
 5 preparación MG2327 o solución salina PBS. El 60 % de los animales tratados con 1
 mg/kg de peso sobrevivieron mientras que solo el 25 % de los controles vivieron hasta
 los 45 días después de iniciado el tratamiento (Fig. 8). La regresión tumoral total fue
 observada en todos los animales sobrevivientes tratados, los que mostraban un estado
 saludable, mientras que en los controles, los tumores progresaron formando grandes
 10 masas sólidas y mostraban un estado general de pauperado.

Ratones BALB/c portadores de tumores de origen mielóide tratados con dosis única de
 1 mg/kg de peso de la preparación MG2327 sobrevivieron con regresión total. Esta
 misma dosis incrementó la supervivencia con disminución significativa del volumen del
 tumor a ratones BALB/c portadores de un tumor de fibroblastos transformados con
 15 E6/E7. MG2327 protegió a ratones BALB/c de implantes de tumores mielóides.

El preparado MG2327 se obtuvo como resultado de la optimización de las condiciones
 de cultivo para producir moléculas anti-proliferativas, el cual constituye un agente
 protector contra el implante y desarrollo de tumores malignos, así como inductor de la
 producción de moléculas anti-proliferativas, apoptóticas y anti-angiogénicas en células
 20 normales y tumorales que pueden ser utilizadas ventajosamente en la profilaxis y
 terapia del cáncer además de otras enfermedades relacionadas con estos eventos.

La cepa CMIB 4202 sobre-expresa proteínas solubles en el rango de 45-50 y 20-30
 kDa (50 y 25 kDa determinados por SDS-PAGE, con un coeficiente de determinación
 de 0.984). La fracción de 25 kDa, denominada aquí como p25, mostró una potente
 25 actividad anti-proliferativa dosis-dependiente en los experimentos realizados con la
 línea celular HEP-2 cuando fue incubada con EDTA, mientras que la fracción de 50
 kDa, denominada aquí como p50, no inhibió el crecimiento. Sin embargo, cuando la
 fracción p50 fue incubada con 5 μ M Zn_2SO_4 mostró actividad anti-proliferativa pero
 menos potente que la fracción p25. La IC_{50} de las fracciones p25 y p50 fueron 0.48 nM
 30 y 16 nM, respectivamente.

En la presente invención se realizó el aislamiento de las biomoléculas proteicas con
 efecto anti-proliferativo (polipéptidos y prodigiosina), mediante un solo paso
 cromatográfico intercambio iónico con gradiente discontinuo de NaCl. Se empleó una

matriz de DEAE o QAE Sepharosa Fast Flow, equilibrada con 50 mM de tampón fosfato, pH 8.00. La elución se realizó con un gradiente discontinuo de NaCl: 50 mM de tampón fosfato-0.1 M NaCl, pH 8.00; 50 mM de tampón fosfato-0.2 M NaCl, pH 8.00; 50 mM de tampón fosfato-2 M NaCl, pH 8.00 y finalmente se eluyó la fracción pigmentada absorbida a la matriz con etanol absoluto al 70 %. Los resultados evidenciaron que el componente proteico de 25 kDa de la preparación tiene mayor capacidad para inhibir el crecimiento de las células tumorales, que el componente proteico de 50 kDa de esta misma preparación, y que ambos componentes presentan actividad biológica in vitro de manera independiente.

La degradación de la proteína p50 generó fragmentos de diferente talla molecular, que incluía fragmentos de 25 kDa. Las degradaciones de p50 se incrementaron con el aumento de la temperatura y la generación de p25 fue directamente proporcional con el aumento de la temperatura, mientras que la p50 disminuyó. Los anticuerpos policlonales anti-p50 obtenidos en camero reconocieron la p25 en Western Blot por lo que p25 fue originada como producto de la degradación de la p50. La actividad antiproliferativa de los productos de degradación se incrementa a medida que aumentan los productos de degradación. Estos resultados demuestran que la autofagia de la p50 es capaz de originar fragmentos producto de la degradación con actividad antiproliferativa mas potente que la producida por la molecula de p50 integra. Además la proteína p25 tambien indujo la regresión total de tumores malignos de origen mielode. Los fragmentos de p50 pueden ser conjugados genéticamente, o por algunas otra metodología conocida con fragmentos de anticuerpos y constituir inmunotóxicas útiles para el tratamiento de enfermedades de etiología proliferativa. Además, estos fragmentos solos o combinados con otras moleculas proteicas pueden ser empleados como portador de las mismas hacia el interior de las células o hacia receptores específicos. Los fragmentos de p50 también pueden exponerse al medio externo de sistemas de liberación controlada para direccionar los mismos hacia blancos específicos.

La actividad proteolítica de P50 fue inhibida con 7 mM de EDTA, y se demostró que es una metaloproteasa, identificada por espectrometría de masas como perteneciente a la familia de las Serralisinas. La mayor similitud se encontró para las especies con identificadores PRZN_SERSP y PRZN_SERMA en la base de datos de proteínas Swissprot. La proteína p25 purificada por cromatografía no presenta actividad

enzimática y se corresponde con la región carboxilo-terminal no catalítica de las Serralisinas.

Los componentes proteicos y la prodigiosina se formularon en una misma composición que aumentó de manera significativa ($p < 0.005$) el efecto inhibitorio con respecto a su formulación de forma independiente. Las composiciones fueron realizadas manteniendo la misma relación de proteínas y prodigiosina que las empleadas cuando se evaluaron los componentes de forma independiente. En dichas composiciones la prodigiosina puede encontrarse a una concentración de 0.1 – 100 nM, y los fragmentos de Serralisinas de entre 0.1 – 150 µg/mL.

Como objeto de esta invención se encuentra la obtención de composiciones que contienen fragmentos polipeptídicos derivados de las Serralisinas con mayor efecto anti-proliferativo que las moléculas de Serralisinas integrales, y las combinaciones de estos fragmentos con prodigiosinas, las cuales potencian de manera selectiva la actividad biológica de estas composiciones.

Adicionalmente, estos fragmentos polipeptídicos tienen efecto apoptótico sobre células cancerígenas. Este efecto apoptótico involucra a las mitocondrias, microtúbulos y fragmentación del ADN, amplificando la señal de muerte celular programada utilizando bajas dosis de estas composiciones. Estos eventos también fueron observados con composiciones combinadas de polipéptidos y prodigiosinas.

El efecto anti-angiogénico de MG2327 y los fragmentos polipeptídicos anti-proliferativos fueron evaluados mediante el método de formación de estructuras tubulares en matrigel. Concentraciones no citotóxicas de MG2327 y sus fracciones p25 y p50 fueron incubadas con las células endoteliales humanas derivadas de microvasculatura (HMEC). Los resultados finales se evaluaron teniendo en cuenta la longitud de las estructuras tubulares formadas y el número de interconexiones entre ellas, utilizando el programa Image-Pro Express 4.5. Los resultados indican que el tratamiento con la composición MG2327 y sus polipéptidos antiproliferativos inhibe de manera significativa ($p < 0.05$, ANOVA) la diferenciación o maduración de la célula endotelial, demostrando que tanto MG2327 así como sus polipéptidos aislados tienen actividad anti-angiogénica.

La apoptosis, la actividad anti-angiogénica y la selectividad constituyen unas de las características más importantes de las composiciones objeto de esta invención, debido a su potencial terapéutico y protector contra el cáncer

En la presente invención se demuestra que la combinación de fragmentos de la familia de las Serralisinas, con las prodigiosinas son más potentes y selectivos que cuando son empleados de manera independiente como agentes anticancerígenos. Estos polipéptidos pueden ser empleados en la obtención de toxinas o inmunotoxinas recombinantes para la profilaxis y terapia del cáncer, u otras enfermedades relacionadas con la proliferación de células endoteliales y transformadas.

Estos polipéptidos y su posible combinación con las prodigiosinas son aplicables a la industria farmacéutica para la obtención de preparados vacunales, terapéuticos o diagnósticos de uso humano o animal contra el cáncer u otras patologías de tipo proliferativo, los cuales son altamente selectivos y tienen amplio espectro de acción.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 La interacción de *S. marcescens* con las células tumorales CB Hep 1 genera cepas bacterianas con alta capacidad anti-proliferativa y modificación en su expresión de proteínas. A- Sobrevida celular. Después de 72 h, la sobrevida celular fue estimada mediante el método del MTT. La cepa CMIB 4202 mostró un fuerte efecto anti-proliferativo sobre las células cancerígenas humanas HEP-2, mientras que la de SM1995 parental fue muy débil. Estos resultados fueron el promedio de tres experimentos independientes y cuatro réplicas por muestra. B-Electroforesis SDS-PAGE (tinción con plata). CMIB 4202 sobre-expresó proteínas solubles a la altura de 25 y 50 kDa.

Figura 2 Actividad anti-proliferativa de las fracciones de 25 y 50 kDa sobre la línea celular HEP-2. La viabilidad celular fue determinada por el método del MTT y expresada en por cientos con respecto a las células control. Las fracciones fueron recuperadas desde geles SDS (Imidazol-SDS-Zinc) y renaturalizadas. La fracción a la altura de 25 kDa mostró fuerte actividad anti-proliferativa (IC_{50} 0.35 nM/mL), mientras que p50 no inhibió el crecimiento. Al adicionar Zn_4SO_2 5 μ M a la p50, se observó un aumento de la actividad anti-proliferativa (IC_{50} 45 nM/mL) aunque esta se mantuvo por debajo de la de la p25. Las curvas fueron generadas a partir de los valores medios obtenidos en 5 experimentos independientes y se grafican con la Desviación Standard (DS) correspondiente.

Figura 3 Cinética de expresión de proteínas y prodigiosina por la cepa CBMI 4202 La expresión de prodigiosina al medio de cultivo ocurrió durante el periodo de transición de la fase de crecimiento a la fase estacionaria, donde CBMI 4202 alcanzó su mayor tiempo de duplicación A- Cinética del tiempo de duplicación celular B- Rendimiento de

5 expresión de la prodigiosa (producto/biomasa) C- Cinética del efecto anti-proliferativo sobre células HEP-2, determinado por el método del MTT D- Cinética del crecimiento celular determinado por densidad óptica y biosíntesis de proteínas

Figura 4 Sensibilidad de células cancerígenas y normales humanas al tratamiento con MG2327 Las células normales son poco sensibles y las de origen hematopoyético son

10 menos sensibles que el resto de las líneas analizadas Mientras que células activadas para su crecimiento (HUVEC bFGF) y células derivadas de lesiones tumorales malignas son más sensibles.

Figura 5 Análisis de la sobrevida de ratones BALB/c tratados o no con el preparado MG2327 retados con el tumor CBHep1 A- La dosis de 1 mg/mL provocó la regresión

15 total de los tumores en el 60 % de los animales tratados, mientras que el 100 % de los animales no tratados murieron en el término de 60 días. B- Después de 45 días de inoculadas las células tumorales, los animales no tratados presentaban un estado extremadamente depauperado, con presencia de tumores sólidos y ascitis mientras que los tratados con 1 mg/kg no presentaron evidencias de tumor y sobrevivieron por

20 más de 300 días

Figura 6 Efecto antitumoral de MG2327 sobre el modelo tumoral 3T316 A-El ploteo de las medias diarias por grupo, reveló diferencias estadísticamente significativas entre los volúmenes tumorales de animales tratados y no tratados ($p < 0.003$) El análisis del crecimiento del tumor en el tiempo no varió de forma significativa ($p = 0.109$) para el

25 grupo tratado con MG2327 mientras que el grupo control negativo presentó un incremento significativo de este parámetro ($p = 0.04$) B- Sobrevida de los animales tratados o no

Figura 7 Aislamiento de los principios activos proteicos desde MG2327 (A) Electroforesis SDS-PAGE (12.5 %). Resultados de la tinción con Coomassie En el

30 carril 1 se observa el eluato de 0.2 M NaCl, pH 8.00, donde se aprecia una banda de proteínas a la altura de 50 kDa El carril 2 mostró una banda de proteínas de 25 KDa La tinción fue realizada por el método del Coomassie (B) Efecto anti-proliferativo sobre HEP-2 de la proteína p-25 y p-50 sobre las células tumorales humanas Relación

dosis-respuesta p25, p-50 y MG2327 expresado en concentración de proteínas totales

Figura 8 Efecto anti-proliferativo de los principios activos aislados desde MG2327 sobre HEP 2. Proteínas de 50 y 25 KDa contenidas en MG2327 mostraron actividad inhibitoria del crecimiento. La combinación de estas proteínas con la prodigiosina disminuyó la dosis capaz de inhibir el 50 % de las células tumorales con respecto al control (IC_{50})

Figura 9 SDS-PAGE y Western Blot. (A) Patrón de proteínas obtenido desde MG2327. La muestra fue analizada mediante un gel SDS-PAGE al 12 % y teñidas con plata. (B) Las bandas de proteínas de 50 y 25 kDa, aproximadamente (flechas), desde un gel SDS-PAGE similar, pero teñido con Imdazol-Zinc fueron cortadas, renaturalizadas en gel y reaplicadas a SDS-PAGE. Éste fue transfendo a membrana de nitrocelulosa y el Western Blot fue realizado con anti-p50. Los anticuerpos policlonales obtenidos en camero reconocieron la p25 y las degradaciones de la p50 y no reconocieron las bandas de proteínas no relacionadas (C neg)

Figura 10 Autólisis de la p50. A- Electroforesis SDS PAGE: 1- 24 °C, 2- 37 °C, 3- 45 °C, 4- 60 °C, 5- 4 °C. B- El análisis por densitometría de la p50 y p25 mostró que con el aumento de la temperatura de incubación disminuye la intensidad de p50 y aumenta p25.

Figura 11 P50 purificada por cromatografía DEAE Sepharosa Fast Flow (eluida con 0.2 M NaCl), generó degradaciones con mayor actividad anti-proliferativa que la inducida por ella.

Figura 12 Actividad enzimática de p25 y p50 obtenidas desde cromatografías independientes. A- p25 no presentó actividad, mientras que p50 mostró actividad enzimática. B- La actividad enzimática de p50 fue totalmente inhibida con 7 mM de EDTA.

Figura 13 MG2327 induce fragmentación del ADN dependiente del tiempo de incubación con la célula tumoral P3X63Ag8. Desde las 6 h de incubación, se observan fragmentos de oligonucleosomas que se incrementaron con el tiempo, hasta alcanzar el patrón típico de apoptosis con oligonucleosomas de 180-200 pares de bases a las 24 h.

