

TÍTULO DE PATENTE No. 367975

Titular(es):	UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO; JESUS CAMPOS GARCIA; MARIA DOLORES VAZQUEZ RIVERA; VICTOR MEZA CARMEN; HOMERO REYES DE LA CRUZ
Domicilio:	Santiago Tapia No. 403, Col. Centro, 58000, Morelia, Michoacán de Ocampo, MÉXICO; Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Edif. B-1, Ciudad Universitaria, Av. Francisco J. Mujica S/N, Col. Felicitas del Rio, 58030, Morelia, Michoacán de Ocampo, MÉXICO
Denominación:	CICLODIPÉPTIDOS DE ORIGEN BACTERIANO CON PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS Y SUS USOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.
Clasificación:	CIP: A61K38/12; A61K38/05; C12R1/385; G01N33/574 CPC: A61K38/12; A61K38/05; C12R1/385; G01N33/574
Inventor(es):	JESUS CAMPOS GARCIA; MARIA DOLORES VAZQUEZ RIVERA; VICTOR MEZA CARMEN; HOMERO REYES DE LA CRUZ

SOLICITUD

Número:	Fecha de Presentación:	Hora:
MX/a/2015/017557	10 de Diciembre de 2015	10:48

Vigencia: Veinte años
Fecha de Vencimiento: 10 de diciembre de 2035
Fecha de Expedición: 13 de agosto de 2019

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracción III, 7º BIS 2 y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo, del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000405397295|Servicio de Administración Tributaria|56||MX/2019/82655|MX/a/2015/017557|Título de patente normal|1027|RGZ|Pág(s) 1|+B8Jfoe2CwckJfpl9J2cTjPEDdY=
Sello Digital:
HR+6BfxNhQ/gQnCXa5W/rT0rJpSaXXyQBCEOWlh8IU/58dK6NQNXSALfWlxE/OsCUAhhjKeFF44HSpPmm/Bs7vEgW
GFM+KHq/nJox1f5RAYbRc/r4DixMD0bVISX7EbWxZ6fInn/8sAzYuZQpYLWOrjyV2CPHBSXLarMLf0bx83i9L26g
Pfcbc0fE2NBjwZDzxSRFF/k7ib+VtFgAfp5WsR2O6X11/x5HL8cNmoDGhh3ibx6MZn98guTsrNPAAaBGtTnekKblk
4kiDPc/tyabNCpNVHVISQ7d61812710sNWwY38ry1GMZ5B+RDrgi2M+60SugmJU+d0SKS1BA==



TÍTULO DE LA PATENTE

Ciclodipéptidos de origen bacteriano con propiedades anticancerígenas y sus usos en el tratamiento del cáncer.

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una mezcla de ciclodipéptidos producidos por la bacteria de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PaCDPs) con propiedades anticancerígenas y sus usos en el tratamiento del cáncer.

10

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

Los ciclodipéptidos y sus derivados, las dicetopiperazinas (DKPs o 2,5-DKPs), constituyen una clase de pequeñas moléculas obtenidas por la condensación de dos α -L-aminoácidos que son sintetizados por un amplio rango de microorganismos. Se ha visto que el 90% de las bacterias Gram negativas los producen. Los ciclodipéptidos son una clase de estructuras privilegiadas y producidas de manera natural, ya que tienen la capacidad de unirse a un amplio rango de receptores, debido a que contienen dos enlaces cis-amida y por tanto poseen dos aceptores de puentes de hidrógeno y dos sitios donadores de puentes de hidrógeno, importantes para la interacción con enzimas y receptores. Estos compuestos son sintetizados por una familia de enzimas formadoras de enlaces peptídicos dependientes de ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt) llamadas ciclodipéptido sintasas (CDPSs), así como por las Péptido Sintasas no Ribosomales (NRPS). Tanto las CDPS como las NRPS sintetizan preferentemente un ciclodipéptido principal, correspondiente a la introducción preferencial de un aminoácido en el producto; sin embargo, estas enzimas son claramente promiscuas produciendo combinaciones de varios aminoácidos. Las CDPS se encuentran en la intersección entre el metabolismo primario y secundario ya que, el uso de los RNAt cargados con sus respectivos aminoácidos, desvía éstas moléculas del metabolismo primario para la síntesis de metabolitos secundarios. La formación de ciclodipéptidos es a menudo el primer paso en la síntesis de DKPs más complejas, que se obtienen después de reacciones de adaptación. Éste parece ser el caso de la síntesis de ciclodipéptidos por CDPS, los cuáles no son probablemente los productos finales, sino más bien intermediarios en la ruta biosintética de DKPs.

Por otro lado, las NRPS, son enzimas modulares y multifuncionales, en las cuáles cada módulo es el responsable de la incorporación de un aminoácido en el péptido final. Cada módulo consiste de dominios responsables de una etapa particular de la síntesis, los dominios de adenilación seleccionan y activan a un aminoácido libre formando un aminoacil-adenilato en un proceso que requiere ATP. El aminoácido activado es transferido al dominio que lleva la proteína, el cual es unido covalentemente por un grupo 4'-fosfopantenil. Los dominios de condensación son responsables de la formación del enlace peptídico entre sus substratos aminoacil- unidos a sus moléculas adyacentes.