Figura 14 Ultra-estructura de células de mieloma murino P3X63AG8 tratadas y no tratadas (células control) con 22 µg/mL de MG2327. (A) La microfotografía electrónica control negativo del mieloma murino P3X63AG8 mostró una estructura típica del

21

citoplasma y núcleo de células normales donde la matriz mitocondrial estaba más densa que el citoplasma circundante (↑) (B) Cuerpos vacuolizados derivados en parte de mitocondrias alteradas (▲), aumento de volumen mitocondrial y ruptura de las crestas mitocondriales que se observan en el citoplasma (▲) con núcleos normales (■) 2 h después del tratamiento con MG2327 (C, D) Agrupaciones en forma de racimos de las mitocondrias (↑), también observadas a las 2 horas de tratamiento en B Fusión de crestas individuales (↑) (E) La microfotografía electrónica presenta morfología apoptótica: condensación (≡) marginación y fragmentación de la cromatina (≡), y cuerpos apoptóticos (△) a las 6 h del tratamiento con MG2327 (F) Cromatina compactada (▲) (Nota que el aumento del volumen mitocondrial y la ruptura de las crestas, y la integridad de la membrana citoplasmática estuvieron presente en todos los tiempos analizados. Magnificaciones x6000 (E), x 10 000 (A, B, D), 15 000 (C) y x40 000 (F)

Figura 15 Efecto de MG2327 p25 y p50 (purificadas por cromatografía) y sus fracciones sobre la diferenciación de células endoteliales en matrigel. Las células HMEC se cultivaron en condiciones de activación (10 ng/mL EGF, 1 µg/mL de hidrocortisona) en presencia de concentraciones similares de MG2327 (A), p50 (B) y p25 (C), en ausencia de tratamiento (E) y sin activar (D). En el gráfico (F) se agrupan los resultados de tres experimentos independientes, donde se evidencia la actividad inhibitoria de MG2327 y sus derivados sobre la formación de redes tubulares en matrigel. Tanto MG2327 como p50 logran revertir por completo la activación inducida hasta el nivel de las células no activadas (ANOVA MG2327, p50 y CN $p > 0.05$). Las células tratadas con p25 muestran un índice de formación de redes inferior al observado para MG2327 y p50 (prueba t no pareada, $p = 0.0107$ y $p = 0.0498$, respectivamente)

Figura 16. Sobrevida de ratones BALB/c inmunizados o no con MG2327 y retados con mieloma X83. Con el uso de tres y seis dosis de 1 mg/mL de MG2327 se observa el rechazo del tumor mielóide en el 100 % de los animales inmunizados

62
22

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1 Obtención de la cepa CMIB 4202

Para obtener cepas productoras de moléculas antitumorales, la *Serratia marcescens* salvaje SM1995 aislada de la superficie ventral de ratones BALB/c fue mezclada con las células tumorales CB Hep 1 (Aleman, M R , Valdés, R , Pérez M Ibarra, N , Reyes, B , González, M , Mendoza, O , Padilla, S . Agráz, A and Rodriguez, M P 2000 Biopharm 13 48-52) e inoculadas i p en ratones BALB/c, preinoculados 10 días antes con petrolato líquido pesado. Ocho días después de la inoculación de la mezcla celular, se realizaron extracciones de ascitis en días alternos. La cinética del crecimiento del tumor fue analizada y el control microbiológico fue realizado a la ascitis de cada animal con regresión tumoral.

Las bacterias aisladas fueron crecidas en diferentes medios y condiciones de cultivo. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron en condiciones de esterilidad usando filtros de membrana de 0.22 µm y la toxicidad de los mismos se ensayó sobre las células CB Hep 1. La cepa de mayor citotoxicidad fue depositada con el número de acceso CMIB 4202 en la Colección de Microorganismos de Importancia Biotecnológica en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad Habana, Cuba. CMIB 4202 y su cepa parental SM1995 se cultivaron en paralelo en fermentadores de 5 L, en medio Peptona-Glicerol a 28 °C. El filtrado estéril de CMIB 4202 presentó actividad dosis-dependiente mientras que el de SM1995 tuvo muy poca actividad sobre la línea de cáncer humano HEP-2 (Fig 1A) en el ensayo anti-proliferativo usando el método del MTT (Skehan, P , Storeng, R , Scudiero, D , Monks, A , McMahon, J , Vistica, D , Warren, J T , Bokesch, H , Kenney, S and Boyd, M R 1990 J Natl Cancer Inst 82 1107).

La cepa CMIB 4202 sobre-expresó proteínas solubles en el rango de 45-50 y 20-30 kDa (50 y 25 kDa determinados por SDS-PAGE, con un coeficiente de determinación de 0.984), Fig 1B.

La fracción p25 recuperada a partir de las bandas presentes en geles SDS teñidos con Imidazol-SDS-Zinc (Hardy, E , Santana, H , Sosa, A , Hernández, L , Fernández-Padrón, C and Castellanos-Serra, L 1996 Analytical Biochemistry 240 150) mostró fuerte actividad anti-proliferativa dosis-dependiente sobre HEP-2, mientras que la fracción de p50 no inhibió el crecimiento. Sin embargo, cuando p50 fue incubada con 5

68
23

$\mu\text{M Zn}_2\text{SO}_4$ mostró actividad anti-proliferativa, pero menor que la fracción p25 (Fig 2). La IC_{50} de las fracciones p25 y p50 fueron 0.48 nM y 16 nM, respectivamente. Con el objetivo de comparar la capacidad de las dos cepas para expresar las dos proteínas se realizó un ANOVA factorial. El valor de probabilidad de la interacción demostró que ésta no fue significativa ($P=0.93$). Por otro lado, la probabilidad de ambos efectos principales mostró que ambas proteínas son expresadas en cantidades significativamente diferentes ($P=0.01$) y que la cantidad es fuertemente dependiente de la cepa ($P=0.0004$). Además, existieron diferencias extremadamente significativas de la expresión de estas proteínas entre ambas cepas ($P<0.001$).

10

EJEMPLO 2 Obtención de la preparación anti-proliferativa MG2327

15

Para obtener una preparación anti-proliferativa a partir de la cepa CMIB 4202 de *S. marcescens*, se realizó el cultivo de 1 L del microorganismo en condiciones y medios de cultivo óptimos para producir las moléculas de interés (Fig 3). El cultivo de CMIB 4202 fue centrifugado a 12 000 g y 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante fue colectado y posteriormente filtrado mediante tamisaje molecular hasta 0.2 μm , bajo condiciones estériles. El volumen del sobrenadante fue reducido 10 veces usando una membrana de 10 kDa de límite de exclusión, y dializado contra PBS a 4 °C durante 24 h, en condiciones fisiológicas. El material dializado fue filtrado en condiciones estériles, y 5 mL fueron dispensados en viales de cristal apirogénicos. La preparación fue almacenada a 4 °C y denominada MG2327.

20

25

El escalado a fermentadores de 5 L se realizó con las condiciones establecidas en zaranda: medio peptona-glicerol a 28 °C por 14 h, areación 1 vvm, 250 rpm y 0.1 de densidad óptica inicial. El medio de cultivo fue ajustado a pH fisiológico y la fermentación se realizó a pH libre. Los restantes pasos se realizaron de igual forma que en zaranda.

Ejemplo 3 Caracterización de la actividad anti-proliferativa de la preparación MG2327 "in vitro"

30

Para la caracterización de la actividad anti-proliferativa de la preparación MG2327 "in vitro" se evaluó un panel de líneas humanas (tabla 1). Un total de 2000 células, excepto para PBMC (20000), fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos, y se le adicionó diferentes concentraciones de la preparación MG2327. Después de 72 horas se estimó el número de células sobrevivientes por adición de MTT (Skehan, P.,

21
24

Storeng, R , Scudiero, D Monks, A., McMahon, J , Vistica, D , Warren, J T , Bokesch, H , Kenney, S and BOYD, M R 1990 J Natl Cancer Inst 82 1107) Los productos de formazan solubles fueron detectados a 540 nm en un lector de placas Multiscan La preparación MG2327 mostró un amplio rango de actividad citotóxica contra las líneas celulares humanas analizadas La IC₅₀ estuvo en el rango de los µg/mL

Tabla 1 Células y medios de cultivos empleados en los estudios "in vitro"

<i>FIBHLM</i>	<i>FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PREPUCIO HUMANO PASES 3-6</i>	<i>DMEM 15% SFB* INSULINA 30 µG/MLL</i>
<i>H163</i>	<i>Carcinoma de pulmón humano</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB</i>
<i>MDA-MB143S</i>	<i>Adenocarcinoma de mama humano</i>	<i>DMEM 10% SFB</i>
<i>Colo-205</i>	<i>Carcinoma de colon humano</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB</i>
<i>HT1080</i>	<i>Fibrosarcoma humano</i>	<i>DMEM, 10% SFB</i>
<i>Hela</i>	<i>Carcinoma cervical humano</i>	<i>DMEM, 10% SFB</i>
<i>HEp-2</i>	<i>Carcinoma laríngeo humano</i>	<i>MEM 10% SFB</i>
<i>HepG2</i>	<i>Hepatocarcinoma humano</i>	<i>DMEM, 10% SFB</i>
<i>A375</i>	<i>Melanoma humano</i>	<i>DMEM 10% SFB</i>
<i>PBMC</i>	<i>Células mononucleares de sangre periférica humanas</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB, IL-2</i>
<i>HuT78</i>	<i>Linfoma de células T cutáneo humano</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB</i>
<i>HL60</i>	<i>Leucemia promielocítica humana</i>	<i>RPMI 1640 10% SFB</i>
<i>K562</i>	<i>Eritroleucemia humana</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB</i>
<i>CRL 1632</i>	<i>Adenocarcinoma de páncreas</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB</i>
<i>A 431</i>	<i>Adenocarcinoma de vulva</i>	<i>RPMI 1640 10% SFB</i>
<i>SiHa</i>	<i>Carcinoma de cerviz</i>	<i>RPMI 1640, 10% SFB</i>
<i>CuSk</i>	<i>Carcinoma de cerviz</i>	<i>RPMI 1640 10% SFB</i>
<i>HUVEC</i>	<i>Células endoteliales humanas derivadas de cordón umbilical</i>	<i>M199 30% SFB 10 ng/mL bFGF</i>

10 *SFB Suero Fetal Bovino

La selectividad de la preparación MG2327 fue comparada con el fármaco comercial Doxorubicina (DXR) empleando la línea celular HT1080 (originada de un fibrosarcoma) y fibroblastos primarios Se empleó el ensayo anti-proliferativo descrito

arriba Se aplicaron diluciones seriadas de DXR y la preparación MG2327 partiendo de 10 µg/mL y se generó una curva con 5 puntos La relación de mortalidad fue calculada para cada punto como la relación entre el por ciento de mortalidad para HT1080 y el por ciento de mortalidad para fibroblastos primarios Las diferencias fueron mayores a las menores concentraciones testadas (MG2327 9.1, DXR 17.1) La preparación MG2327 fue altamente selectiva para concentraciones menores que 2 µg/mL

Las células HEP-2 originadas de carcinoma laríngeo, son muy resistentes a los antitumorales empleados para uso clínico comparadas con el resto de las líneas estudiadas Por esta razón, nosotros la empleamos como modelo para los estudios "in vitro" del efecto de la preparación MG2327 Una comparación de las curvas de citotoxicidad generadas sobre las células HEP-2 tratadas con compuestos antitumorales conocidos, mostró resultados similares (40 %) de proliferación a 3 µg/mL para la preparación MG2327, Cisplatino (CDDP), Doxorubicina (DXR), Vincristina (VC), Vinorelbina (VB) y Taxol (TX) ($p > 0.05$, test de ANOVA) En las mismas condiciones, otros antitumorales como Ara C, Metotrexato (MTX), Bleomicina (Bleo) y Ciclofosfamida (CPA), no mostraron efecto CDDP es uno de los antitumorales autorizados por la FDA para el tratamiento de cáncer laríngeo, y el análisis de las curvas de supervivencia para la preparación MG2327 y CDDP mostraron valores similares para la IC_{10} , IC_{50} e IC_{90}

El estudio de sensibilidad de las diferentes líneas celulares cancerígenas o no (Fig 4), demostró que las líneas de células normales son poco sensibles al preparado MG2327, mientras que melanoma, carcinoma laríngeo, fibrosarcoma, hepatocarcinoma, y carcinomas Cervico-uterinos (portadores del virus del papiloma humano), son muy sensibles Los carcinomas de origen hematopoyético son menos sensibles Las células HUVEC activadas para su crecimiento son más sensibles a la preparación MG2327 que las no activadas

Los resultados anteriores demostraron que la preparación MG2327 tiene amplio espectro de acción citotóxica sobre líneas de células malignas, con efecto selectivo sobre células tumorales/transformadas y células activadas para su crecimiento

EJEMPLO 4 Actividad antitumoral de la preparación MG2327

Para demostrar la actividad antitumoral de la preparación MG2327 se emplearon ratones BALB/c, a los que se les implantó intraperitonealmente (i.p.) las células tumorales CB Hep 1 de origen mielóide, capaces de originar tumores ascíticos

murinos (Fontmochi, G Dueñas, M, Fernández de Cossio, M E, Fuentes P, Pérez, M, Malnet, D, Ayala, M, Gavilondo, J V and Duarte, C 1993 Biotechnol Appl 10 24-30) Después de 10 días, a los ratones se les inyectó i p MG2327 o PBS El 60 % de los animales tratados con 1 mg/kg de peso sobrevivieron, mientras que solo el 25 % de los controles vivieron hasta los 45 días después de iniciado el tratamiento (Fig 5) La regresión tumoral total fue observada en todos los animales tratados sobrevivientes los que mostraban un estado saludable, mientras que en los controles los tumores progresaron formando grandes masas sólidas y mostraban un estado general de pauperado

- 10 Ratones BALB/c portadores de un tumor de fibroblastos transformados con E6/E7, incrementaron su supervivencia después de ser tratados con la preparación MG2327, con disminución significativa del volumen del tumor

Además, para evaluar la actividad antitumoral de MG2327 también se utilizó un modelo de cáncer asociado al virus del papiloma humano (VPH16), desarrollado por Hernández et al (Hernández, P, Merina, N López-Ocejo, O and Araña, M J 2000 Biochem Biophys Res Commun 270 118-124) Dos grupos de ratones BALB/c fueron inoculados subcutáneamente (s.c) con 2×10^6 células 3T316 en la zona ventral izquierda A las 48 horas se administró una dosis de 0.75 mg/kg de peso de MG2327 o PBS por vía subcutánea, cercanas al sitio de inoculación primario de las células.

- 20 Cuando se evidenciaron los tumores en el grupo control se hicieron las mediciones diarias con un pie de rey El volumen tumoral se calculó usando la fórmula estándar $V = 0.52 \times a^2 \times b$ donde a es el ancho y b es el largo del perímetro horizontal del tumor (Hernández, P, Merina, N, López-Ocejo, O and Araña, M J 2000 Biochem Biophys Res Commun 270 118-124) y su comportamiento se muestra en la Fig 6

- 25 Las diferencias entre el tiempo de aparición del tumor fueron estadísticamente significativas ($p=0.0064$) entre los animales tratados y los no tratados El estudio de la relación tiempo-tratamiento por la prueba ANOVA, mostró que la misma magnitud de diferencia no se mantiene entre los grupos tratados y no tratados, lo que indica la existencia de una diferencia relacionada con el tratamiento aplicado a los animales

- 30 Al aplicar una prueba de Wilcoxon para datos pareados a las mediciones entre los días 21 y 45 para cada grupo se detectó un incremento significativo del volumen tumoral para el grupo control ($p=0.043$), no así para el grupo tratado (Fig 6A) Para analizar la existencia de diferencias significativas entre los grupos en cada momento de evaluación, se aplicó una prueba U de Mann-Whitney que detectó diferencias

significativas, excepto para el primer punto ($p < 0.01$). Además, se detectó una importante diferencia en la velocidad de crecimiento del tumor. Las curvas de crecimiento fueron ajustadas a una línea y sus pendientes se calcularon a partir de la ecuación generada según el mejor ajuste. La comparación de las pendientes indicó

5 que el tumor del grupo control creció a una velocidad significativamente mayor que la observada para el grupo tratado ($p = 0.0088$).

Como resultado de la implantación del tumor, los ratones del grupo control murieron entre los días 45 y 64, mientras que los animales del grupo tratado comenzaron a morir hacia el día 52, con un 20 % de supervivencia que se mantuvo en el tiempo (170 días), Fig

10 6B

Ajustando los datos de supervivencia a un modelo jerárquico bayesiano (regresión de Weibull con 500 iteraciones) se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.02447$), que fue corroborada al comprobarse que los intervalos de confianza para el tiempo medio de supervivencia fueron totalmente excluyentes.

15

EJEMPLO 5 Fraccionamiento del preparado MG2327 Aislamiento de las biomoléculas no proteicas.

Para determinar la composición de la preparación MG2327 se realizó su fraccionamiento molecular y se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento celular

20 *in vitro* de la línea celular tumoral humana HEP-2

La fracción polisacáridica ($t_r = 6.85$ min) se separó por cromatografía en gel Aminex HPX 87-N (dimensiones 300 x 7.8 mm, flujo 0.5 ml/min). Se utilizaron patrones de fructosa $t_r = 13.15$ min, glucosa $t_r = 12.12$ min, disacárido $t_r = 9.40$ min, trisacárido $t_r = 8.24$ min, polisacárido $t_r = 7.01$ min. La fracción pigmentada se separó mediante una

25 columna TSK butilo de la MERCK equilibrada con fosfato 20 mM, pH=7, donde quedó retenida en la matriz, posteriormente se eluyó empleando etanol absoluto. El espectro de absorción (etanol 100 % a pH 5.00) del producto obtenido mostró una banda con un máximo entre 470 y 490 nm y un pico con máximo en 537 nm, que corresponden con las características descritas del monómero y dímero de la prodigiosina,

30 respectivamente, con reportada actividad anti-proliferativa (Pérez-Tomas, R and Montaner, B 2003 *Histol Histopathol* 18: 379-385, Montaner, B, and Pérez Thomas, R 2003 *Curr Cancer Drug Targets* 3: 57-65). El polisacárido aislado no presentó efecto inhibitorio, mientras que la fracción correspondiente a la prodigiosina mostró actividad anti-proliferativa dosis-dependiente.

EJEMPLO 6

Fraccionamiento de la preparación MG2327 Aislamiento de las biomoléculas proteicas con efecto anti-proliferativo, mediante un solo paso cromatográfico Intercambio iónico con gradiente discontinuo de NaCl Composiciones

5 La preparación MG2327 fue aplicada a una matriz de DEAE Sepharosa Fast Flow, equilibrada con 50 mM de tampón fosfato, pH 8.00. La elusión se realizó con un gradiente discontinuo de NaCl: 50 mM de tampón fosfato-0.1 M NaCl, pH 8.00, 50 mM de tampón fosfato-0.2 M NaCl, pH 8.00, 50 mM de tampón fosfato-2 M NaCl, pH 8.00 y finalmente se eluyó la fracción pigmentada absorbida a la matriz con etanol absoluto al
10 70 %

La fracción correspondiente a 0.2 M NaCl, pH 8.00 y el primer eluato colectado de la fracción que no se pegó (pass), presentaron actividad inhibidora dosis-dependiente en el ensayo ya descrito. Por electroforesis SDS- PAGE se observó una banda de proteína a la altura de 50 kDa y una banda mayoritaria (pureza > 90 %) a la altura de
15 25 kDa, respectivamente (Fig. 7A). Los pesos moleculares fueron calculados mediante la función que relaciona el peso molecular del patrón comercial con la distancia de migración de las bandas, $r^2=0.984$.

La Figura 7B muestra el efecto anti-proliferativo de p50 y p25 comparadas con la preparación MG2327. La p50 y la p25 presentaron efecto anti-proliferativo sobre
20 HEp 2.

La Tabla 2 muestra los resultados comparativos entre p50, p25 y el preparado MG2327, empleando el análisis estadístico de varianzas (ANOVA). Se realizó una comparación de la respuesta para cada dosis empleada. Se puede observar que existen diferencias significativas entre las actividades de las tres muestras analizadas.
25 Estas diferencias dependen de la dosis empleada. Para altas concentraciones de los componentes de la preparación (9 y 18 µg/mL) existieron diferencias significativas entre la fracción de 25 y 50 kDa, donde la fracción de 25 kDa fue más activa, no siendo así para bajas concentraciones (2.25 y 4.5 µg/mL).

30 Tabla 2 Resultados comparativos entre los componentes proteicos y el preparado MG2327, empleando el análisis estadístico de varianzas (ANOVA)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	AN VA			
	Inter- muestras	25-50	25-MG2327	50-MG2327
2.25	0.0110	0.0649	0.0089	0.0958
4.5	0.0318	0.0885	0.0081	0.3728
9	0.0040	0.0318	0.0151	0.4271
18	0.0015	0.0243	0.3208	0.0243

Entre el componente proteico de 50 kDa y el preparado MG2327 existieron diferencias significativas para la dosis de 18 $\mu\text{g/mL}$ donde el preparado fue más activo, logrando la inhibición del crecimiento del 100 % de las células tumorales, mientras que el componente proteico de 50 kDa logró inhibir aproximadamente el 80 % del crecimiento. Para la dosis de 2.25, 4.5, y 9 $\mu\text{g/mL}$ no existieron diferencias significativas entre la respuesta ocasionada por la fracción de 50 kDa y el preparado MG2327.

Sin embargo, la actividad del componente proteico de 25 kDa fue significativamente diferente a la del preparado MG2327 para la dosis de 2.5, 4.5 y 9 $\mu\text{g/mL}$, donde el componente proteico de 25 kDa presentó mayor actividad biológica y para la dosis de 18 $\mu\text{g/mL}$ no existieron diferencias significativas, ya que ambas muestras lograron inhibir el 100 % de las células tumorales.

Estos resultados evidenciaron que el componente proteico de 25 kDa tiene mayor capacidad para inhibir el crecimiento de las células tumorales, que el componente proteico de 50 kDa y que ambos componentes presentan actividad biológica in vitro de manera independiente.

Este esquema de purificación se repitió varias veces, lográndose resultados similares.

EJEMPLO 7 Composición de polipéptidos de Serralisina con prodigiosina

Se formularon los componentes proteicos y la prodigiosina en una misma composición que aumentó significativamente ($p < 0.005$) el efecto inhibitorio con respecto a su efecto de forma independiente. En la Fig. 8 se grafica la IC_{50} de las biomoléculas anti-proliferativas que aislamos de la preparación MG2327 y sus composiciones. La preparación MG2327 está referida a proteínas totales. Las composiciones fueron realizadas manteniendo la misma relación de proteínas y prodigiosina que las empleadas cuando se evaluaron los componentes de forma independiente. En dichas composiciones la prodigiosina puede encontrarse a una concentración de 0.1 – 100 nM, y los fragmentos de Serralisinas de 0.1 – 150 $\mu\text{g/mL}$.

EJEMPLO 8 *p50 genera p25.*

Anti-p50 obtenidos en camero fueron utilizados para conocer la relación entre p25 y p50. MG2327 fue aplicada a un gel SDS-PAGE al 12 % y teñido con Imidazol-Zinc (Hardy, E., Santana, H., Sosa, A., Hernández, L., Fernández-Padrón, C. and Castellanos-Serra, L. 1996 Analytical biochemistry 240 150-152). Las bandas de proteínas de 50 y 25 kDa, aproximadamente (Fig. 9) fueron cortadas, renaturalizadas en gel y reaplicadas a SDS-PAGE. Éste fue transfendo a membrana de nitrocelulosa y el Western Blot fue realizado. Los anticuerpos policlonales anti-p50 reconocieron la p25 y las degradaciones de la p50. Las tallas moleculares fueron estimadas con marcadores de peso molecular preteñidos (Bio-Rad). El Western blot presentado aquí es representativo de tres experimentos similares.

EJEMPLO 9 *Los productos de la degradación de p50 originados por temperatura son más activos que la propia p50*

La p50 obtenida en el ejemplo 6 fue incubada a diferentes temperaturas y su actividad anti-proliferativa fue testada sobre HEp2, usando el método del MTT ya descrito anteriormente. El patrón de degradaciones generado para cada condición (4, 37, 45 y 60 °C) fue cuantificado por densitometría.

La generación de fragmentos producto de la degradación fue directamente proporcional con el aumento de la temperatura, por lo que a medida que la cantidad de p50 disminuye se incrementa la p25 como producto de la degradación de p50 (Fig. 10). Los productos de la degradación de p50 mostraron mayor actividad anti-proliferativa que la p50 íntegra (Fig. 11).

EJEMPLO 10 *p25 induce regresión de tumores malignos*

La proteína p25 obtenida por la cromatografía descrita en el Ejemplo 6, fue aplicada a cromatografía de fase reversa (RP-HPLC), para comprobar su homogeneidad y pureza. Se empleó un gradiente de acetonitrilo de 0-100 en 100 min. Se observó un pico de proteínas con pureza mayor del 90 %, demostrando la homogeneidad del eluato purificado.

La p25 fue entonces inyectada i.p. a ratones BALB/c después de 8 días de implantado el tumor mielóide P3X63Ag8 y perfectamente desarrollado. La dosis de 22 µg/kg de peso de p25 indujo regresión total en el 80 % de los animales tratados. Los controles

negativos murieron en el término de 30 días, donde habían ya desarrollado tumores sólidos

EJEMPLO 11 *p50 es una metaloproteasa, mientras que p25 no tiene actividad proteolítica*

El método de Anson y Mirsky modificado (Anson, M L , Mirsky, A E 1932 J Gen Physiol 16 59) usando caseína como sustrato, fue ajustado en nuestro laboratorio con Tripsina ($y=1.9314x-0.682$ $R^2=0.999$) Las fracciones proteicas obtenidas en la cromatografía descrita en el Ejemplo 6 fueron ensayadas con este método P50 presentó actividad proteolítica que fue inhibida con 7 mM de EDTA, por lo que resultó ser una metaloproteasa P25 no presentó actividad enzimática, Fig 12

El método del cíomógeno usando gelatina como sustrato (Vacca, A , Iurlaro, M , Ribatti D Minischetti, M , Nico, B , Ria, R , Pellegrino, A and Dammacco, F 1999 Blood 94 4143-4155) fue empleado para verificar la actividad proteolítica de p50 y p25

Además se analizó la capacidad enzimática de las degradaciones de la p50 En este ensayo la proteína p50 obtenida por la cromatografía descrita en el EJEMPLO 6 presentó actividad enzimática La fracción proteica de la banda de gel a la altura de 25 kDa (desde MG2327) mostró actividad proteolítica, mientras que la p25 obtenida por cromatografía no mostró esta actividad

EJEMPLO 12 *Identificación de los polipéptidos anti-proliferativos de 25 kDa desde MG2327*

Para la identificación de las proteínas con actividad anti-proliferativa presentes en la banda de 25 kDa, se cortó el gel SDS-PAGE (descrito en el Ejemplo 8) con MG2327 aplicado La banda fue incubada durante 5 min en 1 mL de tampon Tris/HCl (100 mM pH 8.5) hasta que estuvo completamente transparente La banda fue cortada en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm³, embebidos con acetonitrilo, rehidratados en un volumen mínimo de bicarbonato de amonio (25 mM) conteniendo tripsina o LEP a una concentración de 12.5 ng/μL La digestión en gel fue incubada a 37 °C por 18 h en un mezclador termostatado

Los péptidos resultantes de la digestión LEP fueron analizados por MALDI-MS Los iones monoisotópicos de las señales más intensas fueron introducidos en el programa ProFound para la identificación de la proteína de interés en la base de datos de secuencias Aunque nosotros no realizamos ninguna restricción taxonómica durante la

busqueda en la base de datos, la proteasa de 50 kDa de *Serratia marcescens* EC 3 4 24 40 fue alineada como la de mayor similitud. Cuatro péptidos (51-57, 58-66, 67-80 and 81-90) pertenecieron a la región N-terminal y uno (402-409) perteneció a la región C-terminal de la proteína. La talla molecular EC 3 4 24 40 difiere de las presentes en la banda analizada (aproximadamente 25 kDa, estimada por SDS-PAGE). Este hallazgo sugiere que la banda de 25 kDa contiene dos fragmentos co-migrantes de 25 kDa con similitud a la proteína de 50 kDa EC 3 4 24 40 perteneciente a la familia de las Serratisinas.

Para corroborar esta hipótesis, una digestión triptica de las proteínas de la banda de 25 kDa fue desarrollada. El espectro ESI-MS de los péptidos extraídos fue deconvolucionado y las señales más intensas fueron introducidas en el programa Profound. La salida mostró la misma proteína identificada previamente (EC 3 4 24 40). La cobertura de secuencia de la digestión triptica (21 %) fue mayor que la digestión previa (10 %). El mapa de cobertura de secuencia mostró siete péptidos que coincidieron muy bien con algunos de los fragmentos tripticos de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP. Cinco de ellos (28-41, 58-66, 67-80, 81-90 and 163-171) correspondieron a la región N-terminal, mientras que los dos péptidos restantes (351-373 and 374-393) pertenecieron a la región C-terminal. Estos resultados no solo confirmaron la identificación previa de la proteína, sino que también la cobertura del mapa sugiere la presencia de dos fragmentos co-migrantes de 25 kDa de las proteínas identificadas como PRZN_SERMA/PRZN_SERSP, en la banda analizada.

El espectro ESI-MS/MS correspondiente a péptidos de las regiones del N- y C-terminal de las proteínas previamente mencionadas fueron interpretados manualmente y las secuencias parciales fueron extraídas para su identificación, Tabla 3

Tabla 3 Interpretación manual del espectro ESI-MS/MS de 5 péptidos presentes en la banda de 25 kDa. Los péptidos del 1-4 pertenecieron a la región N-terminal de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP, mientras que el péptido 5 correspondió a la región C-terminal de estas mismas proteínas.

73
33

m_1	Sequence Tag	m_2	Peptide sequence	z	m/z expected	m/z theoretical	Error
705.47	AQLNS	1235.74	28-41	2	792.91	792.89	0.02
522.28	TFSL	1004.54	58-66	2	559.29	559.28	0.01
677.38	AVN	961.58	67-80	2	692.35	692.34	0.01
730.40	EAS	1017.58	81-90	2	582.79	582.79	0.00
1117.84	GGPX	1493.05	351-373	2	1031.45	1031.48	0.03

Con los métodos empleados y los resultados obtenidos podemos concluir que en la banda de 25 kDa analizada existe una mezcla de proteínas que contiene fragmentos con similitud al N- y C-terminal de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP

5

EJEMPLO 13 Identificación de la p50

Para identificar la proteína p50 con actividad anti-proliferativa, la fracción proteica correspondiente a la proteína de 50 kDa obtenida del protocolo de purificación descrito en el Ejemplo 6 fue digerida con endoproteinasa Lys-C. La identificación de los péptidos se realizó mediante secuenciación por Degradación Edman automatizada y un espectrómetro de masas de doble sector JMS HX-110, con cañón FAB. Con los resultados obtenidos y los alineamientos realizados mediante el software Swissprot y PIR se concluyó que dicha proteína pertenece a la familia de las Serralisinas con un peso molecular de 50 kDa. La mayor similitud se encontró para las especies con identificadores PRZN_SERSP y PRZN_SERMA en el banco Swissprot. La masa molecular de todos los péptidos analizados por espectrometría de masas coincidió con los valores teóricos esperados para péptidos de estas proteínas digeridas con endoproteinasa Lys-C.

EJEMPLO 14 Identificación de la p25 purificada por cromatografía

Para identificar la proteína de 25 kDa con actividad anti-proliferativa, apoptótica y anti-angiogénica, la p25 purificada por la cromatografía DEAE descrita en el Ejemplo 6 fue aplicada a SDS-PAGE. La banda de proteína fue lavada durante cinco minutos con 500 μ L de agua y después fue destefida con una solución de ácido cítrico 100 mM, posteriormente fue lavada nuevamente con agua MilliQ, cortada en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm³. Después, se le añadió acetonitrilo hasta su deshidratación y su exceso fue eliminado. Los cubos de gel fueron deshidratados completamente en

una centrifuga evaporadora y posteriormente rehidratados en una solución de bicarbonato de amonio (50 mM) que contenia tripsina a una concentración de 12.5 ng/ μ L. Luego fueron incubados durante 30 minutos a 37 °C en un mezclador termostatado durante toda la noche.

- 5 Los péptidos se eluyeron pasivamente al adicionar 20 μ L en una solución de bicarbonato de amonio y una incubación adicional a 37 °C durante 45 minutos. Los péptidos fueron extraídos mediante el empleo de unos ZipTip_{C18}TM y posteriormente se acidulo la mezcla de reacción al adicionar 5 μ L de ácido fórmico puro y se extrajeron nuevamente los péptidos mediante el empleo de los ZipTip_{C18}TM. Los péptidos
- 10 adheridos a los ZipTip_{C18}TM fueron lavados repetidamente con una solución de ácido fórmico al 5 % y posteriormente eluidos en un volumen de 2-3 μ L de una solución de acetonitrilo al 60 % que contenia ácido fórmico al 1 %.

- Los péptidos originados durante la digestión fueron cargados en unas agujas de capilares de borosilicato cubiertos en oro e introducidos en la fuente de ionización del
- 15 espectrómetro de masas híbrido de geometría ortogonal equipado con una fuente de nanospray (QTOF-2TM).

- Los espectros de masas ESI-MS fueron adquiridos en un rango 350-2000 Da durante 1 segundo. Las señales más intensas fueron seleccionadas para su posterior
- secuenciación por ESI-MS/MS. El gas de colisión empleado fue el argón y se utilizó una
- 20 energía de colisión apropiada para producir una fragmentación extensiva de los péptidos seleccionados, que permitiese su identificación en las bases de datos de manera inequívoca.

- Los espectros ESI-MS fueron deconvolucionados y exportados en un formato DTA e
- importado en el programa MASCOT para la identificación de la proteína en las bases
- 25 de datos SWISSPROT y NCBI nr mediante la estrategia del Peptide Mass Fingerprint (PMF). Para una identificación correcta de la proteína se utilizó una calibración interna al emplear un péptido autoproteolítico de la tripsina y se fijó un error de 0.05 Da para
- realizar la búsqueda de los péptidos observados en el espectro y se seleccionaron
- aquellas señales que tenían una intensidad superior al 10 % de la intensidad del pico
- base.
- 30

Cuatro péptidos presentes en la banda analizada fueron secuenciados por ESI-MS/MS (Tabla 4). Estos péptidos pertenecieron a la región C-terminal de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP (indicados en rojo en las secuencias de la Tabla 6), previamente identificadas en los Ejemplos anteriores.

35/35

Tabla 4. Péptidos pertenecientes a la p25 de *S. mercens* que fueron secuenciados por ESI-MSMS

#	Secuencia aminoacídica	m/z teor	m/z exp	Error
1	DFLSITSNSQK	1226.51	1226.58	0.07
2	SAASDAPGANDWIK	1489.75	1489.68	0.07
3	GGAGNDYLFGGGGADELWGLGAK	2060.96	2060.87	0.11
4	IGDLYVGFNQVIGK	1488.65	1488.60	0.05

5 También se encontraron otras señales que aunque no se secuenciaron, sus valores de masas concuerdan muy bien con los valores de masas esperados para los péptidos tripticos de la región C-terminal de las proteínas identificadas como PRZN_SERMA/PRZN_SERSP, Tabla 5 (señalados en azul en la Tabla 6). Entre estos péptidos aparece una señal doble cargada que pudiera corresponder con el péptido C-terminal de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP. No se encontraron péptidos que pudieran ser asignados a cortes específicos de la región N-terminal de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP.

Tabla 5. Péptidos tripticos pertenecientes a la proteína PRZN_SERMA detectados en el espectro ESI-MS.

#	Secuencia aminoacídica	m/z exp	m/z calc	z	error
1	¹³⁵ SYSDVGG ¹³⁹ LIK	455.20	455.24	2	0.04
2	⁴¹⁷ IDLSEFNK ⁴²³	492.24	492.26	2	0.02
3	⁴⁷⁶ IVGQYDVATDFIV ⁴⁸⁷	688.35	688.38	2	0.03

15 Con los métodos y resultados presentados en este ejemplo podemos afirmar que en la banda de 25 kDa obtenida de la p25 purificada por cromatografía DEAE y altamente anti-proliferativa, esta presenta un fragmento C-terminal de 25 kDa de las proteínas PRZN_SERMA/PRZN_SERSP.

20 Table 6. Identificación de la p50 y p25 obtenidas por cromatografía DEAE. En la secuencia están tachados los aminoácidos que no están presentes en la proteína madura. Sin estos aminoácidos los pesos moleculares de estas proteínas son 50595.4 Da y 50293.4 Da para PRZN_SERSP y PRZN_SERMA, respectivamente. La identificación de los péptidos tripticos que difieren entre ambas moléculas indica que

41

17

Para determinar la talla molecular de las proteínas que pudieran co-existir a la altura de 25 kDa en SDS-PAGE, originadas a partir de degradaciones de PRZN_SERMA/PRZN_SERSP sus secuencias fueron introducidas en el programa GenRun. Los fragmentos correspondientes al N- y C-terminal de 25 kDa (± 2 kDa) son mostrados en la Tabla 7

37

Tabla 7 Proteínas con talla de 25 ± 2 kDa, originadas a partir de degradaciones de PRZN_SERMA/PRZN_SERSP El peso molecular fue determinado mediante el programa GenRun, a partir de los extremos N- y C-terminal

Proteína	Secuencia
ARA1	MSYWSSETNTGGDNHGHYAAAPLLDDTAAIQHLYGANNPSTRGDTVYGFNSNTORDFLSTT SNSQKVI FAANDAGGNDTDFPSGYTANQRINLNEKSPSDVGGGLKGNVS LAAGVTIEMAIG QSGNDVTYGAANNVILKGGAGNDVLPQGGGADELWQGAQKDTFVP8AASDSAPGASDWIR DFQKGIDKIDLSFFFKZANSSDFIRFVDHFSGTAGEALLSYNASSNVTDL5VNTQGHQAF DPLVKIVGQVEVATDFIV
ARA2	MSYWSSETNTGGDNHGHYAAAPLLDDTAAIQHLYGANNPSTRGDTVYGFNSNTORDFLSTT SNSQKVZFAANDAGGNDTDFPSGYTANQRINLNEKSPSDVGGGLKGNVS LAAGVTIEMAIG FRRLTVGNAAANNVILKGGAGNDVLPQGGGADELWQGAQKDTFVP8AASDSAPGASDWIR DFQKGIDKIDLSFFFKZANSSDFIRFVDHFSGTAGEALLSYNASSNVTDL5VNTQGHQAF DPLVKIVGQVEVATDFIV
ARA3	TRTGDTVYGFNSNTORDFLSTTNSQKVI FAANDAGGNDTDFPSGYTANQRINLNEKSPS DVGGGLKGNVS LAAGVTIEMAIOFQRRLTVGNAAANNVILKGGAGNDVLPQGGGADELWQGAQ KDTFVP8AASDSAPGASDWIRDFQKGIDKIDLSFFFKZANSSDFIRFVDHFSGTAGEALL SYNASSNVTDL5VNTQGHQAFDPLVKIVGQVEVATDFIV
ARA4	TRTGDTVYGFNSNTORDFLSTTNSQKVI FAANDAGGNDTDFPSGYTANQRINLNEKSPS DVGGGLKGNVS LAAGVTIEMAIOFQRRLTVGNAAANNVILKGGAGNDVLPQGGGADELWQGAQ KDTFVP8AASDSAPGASDWIRDFQKGIDKIDLSFFFKZANSSDFIRFVDHFSGTAGEALL SYNASSNVTDL5VNTQGHQAFDPLVKIVGQVEVATDFIV

5 EJEMPLO 16 MG2327 induce apoptosis

MG2327 induce apoptosis sobre mieloma X63 con fragmentación del ADN, involucrando mitocondrias y microtúbulos

Para determinar el tipo de muerte que experimentan las células tumorales, el mieloma murino P3X63Ag8 (2*10⁷), fueron tratadas *in vitro* con 22 µg/mL de MG2327 A diferentes tiempos de tratamiento, las células tratadas o no fueron preparadas para su estudio ultraestructural por microscopia electrónica de transmisión y su ADN genómico fue extraído para desarrollar la técnica del ADN ladder

La fragmentación del ADN fue detectada con electroforesis en gel de agarosa

La apoptosis está frecuentemente acompañada de un rápido corte del ADN celular en multiples de 180-200 pb, correspondiendo al espacio inter -nucleosomal La detección de la fragmentación del ADN se realizó en geles de agarosa al 2% (Soldatenkov V A., Prasad, S , Voloshin, Y , and Dntschilo, A. 1998 Cell Death Differ 5 307-12), Fig 13, donde se observó un significativo incremento en la formación de oligonucleosomas que correlacionaron con los cambios morfológicos observados en cultivo y por microscopia

electrónica Los cortes internucleosomales precedieron la aparición de señales morfológicas de apoptosis, cuando las células fueron observadas por microscopía óptica Además, las microfotografías mostraron organelos citoplasmáticos alterados (mitocondria, 2 h) que precedieron la condensación de la cromatina (4 h) y los cortes internucleosomales (6 h)

MG2327 afecta microtubulos y la organización ultraestructural de las mitocondrias originando un incremento en la apoptosis de P3X63Ag8

Las células no tratadas mostraron una ultraestructura típica de mitocondrias crestas mitocondriales claramente visibles, y alta densidad de la matriz mitocondrial, distribuidas por todo el citoplasma (Fig 14A)

En las células tratadas con la preparación MG2327, el tamaño de las mitocondrias se incrementó, la densidad de la matriz mitocondrial fue mucho menor, y la morfología de las crestas se encontraba severamente afectadas (Fig 14B-E) Estas alteraciones ultraestructurales generalmente son un indicativo de la disfuncionalidad de estos organelos

Además, nosotros observamos extensas vacuolizaciones citoplasmáticas, que involucraron organelos tales como retículo endoplasmático y mitocondrias, a partir de las dos horas posteriores al tratamiento, (Fig 14B), y la integridad morfológica del núcleo

A las 6 h de tratamiento se observaron en el núcleo distintos cambios morfológicos (condensación, marginación y fragmentación de la cromatina) En la microfotografía de la fase tardía de la apoptosis (8 h) en P3X63Ag8 tratadas con MG2327 se observó la cromatina compactada (Fig 14F) En todos los tiempos analizados la integridad de la membrana fue preservada

Interesantemente, las células P3X63Ag8 tratadas durante 2 h con MG2327 presentaron mitocondrias en forma de racimos, que se agruparon hacia un lado de las células (Fig 14B-E), interpretado como el resultado de la ruptura de los microtúbulos, y el fracaso del transporte mitocondrial a lo largo de este organelo (Schatten, H., and Lewis, M L 2001 Acta Astronaut 49 399-418)

En la Fig 14C, D, también se observaron mitocondrias incrementadas de tamaño y estructuras condensadas dentro de las mismas, unidas a la membrana interna

mitocondrial. Estas estructuras pudieron ser originadas por crestas individuales que parecieron estar fusionadas. MG2327 pudiera inducir apoptosis mediante la liberación del citocromo c al citosol (producto del aumento de tamaño de las mitocondrias), mediada por la apertura de canales en la membrana externa, que trae consigo la
 5 activación de caspasas que originan apoptosis (Green, D R and Reed, J C 1998 Science 28 1309-1312. Review). En última instancia, en ausencia del aumento de tamaño de las mitocondrias, el citocromo c almacenado en las crestas intramitocondriales dañadas, pudieran ser total y rápidamente liberadas al interior del citosol, por las uniones creadas entre las crestas y el espacio intermembrana abierto por el proceso de fusión
 10 (Scurrano, L , Ashuya, M , Buttig, K , Weiler, S , Oakes, S A , Mannella, C.A and Korsmeyer, S.J 2002. Dev Cell 2:55-67)

El proceso descrito contribuyó significativamente a la amplificación de las señales de apoptosis generadas por MG2327

15 EJEMPLO 17 P25 y p50 inducen apoptosis

Para saber si p25 y p50 pudieran estar involucradas en los eventos apoptóticos descritos para MG2327, estas proteínas fueron incubadas de forma individual con las células P3X63Ag8 en diferentes concentraciones y analizadas por microscopia electrónica. La condensación de la cromatina, los daños en las crestas mitocondriales y
 20 las estructuras en forma de racimos de las mitocondrias también fueron observadas. Estos resultados indican que la inducción de apoptosis por MG2327 está comprometida con el efecto de estas proteínas.

EJEMPLO 18 Efecto anti-angiogénico de MG2327 y los polipéptidos anti-proliferativos

Formación de estructuras tubulares en matrigel

25 Se analizó la formación de cordones endoteliales por las células endoteliales humanas derivadas de microvasculatura (HMEC) sobre matrigel (Crum R, Szabo S, Folkman J 1985 Science 230 1375-8, Vacca, A., Ribatti D , Presta, M , Minischetti, M , Iuliano, M, Ria, R, Albin, A, Bussolino, F and Dammacco, F 1999 Blood 93 3064), en presencia de concentraciones no citotóxicas de
 30 MG2327 y sus fracciones p25 y p50. Los ensayos se condujeron como ha sido reportado por Sanz y colaboradores (Sanz, L , Pascual, M , Muñoz, A , González,

M A , Salvador CH, Álvarez-Vallina L 2002 Microvascular Research 63 335-339)
 Los resultados finales se evaluaron teniendo en cuenta la longitud de las
 estructuras tubulares formadas y el número de interconexiones entre ellos
 utilizando el programa Image-Pro Express 4.5 Los resultados indican que el
 5 tratamiento con la preparación MG2327 y sus fracciones inhibe de manera
 significativa ($p < 0.05$ ANOVA) la diferenciación o maduración de la célula
 endotelial (Fig 15)

EJEMPLO 19 MG2327 tiene efecto indirecto sobre células proliferantes

10 MG2327 protege a ratones BALB/c de implantes de tumores mieloides.

Para analizar la actividad protectora de MG2327 contra implantes de tumores, ratones
 BALB/c fueron inoculados (i.p.) con 1 mg/mL de este preparado antitumoral con
 diferentes esquemas de inmunización. Se empleó una dosis por semana durante tres
 semanas y dos dosis por semana durante tres semanas con intervalos de al menos
 15 tres días entre dosis. Un grupo control negativo fue inoculado con PBS. Dos millones
 de células del mieloma P3X63Ag8 fueron inoculadas i.p. a los grupos experimentales y
 al grupo control, después de 150 días de la primera dosis (5 meses después). Los
 ratones controles negativos murieron en el término de 25 días, mientras el 100 % de
 los animales tratados de ambos grupos experimentales sobrevivieron sin presencia de
 20 tumor (Fig 16)

EJEMPLO 20 El dominio C-terminal de otras serralisinas también tiene efecto citotóxico, sin actividad proteolítica

La cepa ATCC14756 fue cultivada en iguales condiciones que la cepa CMIB4202
 25 según el Ejemplo 2 y sus sobrenadantes de cultivo se procesaron como se describió en
 el Ejemplo 6. En ambas preparaciones se observaron proteínas a la altura de 50 kDa
 que eluyeron con 50 mM de fosfato-0.2 M NaCl, pH 8.00. Estas proteínas presentaron
 actividad enzimática que fue inhibida con 10 mM de EDTA y recuperada con 5 μ M de
 Zn_2SO_4 . Ambas proteínas fueron digeridas químicamente con CNBr y su patrón de
 30 corte fue similar, generando fragmentos similares de aproximadamente 25 kDa,
 correspondientes al C-terminal de la p50, a partir de la metionina interna de la
 secuencia hasta el final de la molécula. Los fragmentos obtenidos en la digestión se
 renaturalizaron mediante cambio de tampón por diálisis durante 48 h. La actividad

biológica de estos fragmentos fue testada en el ensayo de citotoxicidad aquí descrito, utilizando células HEP 2, las cuales se incubaron durante 72 horas en presencia de los mismos. Los fragmentos sin actividad proteolítica, en presencia de 5 mM de EDTA, producto de la digestión, presentaron actividad citotóxica dosis-dependiente superior, aproximadamente 2.5 veces más que la de la molécula de p50 completa. Estos fragmentos una vez conocida su secuencia, también son posibles obtenerlos mediante síntesis química o por vía recombinante.

EJEMPLO 21 Combinación de fragmentos de Serralisinas con anticuerpos o fragmentos de estos

- Los fragmentos polipeptídicos obtenidos en los Ejemplos 6 y 20 se conjugaron químicamente con el anticuerpo monoclonal AcM CB/for-CEA 1 (Tomo B et al APMIS 97 1073-1080, 1989), con sus regiones variables y con el fragmento de anticuerpo obtenido por vía recombinante a partir de la secuencia de este AcM (Diabody) (patente WO 03/093315). Las biomoléculas conjugadas fueron ensayadas sobre las líneas celulares de tumores humanos LoVo (ATCC CCL-229), AsPC-1 (ATCC CRL-1682) y LS 174T (ATCC CL-188), todas que expresan CEA en cultivo, realizando un ensayo antiproliferativo similar al descrito en el Ejemplo 3. Los fragmentos conjugados se utilizaron a concentraciones citotóxicas equivalentes a la de los fragmentos no conjugados, observándose una respuesta dosis-dependiente, mientras que a concentraciones no citotóxicas, no se observó respuesta anti-proliferativa, pero se evidenció que a pesar de la ausencia de respuesta, los fragmentos conjugados se unían a las células cuando se empleó el procedimiento de reconocimiento del CEA humano asociado a células mediante ELISA de células e inmunofluorescencia indirecta, (patente WO 03/093315). Estos resultados demuestran que los conjugados aquí descritos pueden ser utilizados en la terapia y el diagnóstico del cáncer.

REIVINDICACIONES

- 1 Una composición farmacéutica caracterizada porque contiene uno o varios fragmentos polipeptídicos pertenecientes al carboxilo terminal, a partir de la metionina interna de la secuencia hasta el final de la molécula, de una o varias Serralisinas o variantes de estos fragmentos, la cual es capaz de producir efectos anti-tumorales, terapéuticos o preventivos, en el organismo receptor
- 2 Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque los fragmentos de Serralisinas, son obtenidos a partir del sobrenadante de cultivos celulares, por manipulación génica o por síntesis química
- 3 Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque los fragmentos de Serralisinas pueden encontrarse en la composición solos, conjugados o mezclados
- 4 Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque las variantes o modificaciones de los fragmentos de Serralisinas son obtenidos por síntesis química, por manipulación génica o del sobrenadante de cultivos celulares
- 5 Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, caracterizada porque los fragmentos de Serralisinas o variantes de estos pueden formar parte de moléculas quiméricas o híbridas obtenidas por manipulación génica o por síntesis química
- 6 Fragmentos de Serralisinas de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3 4 y 5, denominados ARA1 ARA2, ARA3 y ARA4, caracterizados por contener las secuencias Seq No 1, Seq No 2, Seq No 3 y Seq No 4, respectivamente identificados en el listado de secuencias, y formar parte de la composición de las reivindicaciones anteriores, solos, conjugados o mezclados
- 7 Fragmentos de Serralisinas ARA1, ARA2, ARA3 y ARA4 de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizados porque fragmentos derivados, variantes génicas o sintéticas de estos, inducen efectos anti-tumorales terapéuticos o preventivos en el organismo receptor
- 8 Fragmentos de Serralisinas ARA1, ARA2, ARA3 y ARA4, o fragmentos derivados de éstos, de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, caracterizados porque pueden formar parte de una composición que contenga anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, cadenas de ácidos nucleicos, o moléculas de

naturaleza proteica o sacandica, solos, conjugados, mezclados, o insertados, e inducen efectos anti-tumorales terapéuticos o preventivos en el organismo receptor

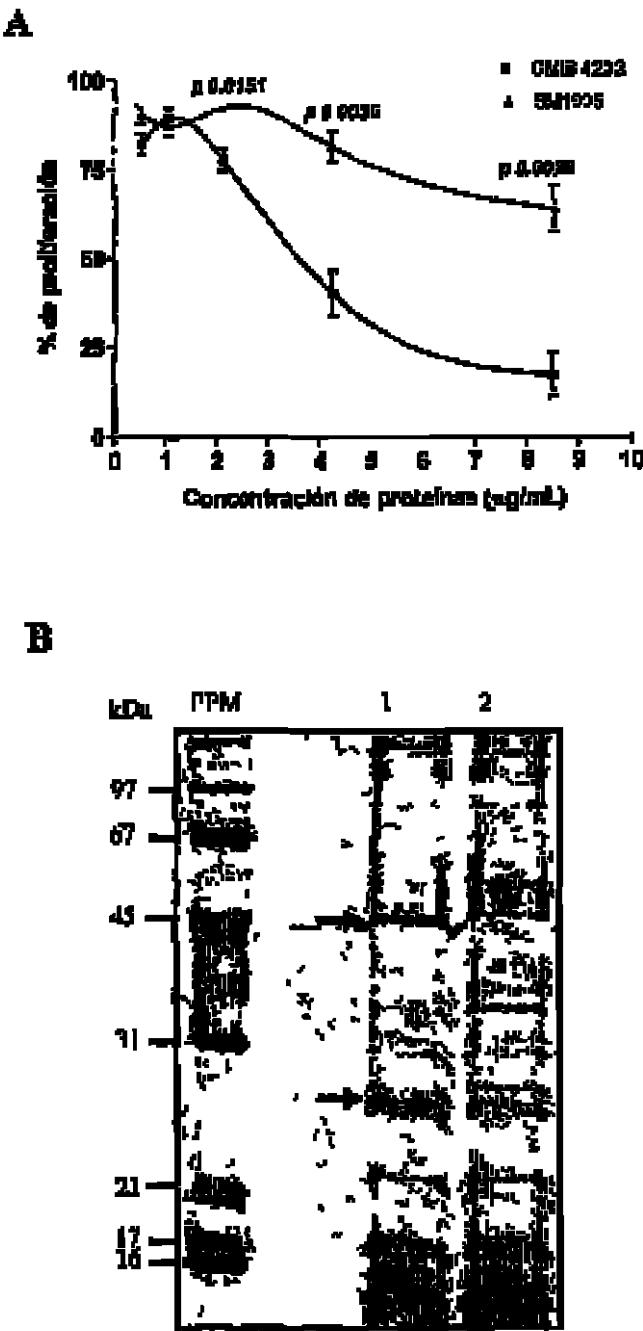
- 5 9 Fragmentos de Serralisinas ARA1, ARA2, ARA3 y ARA4, y/o fragmentos de éstos, de acuerdo con las reivindicaciones 6, 7 y 8 caracterizados porque pueden formar parte de la composición como agregados moleculares solos, entre ellos o con otras moléculas de naturaleza proteica o sacaridica
- 10 10 Fragmentos ARA1, ARA2, ARA3 y ARA4 de Serralisinas, y/o fragmentos de éstos, de acuerdo con las reivindicaciones 6, 7, 8 y 9, caracterizados porque pueden formar parte de un preparado para el diagnóstico o pesquiasje de patologias relacionadas con la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento y enfermedades inflamatorias
- 15 11 Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 caracterizada porque contiene una o vanas prodigosinas que potencian la actividad anti-tumoral de la composición
- 20 12 Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 como estimuladora del sistema inmune, como anti-angiogénica, apoptótica, anti-proliferativa, anti-microblana, y como inductora de factores anti-proliferativos apoptóticos, anti-angiogénicos, inmunomoduladores o reguladores de la diferenciación

RESUMEN

La presente invención está relacionada con una composición capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales de diferentes orígenes histológicos y de células
5 endoteliales activadas. Los componentes de dicha composición son fragmentos polipeptídicos de Serralisinas, correspondientes al fragmento C-terminal, a partir de la metionina interna de la secuencia hasta el final de la molécula, los cuales pueden combinarse entre ellos y opcionalmente con prodigiosinas que potencian el efecto anti-tumoral de la composición. Las prodigiosinas en la composición pueden estar a una
10 concentración de 0.1 – 100 nM. La acción anti-proliferativa de la composición está mediada por mecanismos apoptóticos. Su administración "in vivo" tiene efecto antitumoral, antiangiogénico y protector contra tumores malignos.

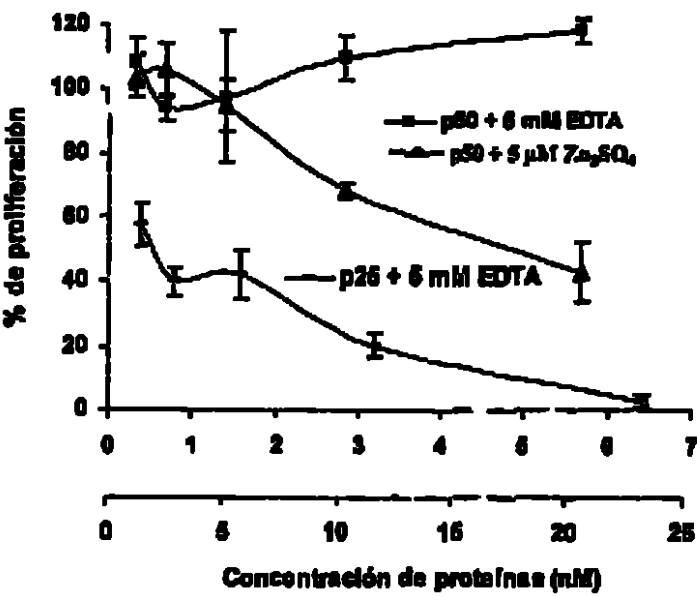
85
48

Figura 1



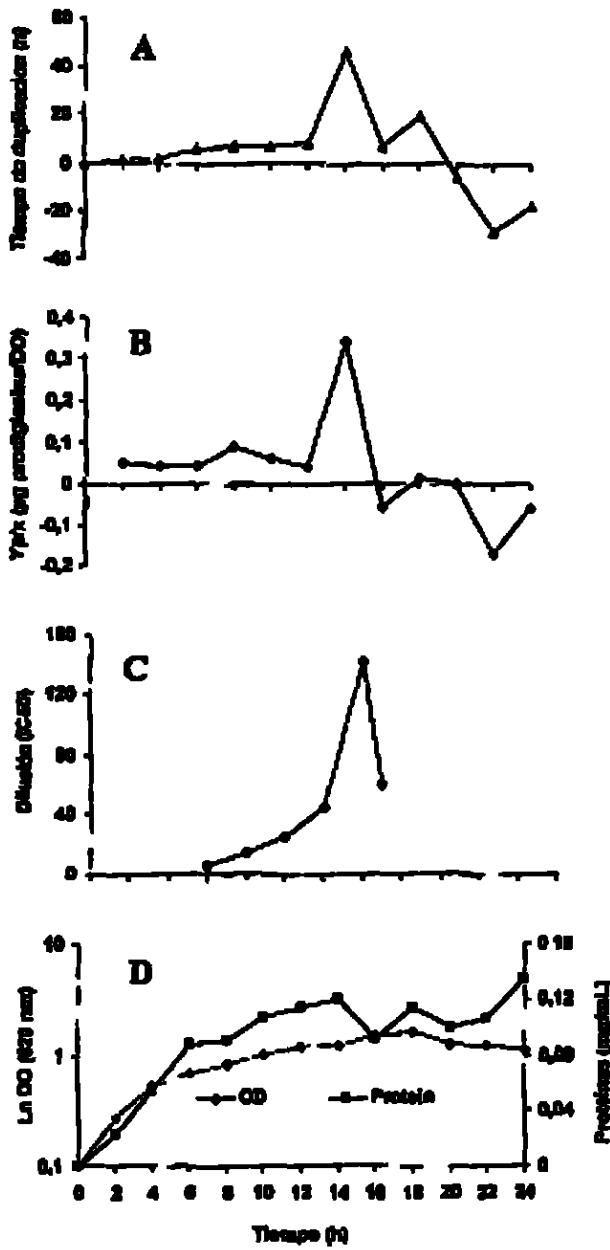
8/6
46

Figura 2



85
27

Figura 3



48

Figura 4

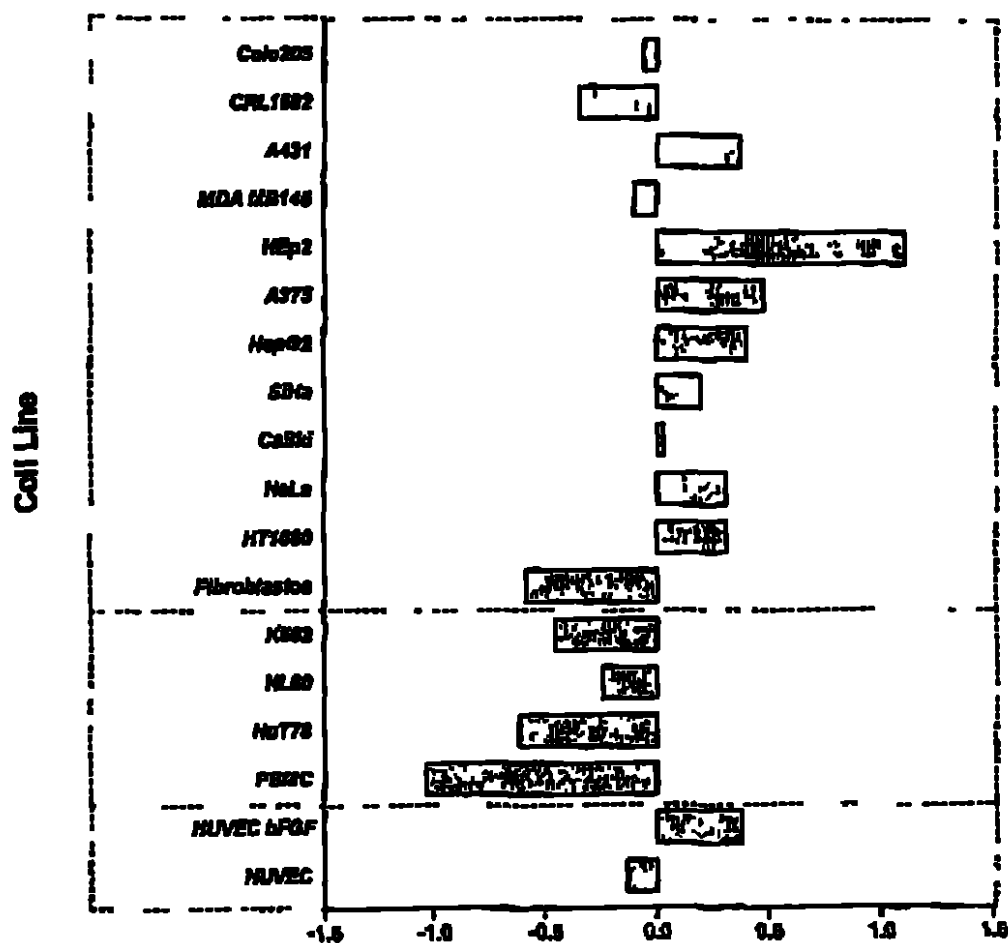
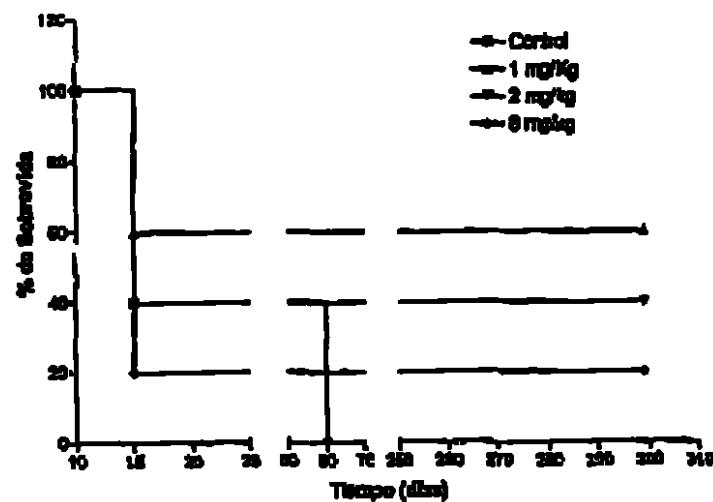
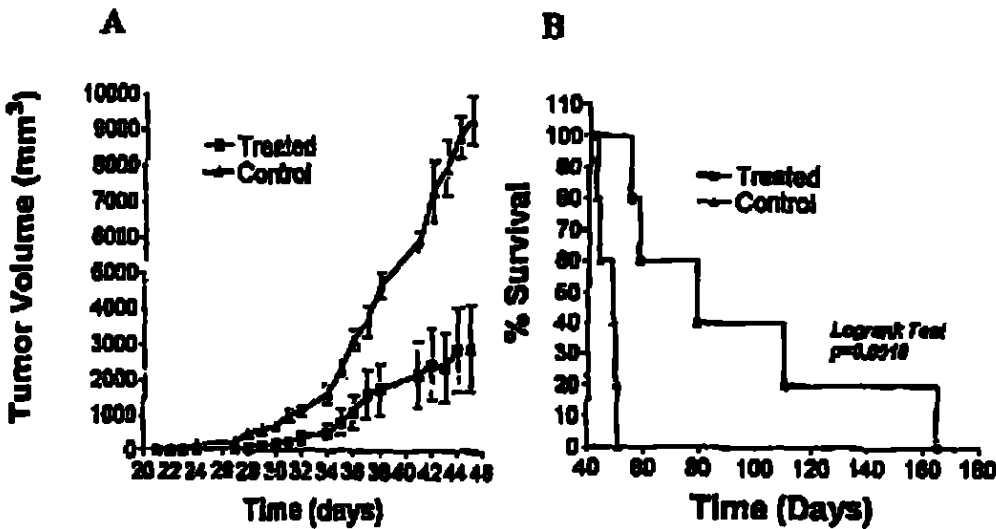


Figura 5



87
49

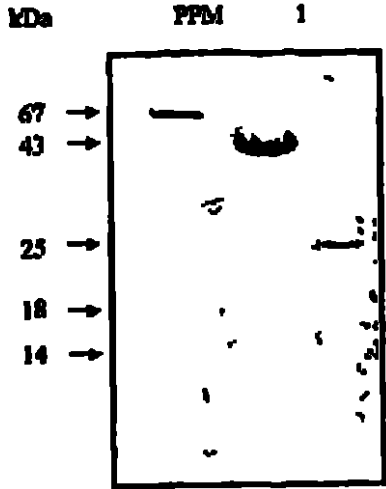
Figure 6



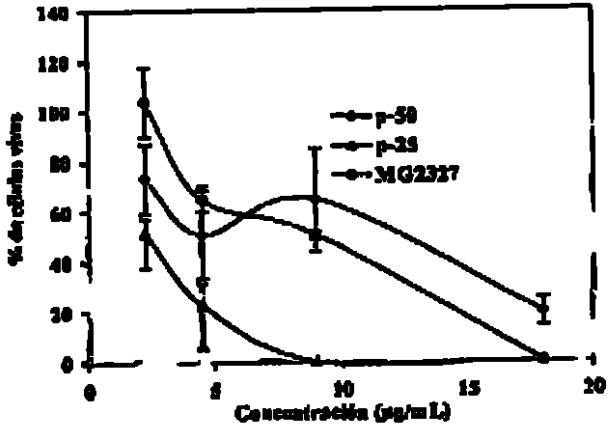
90
50

Figura 7

A

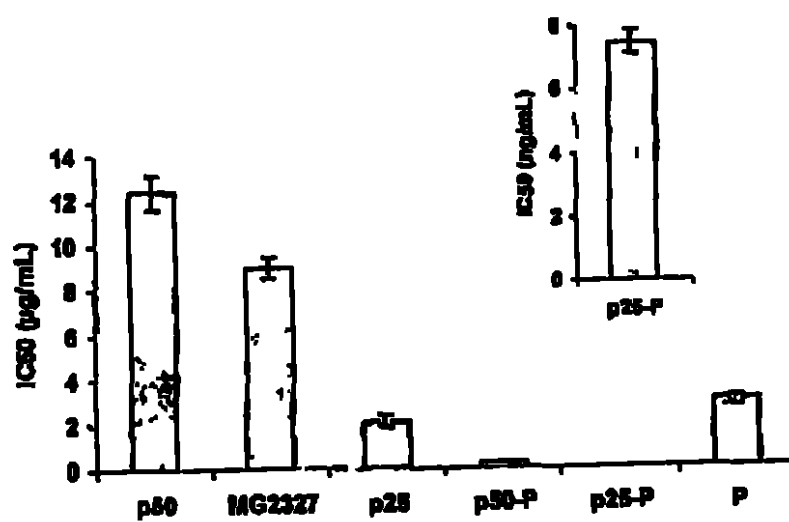


B



~~51~~
51

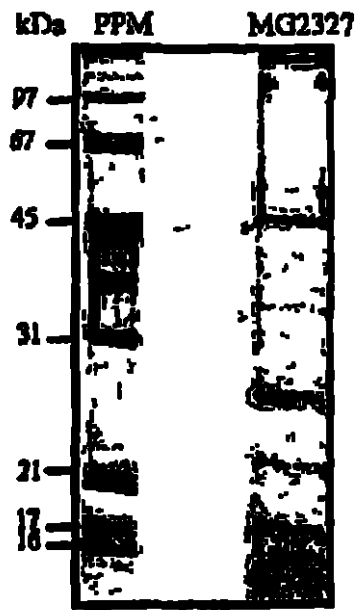
Figure 8



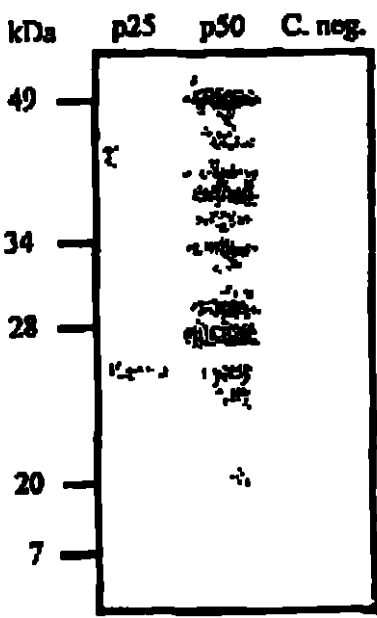
52

Figure 9

A



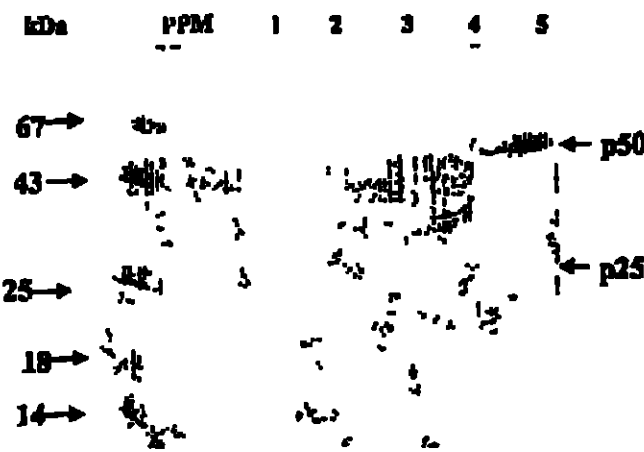
B



53

Figure 10

A



B



56
54

Figura 11

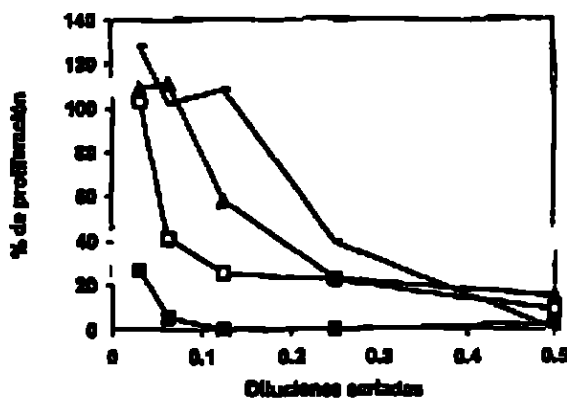
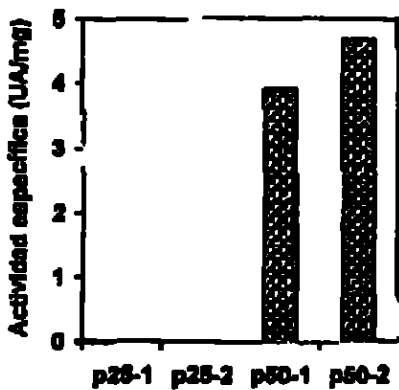
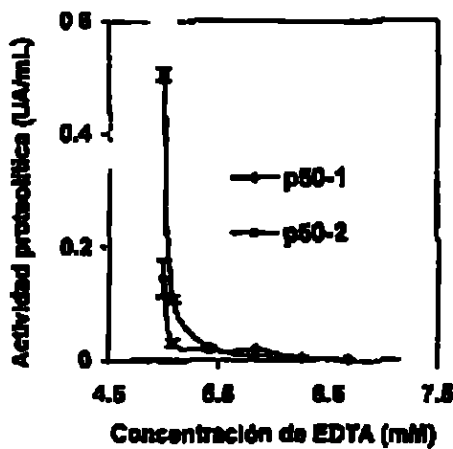


Figura 12

A



B



95
55

Figura 13

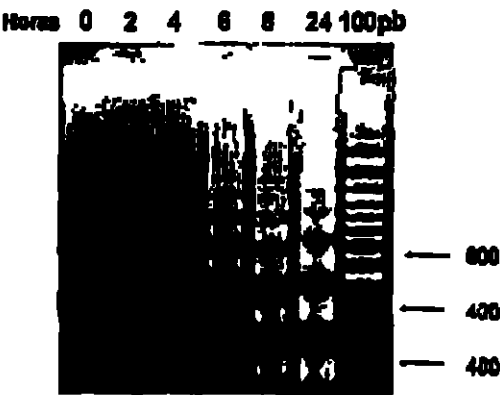
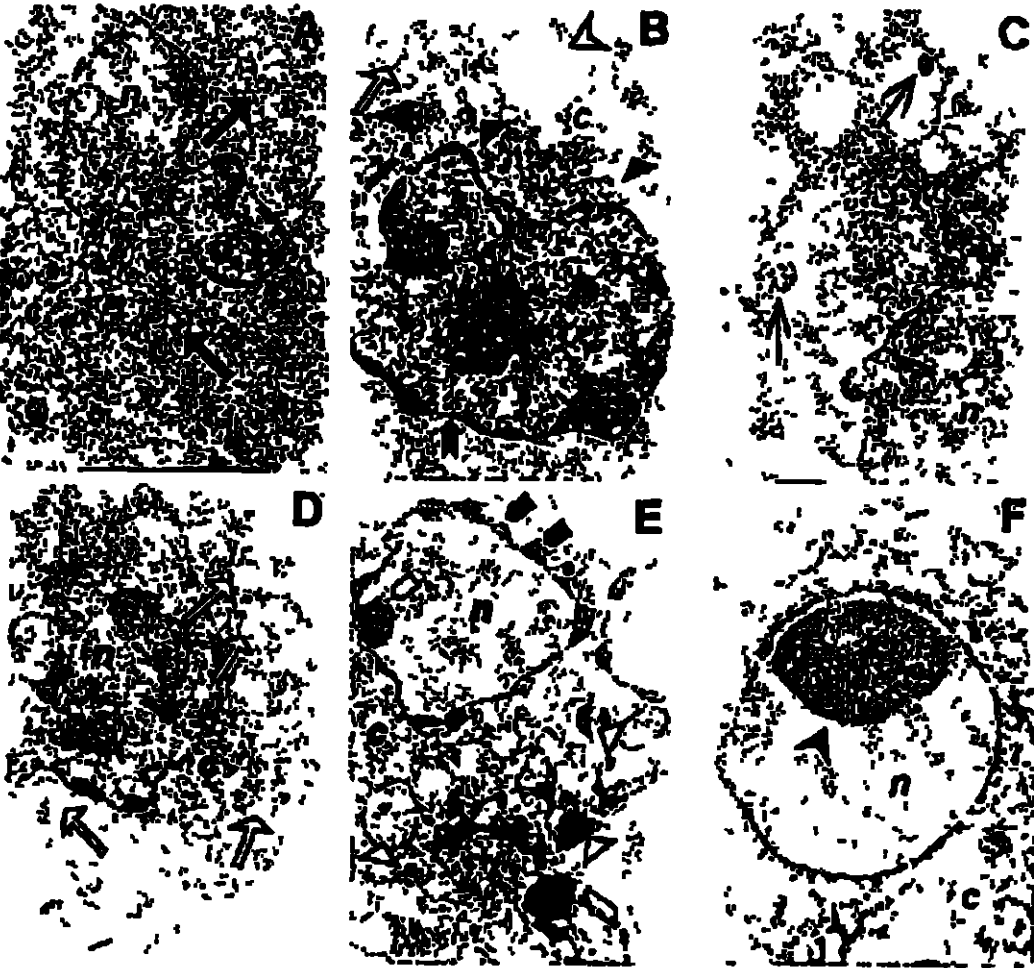


Figura 14



96
S6

Figura 15

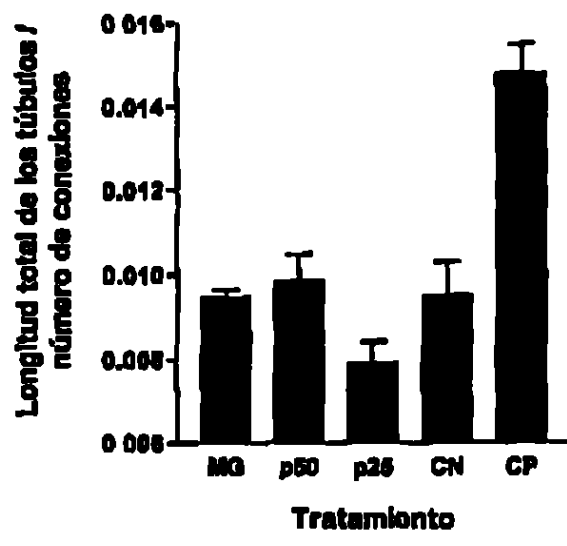
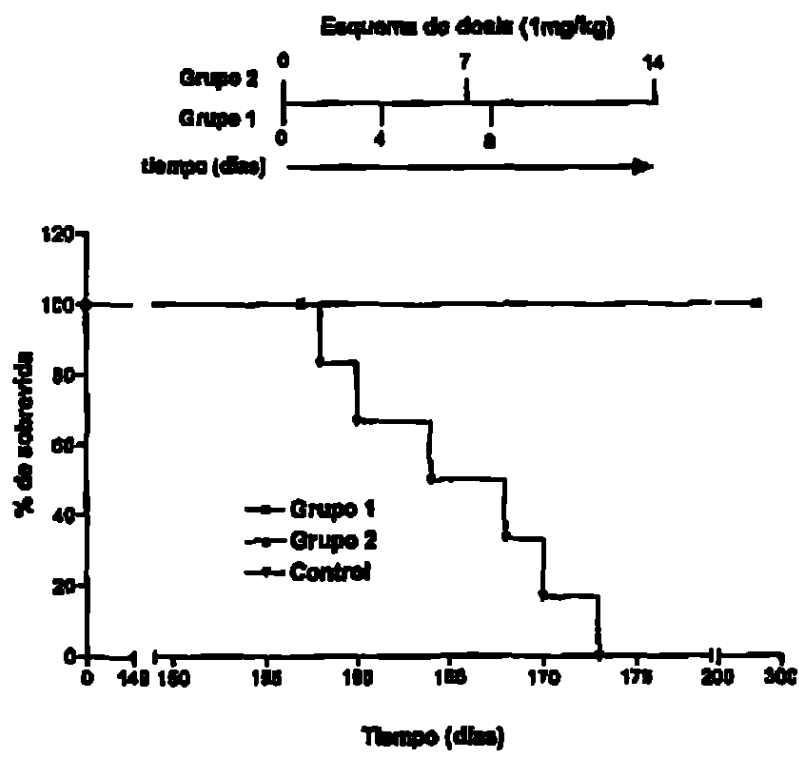


Figura 16



LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
- 5 <120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA CONTENIENDO FRAGMENTOS
POLIPEPTÍDICOS DE SERRALISINAS
- <130> María del Carmen
- 10 <140>
<141>
- <160> 20
- 15 <170> Patent In Ver 2 1
- <210> 1
<211> 258
20 <212> PRT
<213> *Serratia marcescens*
- <220>
<221> PEPTIDE
25 <222> (1) (258)
- <223> Polipéptido ARA1: antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y
protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la
angiogénesis Secuencia del C-terminal de la Serralisina SERMA
- 30 <400> 1
Met Ser Tyr Trp Ser Glu Thr Asn Thr Gly Gly Asp Asn Gly Gly His
1 5 10 15
- Tyr Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Asp Ile Ala Ala Ile Gln His Leu
35 20 25 30
- Tyr Gly Ala Asn Pro Ser Thr Arg Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe
35 35 40 45
- 40 Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln
50 55 60
- Lys Val Ile Phe Ala Ala Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp
65 70 75 80
- 45 Phe Ser Gly Tyr Thr Ala Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser
85 90 95
- 50 Phe Ser Asp Val Gly Gly Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly
100 105 110
- Val Thr Ile Glu Asn Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asn Asp Val Ile Val
115 120 125
- 55 Gly Asn Ala Ala Asn Asn Val Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val
130 135 140
- Leu Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys
145 150 155 160

~~58~~
58

Asp Ile Phe Val Phe Ser Ala Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser
165 170 175

5 Asp Trp Ile Arg Asp Phe Gln Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser
180 185 190

Phe Phe Asn Lys Glu Ala Asn Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp
195 200 205

10 His Phe Ser Gly Thr Ala Gly Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Ser
210 215 220

Ser Asn Val Thr Asp Leu Ser Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro
225 230 235 240

Asp Phe Leu Val Lys Ile Val Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe
245 250 255

20 Ile Val

<210> 2

25 <211> 257
<212> PRT
<213> *Serratia marcescens*

<220>

30 <221> PEPTIDE
<222> (1) (257)
<223> Polipéptido ARA2 antiproliferativo apoptótico, antiangiogénico y protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la angiogénesis. Secuencia del C-terminal de la Serravalina SEMSP

35 <400> 2
Met Ser Tyr Trp Ser Glu Thr Asn Thr Gly Gly Asp Asn Gly Gly His
1 5 10 15

40 Tyr Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Asp Ile Ala Ala Ile Gln His Leu
20 25 30

Tyr Gly Ala Asn Leu Ser Thr Arg Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe
35 40 45

45 Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln
50 55 60

Lys Val Ile Phe Ala Ala Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp
65 70 75 80

Phe Ser Gly Tyr Thr Ala Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser
85 90 95

55 Phe Ser Asp Val Gly Gly Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly
100 105 110

99
59

Val Thr Ile Glu Asn Ala Ile Gly Phe Arg Gln Arg Leu Ile Val Gly
115 120 125

5 Asn Ala Ala Asn Asn Val Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val Leu
130 135 140

Phe Gly Gly Gly Gly Gly Ala Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys Asp
145 150 155 160

10 Ile Phe Val Phe Ser Ala Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser Asp
165 170 175

15 Trp Ile Arg Asp Phe Gln Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser Phe
180 185 190

Phe Asn Lys Glu Ala Gln Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp His
195 200 205

20 Phe Ser Gly Ala Ala Gly Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Ser Asn
210 215 220

Asn Val Thr Asp Leu Ser Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro Asp
225 230 235 240

25 Phe Leu Val Lys Ile Val Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe Ile
245 250 255

Val

30

<210> 3

<211> 219

<212> FRT

35 <213> Serratia marcescens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1) (219)

40 <223> Polipéptido ARA3 antiproliferativo, apoptótico antiangiogénico y
protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la
angiogénesis Secuencia del C-terminal de la Serralisina SERSP

<400> 3

45 Thr Arg Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg
1 3 10 15

Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln Lys Val Ile Phe Ala Ala
20 25 30

50 Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Thr Ala
35 40 45

Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser Phe Ser Asp Val Gly Gly
55 60

10
60

Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly Val Trp Ile Glu Asn Ala
 65 75 85
 Ile Gly Phe Arg Gln Arg Leu Ile Val Gly Asn Ala Ala Asn Arg Val
 90 95
 Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val Leu Met Gly Gly Gly Gly Ala
 100 105 110
 Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys Asn Thr Phe Val Phe Ser Ala
 115 120 125
 Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser Asp Trp Ile Arg Asp Phe Gln
 130 135 140
 Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser Phe Phe Asn Lys Gly Ala Gln
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp His Phe Ser Gly Ala Thr Gly
 165 170 175
 Glu Ala Leu Leu Ser Trp Asn Ala Ser Asn Asn Val Thr Asp Leu Ser
 180 185 190
 Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro Asp Phe Leu Val Lys Ile Val
 195 200 205
 Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe Ile Val
 210 215
 <210> 4
 <211> 220
 <212> FRT
 <213> Gastrin matrescens
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> '1' 12201
 <223> Polipeptido PRA4 antiproliferativo apoptotico, antiangiogenico y
 protector contra enfermedad relacionada con la proliferacion celular y la
 angiogenesis Inhibicion del C-terminal de la Serpinina C22A
 <400> 4
 Thr Arg Trp Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10
 Asp Phe Leu Ser Thr Trp Ser Asn Ser Gln Lys Val Ile Phe Ala Ala
 20 25 30
 Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Ala
 35 40 45
 Asn Glu Arg Ile Asn Leu Asn Gly Lys Ser Phe Ser Arg Val Glu Gly
 50 55 60

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

<210> 5

<211> 6

35 <212> FRT

<213> Seriatia marcescens

<220>

<221> PEPTIDE

40 <222> 1 (5)

<223> Secuencia de Seriatinas

<200> 5

 45 Ala Gln Glu Asn Ser
 1 5

<210> 6

<211> 4

50 <212> FRT

<213> Seriatia marcescens

<220>

<221> PEPTIDE

55 <222> (1) (4)

<223> Secuencia de Seriatinas

#62
62

<400> 6
 Thr Phe Ser Phe
 1

5
 <210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Serratia marcescens

10
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (3)
 <223> Secuencia de Serralisinas

15
 <400> 7
 Ala Val Asn
 1

20
 <210> 8
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Serratia marcescens

25
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (3)
 <223> Secuencia de Serralisinas

30
 <400> 8
 Glu Ala Ser
 1

35
 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Serratia marcescens

40
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (4)
 <223> Secuencia de Serralisinas

45
 <400> 9
 Gly Gly Phe Xaa
 1

50
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Serratia marcescens

55
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (11)
 <223> Secuencia de Serralisinas

60
 <400> 10
 Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln Lys
 1 5 10

103
63

<210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Serratia marcescens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (15)
 10 <223> Secuencia de Serratia_ras

 <400> 11
 Ser Ala Ala Ser Asp Ser Ala Phe Gly Ala Ser Asp Trp Ile Arg
 1 5 15 25
 15

 <210> 12
 <211> 23
 <212> PRT
 20 <213> Serratia marcescens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (23)
 25 <223> Secuencia de Serratia_ras

 <400> 12
 Gly Gly Asn Gly Asn Asp Val Leu Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Glu
 1 5 10 15
 30
 Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys
 20

 35 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Serratia marcescens

 40 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (14)
 <223> Secuencia de Serratia_ras

 45 <400> 13
 Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg
 1 5 10

 50 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Serratia marcescens

 55 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1) (9)
 <223> Secuencia de Serratia_ras

 60 <400> 14
 Ser Phe Ser Asp Val Gly Gly Leu Lys
 1 5

10/6/64

<210> 15
 <211> 6
 5 <212> PET
 <213> Secuencia de Serpentina

 210
 <221> PEPTIDE
 10 <222> (1) (8)
 <223> Secuencia de Serpentina

 <400> 15
 15 Ile Asp Leu Ser Phe Phe Ala Val
 1 5

 <210> 16
 211 13
 20 <212> PET
 <213> Serpentina varcosce

 <220>
 <221> PEPTIDE
 25 <222> (1) (14)
 <223> Secuencia de Serpentina

 <400> 16
 30 Ile Val Gly Glu Val Asp Val Ala Thr Asp Phe Ile Val
 1 5 10

 35

 40

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant or agent's file reference
See rule D 47

FOR FURTHER ACTION

See Form PCT/PEA016

International application No.

International filing date (day/month/year)

Priority date (day/month/year)

PCT/CU2005/000003

05.07.2005

08.07.2004

International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC

INV A61K38/16 C07K14/28E A61P35/00 A61P31/04

Applicant

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA et al.

- 1 This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 38
- 2 This REPORT consists of a total of 7 sheets including this cover sheet
- 3 This report is also accompanied by ANNEXES comprising
 - a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of 2 sheets, as follows:
 - ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by the Authority (see Rule 70.18 and Section 807 of the Administrative Instructions)
 - ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed as indicated in Item 4 of Box No. and the Supplemental Box
 - b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) containing a sequence listing and/or tables related thereto in electronic form only as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions)
- 4 This report contains indications relating to the following items:
 - ☒ Box No. I Basis of the report
 - ☒ Box No. II Priority
 - ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
 - ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability objections and explanations supporting such statement
 - ☒ Box No. VI Certain documents cited
 - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
 - ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand

Date of completion of this report

14 04 2006

19 09 2006

Name and full address of the International Preliminary Examining Authority

Authorized officer



European Patent Office - Copenhagen 9th 103
 J 10950 Berlin
 Tel: +49 30 25907-0
 Fax: +49 30 25907-840

Mateo Piscoff, Ana Ma

Telephone No. +49 30 25901-310



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/CH2005/000003

106
66

Box No 1 Basis of the report

1 With regard to the language, this report is based on

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 56.3(a))

2 With regard to the elements* of the international application, this report is based on (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):

Description, Pages

1-31 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

12-39 as originally filed

Claims, Numbers

1-10 received on 20.04.2000 with letter of 14.04.2000

Drawings, Sheets

1/12-12/12 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (specify):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c))

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (specify):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

* If item 4 applies some or all of these sheets may be marked "superfluous"

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/CU2005/000003

~~102~~
67

Box No II Priority

- 1 ☒ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(a))
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 66.7(b)).
- 2 ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rule 64.1). Thus for the purposes of this report the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

Box No V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	1-10
	No	Claims	
Inventive step (IS)	Yes	Claims	1-10
	No	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1-10
	No	Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1 Certain published documents (Rule 70.10)

and/or

2 Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No
PCT/CH2005/000003

128
68

Box No. VII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2

1 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention this report was established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
- ☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in electronic form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ received by this Authority as an amendment on

2 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed as appropriate, were furnished

3. Additional comments:

If item 4 in Box No. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded".

109
69

Reference is made to the following documents.

- D1 EP-A-0 226 800 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD) 1 July 1987
D2 FR2519021 (TAKEDA CHEM IND LTD) 1 July 1983
D3. US 2004/185566 A1 (SALAMONE PETER [US]) 23 September 2004

Re Item II

Priority

It should be noted that the document indicated in the search report as 'PX' document has not been taken into consideration for the evaluation of novelty and inventive step, since the priority of the present application had to be assumed as valid (see also Official Journal EPO, 11/2001, page 539-542, especially item 13)

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

Novelty

The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1, and shows (abstract, page 1, line 29 - page 5, line 32, examples 1,5,11) a serrapeptase polypeptide obtained from *Serratia marcescens*, which is 580 aa long and shows 100% identity in 219 aa overlap at its C-terminus with SEQ ID N.2 (ARA 2) from present application. The serrapeptase polypeptide has anti-inflammatory activity.

D2 shows (see abstract, page 1, line 5-9 and 14-23 page 3, line 21-32) a serrapeptase polypeptide useful as an anti-inflammatory agent as lyophilised powders stabilized by incorporation of any of the following, lactose, sucrose, gelatin, aspartic acid and its salt, glutamic acid and its salt.

The subject-matter of claims 1-10 is therefore new (Article 33(2) PCT)

#370

Inventive step

The problem to be solved by the present invention may be regarded as the provision of fragments of serratus having an antiproliferative effect (stronger effect over tumoral cells than that of intact serratus)

The solution to this problem proposed in claim 1-10 of the present application is the provision of C-terminal fragments of serratus (residues 230-487) as represented by SEQ ID N 1 (ARA 1), SEQ ID N 2 (ARA 2), SEQ ID N 3 (ARA 3) and SEQ ID N 4 (ARA 4), and fragments or variants thereof having the same functional activity as SEQ ID N 1 (ARA 1), SEQ ID N 2 (ARA 2), SEQ ID N 3 (ARA 3) and SEQ ID N 4 (ARA 4), i.e. lack the catalytic activity and have higher antiproliferative effect than the whole serratus molecule

These fragments of serratus were obtained comprised in a mixture obtained from the supernatant resulting from the culture of the strain CMIB 4202 (see example 1) which analysis and sequencing resulted in the identification of SEQ ID N 1 (ARA 1), SEQ ID N 2 (ARA 2), SEQ ID N 3 (ARA 3) and SEQ ID N 4 (ARA 4) corresponding to the C-terminal fragment of the enzyme (i.e. p25, see example 15) and small amounts prodigiosin (see example 7). The subject-matter of claims 1-10 is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons: SEQ ID N 1 (ARA 1), SEQ ID N 2 (ARA 2), SEQ ID N 3 (ARA 3) and SEQ ID N 4 (ARA 4) have antiproliferative effects in vitro on Hep 2 cells (see example 6: 18 microgr/mL inhibited 100% of the growing of the tumor cells) and in vivo in BALB/c mice implanted with tumor P3X63Ag8 (see example 10: 22 microgr/Kg induced total regression in 80% of the animals treated), anti-apoptotic effects (see example 17: chromatin condensing and mitochondria damage) and anti-angiogenic effects (see example 18: inhibition of maturation of endothelial cells, Fig 15) on tumor P3X63Ag8 which is a myeloid tumor.

Thus, the subject-matter of claims 1-10 meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/CU2005/000003

71

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (if any) (day/month/year)
US2004/015566	23 09 2004	19.03 2003	19 03 2003

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The word 'serralsin' should be corrected to serralyxin

#2
72**NEW SET OF CLAIMS.****A PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING POLYPEPTIDE
FRAGMENTS OF THE SERRALISINS**

- 1 Pharmaceutical anti-tumoral composition characterized by containing one or several polypeptide fragments named ARA1, ARA2 ARA3 and ARA4 containing sequences Seq. No 1, Seq No 2, Seq No 3 and Seq No 4, respectively identified within the sequences list, lacking catalytic activity which have a higher anti-proliferative activity than the whole serralsin molecules and wherein said composition is capable of producing anti-tumoral effects in the recipient organism, and said antitumoral effects are therapeutic or preventive
- 2 Pharmaceutical anti-tumoral composition according to claim 1 wherein said Serralsins fragments are obtained from cell culture supernatants by genetic manipulation or by chemical synthesis
- 3 Pharmaceutical anti-tumoral composition according to claims 1 and 2 wherein said fragments or their variants appear in the composition alone conjugated or mixed.
- 4 Pharmaceutical anti-tumoral composition according to claim 3, wherein said fragments variants or variants modifications obtained by chemical synthesis, genetic manipulation or from cell culture supernatants
- 5 Pharmaceutical anti-tumoral composition according to claims 1, 2 3, 4 wherein said Serralsins fragments or their variants could be part of chimeric or hybrid molecules obtained by genetic manipulation or chemical synthesis
- 6 A composition according to claims 1 to 5 characterized by containing one or several prodigiosins, wherein said prodigiosins enhance the antitumoral activity of the mentioned composition

#3
73

- 7 Serralsins fragments ARA1 ARA2 ARA3 and ARA4 according to claim 1 wherein fragments genotic or synthetic variants derived from them, induce antitumoral effects said effects being therapeutic or preventive in the recipient organism
8. Serralsins fragments ARA1, ARA2, ARA3 and ARA4 according to claim 7 wherein said fragments can be part of a composition containing antibodies antibody fragments, nucleic acid strands, or molecules of carbohydrate or proteic nature, and said fragments are alone, conjugated, mixed or inserted also inducing therapeutic or preventive anti-tumoral effects in the recipient organism
- 9 Serralsins fragments ARA1 ARA2, ARA3 and ARA4, or their fragments alone or in combination and according to claims 7 and 8 characterized by being part of said composition as molecular aggregates, alone, in combination between them or in combination with other molecules of protein or carbohydrate nature
- 10 The use of the composition according to claims 1 to 5 as an immune stimulator as anti-angiogenic, apoptotic, anti-proliferating anti-microbial and as inducer of anti-proliferating, apoptotic, anti-angiogenic immunomodulating or differentiation regulating factors

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD

NUEVO GRUPO DE REIVINDICACIONES

UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE CONTIENE FRAGMENTOS DE POLIPÉPTIDO DE LA SERRALISINAS

- 1 Composición antitumoral farmacéutica caracterizada por que contiene uno o varios fragmentos de polipéptidos denominados ARA1, ARA2, ARA3 y ARA4, que contiene las secuencias Seq No 1, Seq No 2 Seq. No 3 y Seq No 4, respectivamente identificadas con la lista de secuencia, que les falta actividad catalítica, que tienen una actividad anti-proliferativa superior que las moléculas de serralisinas completas y en donde dicha composición es capaz de producir efectos anti-tumorales en el organismo receptor y dichos efectos anti-tumorales son terapéuticos o preventivos**
- 2 Composición antitumoral farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos fragmentos de serralisinas son obtenidos de sobrenadantes de cultivo de célula, mediante manipulación genética o mediante síntesis química**
- 3 Composición anti-tumoral farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 1 y 2, en donde dichos fragmentos y sus variantes aparecen en la composición sola, conjugada o mezclada**
- 4 Composición anti-tumoral farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 3 en donde dichas variantes de fragmentos o modificaciones de variantes**

se obtienen mediante síntesis química, manipulación genética o de sobrenadantes de cultivo de células.

- 6 Composición anti-tumoral farmacéutica de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2, 3 4 en donde los fragmentos de serralisinas o sus variantes podrían ser partes de moléculas quiméricas o híbridas obtenidas mediante manipulación genética o síntesis química
- 6 Una composición de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por contener una o varias prodigiosinas, en donde dichas prodigiosinas mejoran la actividad anti-tumoral de la composición mencionada
- 7 Fragmentos de serralisinas AR1, AR2, AR3 y AR4 de acuerdo con la reivindicación 1 en donde los fragmentos, las variantes genéticas o sintéticas derivadas de ellos, inducen efectos anti-tumorales dichos efectos son terapéuticos o preventivos en el organismo receptor
- 8 Fragmentos de serralisinas AR1 AR2 AR3, y AR4 de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dichos fragmentos pueden ser parte de una composición que contiene anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hebras de ácido nucleico, o moléculas de carbohidratos o de naturaleza proteica, dichos fragmentos están solos, conjugados mezclados o insertados, también induciendo efectos antitumorales terapéuticos o preventivos en el organismo receptor
- 8 Fragmentos de serralisinas AR1 AR2 AR3, y AR4, o sus fragmentos solos, o en combinación y de acuerdo con la reivindicaciones 7 y 8

#77

caracterizados por ser parte de dicha composición como agregados moleculares, solos o en combinación entre ellos, o en combinación con otras moléculas de proteína o de naturaleza de carbohidrato

- 10 El uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 como un estimulador inmune, como anti-angiogénico, apoptótico, anti-proliferante antimicrobiano, y como inductores de factores anti-proliferación apoptosis, anti-angiogénicos inmunomodulación o factores de regulación de diferenciación

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT/d3	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad: (31) No. Prioridad: 2004-0147 (32) Fecha: 08/07/2004 (33) País: CU		(51) Int. Cl.: A61K 38/18 (71) Solicitante(s): CENTRO DE INGENIERIA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (72) Inventor(es): MARIA DEL CARMEN ABRAHANTES PEREZ Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08/02/2007 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT: Fecha de presentación de la solicitud: 05/07/2005 No. de solicitud PCT/CU2005/000003		(87) Publicación internacional: Fecha: 19/01/2006 N° publicación: WO 2006/005263 A2	
(54) Título: COMPOSICIÓN FARMACEUTICA CONTENIENDO FRAGMENTOS POLIPEPTIDICOS DE SERRALISINAS			

REVINDICACIONES

1 Una composición farmacéutica caracterizada por que contiene uno o varios fragmentos polipeptídicos pertenecientes al carboxilo terminal, a partir de la metionina interna de la secuencia hasta el final de la molécula, una o varias Serralisinas o variantes de estos fragmentos la cual es capaz de producir efectos anti-tumorales terapéuticos o preventivos, en el organismo receptor

79
#61

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-0115/5-00000-0000
Fec: 2007-02-22 11:31:48 Usp. 2000 NUEVE MIL QUINIENTOS
100.11 PATENTE
Lvs: 3/0 FASENACIONAL
Act: 411 PRESENCIAL
Folios: 7/0

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 6,342
FECHA : ENERO 22 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55272336	22/01/2007	33,114,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 08992 841 004 9

ESTADO DE LA ADMINISTRACIÓN
Red 07-0115/5-00000-0000
REC. AUT. 0001/0100 Dep. REG. MERCADERES
13.11 PATENTE
EVS. 310 PATENTACIÓN
AL 111 PATENTACIÓN 1000. 10

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

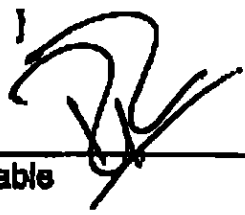
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha _____

Camara 13 No 27-00 Piso 5, 7 y 10
Commutador 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C., Colombia

81

REPUBLICA DE COL MBLA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGICA

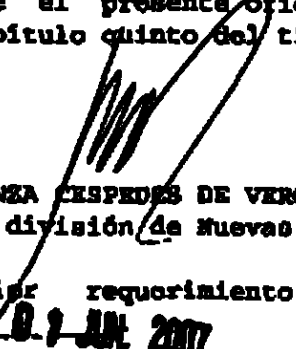
REFERENCIA	Radicación No	7 11575
	Solicitud internacional	PCT/CU2005/000003
	Fecha inicio fase nacional	08/02/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No	6553

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente Oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 JUN 2007
adpall