10 La patente US7,112,425B2 describe polinucleótidos y polipéptidos purificados involucrados en la síntesis de derivados de dicetopiperazinas.

Farmacológicamente hablando, los péptidos cíclicos son más biodisponibles y más estables contra la degradación por peptidasas que los péptidos lineales. Además se han encontrado diversas actividades biológicas, por ejemplo:

15 Ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) actúan como componentes antifúngicos, y el ciclo(L-Phe-L-Pro) de *Lactobacillus plantarum*, induce apoptosis en células cancerosas de colon HT-29.

En *Streptomyces fungicidicus* se encontraron cinco dicetopiperazinas con propiedades anti-incrustante, crecimiento indeseado de diversos organismos sobre varios tipos de estructuras de uso marítimo, de los cuáles el ciclo(L-Val-L-Pro) tiene la actividad antifouling más fuerte inhibiendo el crecimiento de *Balanus amphitrite*. Ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Ile-L-Pro) de *Propionibacterium jensenii* presentan propiedades antifúngicas contra *Aspergillus fumigatus*. Ciclo(L-Phe-L-Pro) ha sido aislado de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas alcaligenes* en sobrenadantes libres de células y se ha reportado que están involucradas en mecanismos de percepción de quórum bacteriano, los cuáles sincronizan respuestas fisiológicas bacterianas de una manera dependiente de la densidad celular, y el hallazgo de que éste mismo ciclodipéptido es producido por *L. plantarum* puede sugerir la posibilidad de un entrecruzamiento entre sistemas de señalización de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Recientemente en un estudio realizado por Ortíz-Castro y col. en 2011, encontraron que *P. aeruginosa* PAO1 tiene una actividad promotora del crecimiento vegetal. Esta actividad promotora fue asociada a los ciclodipéptidos: ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Val), producidos por la bacteria (Ortíz-Castro R, Díaz-

Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011 April 26, 2011;108(17):7253-8). Morgan y col. en 2010, reportan a los ciclodipéptidos ciclo(L-Val-L-Tyr) y ciclo(L-Val-L-Phe) como factores de virulencia bacterianos en *Staphylococcus aureus* (Wyatt MA, Wang W, Roux CM, Beasley FC, Heinrichs DE, Dunman PM, et al. *Staphylococcus aureus* Nonribosomal Peptide Secondary Metabolites Regulate Virulence. Science. 2010 July 16, 2010;329(5989):294-6). Kanoh y col. en 2000, reportan al ciclo (L-Phe-L-His) de *Aspergillus ustus*, como inhibidor del ciclo celular en diversas líneas celulares cancerosas (Kanoh K, Kohno S, Asari T, Harada T, Katada J, Muramatsu M, et al. (-)-Phenylahistin: A new mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus ustus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1997 11/18;7(22):2847-52). Brauns y col., en 2004, reportan al ciclo(L-Phe-L-Pro) de *Lactobacillus plantarum*, como inductores de apoptosis en células cancerosas de colon HT-29 (Brauns SC, Milne P, Naudé R, Van De Venter M. Selected Cyclic Dipeptides Inhibit Cancer Cell Growth and Induce Apoptosis in HT-29 Colon Cancer Cells. Anticancer Research. 2004 May 1, 2004;24(3A):1713-20). Li y colaboradores reportan extractos de *Hericium erinaceus* que contiene dicetopiperazinas, dichos extractos son efectivos contra cáncer gastrointestinal (Li G, Yu K, Li F, Xu K, Li J, He S, et al. Anticancer potential of *Hericium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers. Journal of Ethnopharmacology. 2014 4/28;153(2):521-30).

La solicitud de patente WO02/062797A2 describe dicetopiperazinas y su uso para inhibir eventos celulares tales como los que involucran a los factores NFK- α y NFK- β . La solicitud de patente WO2005/000311A1, describe dicetopiperazinas sustituidas y su uso para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna.

Por lo que persiste en el estado del arte, la necesidad de tener tratamientos alternativos y específicos contra el cáncer, que sigue siendo una fuente importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La necesidad persiste además porque los tratamientos actuales, si bien reducen o destruyen a las células cancerosas en los pacientes, estos son inespecíficos y agresivos y presentan un importante número de efectos tóxicos secundarios.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de los ciclodipéptidos encontrados en los cultivos de *P. aeruginosa* determinado por GC-MS. Se grafica abundancia en eje Y contra tiempo de retención en minutos en el eje X. Las letras corresponden a las fracciones colectadas para evaluaciones posteriores. E= Ciclo(L-Pro-L-Leu); G= Ciclo(L-Pro-L-Val); I= Ciclo(L-Pro-L-Phe); D= Ciclo(L-Pro-L-Tyr). El asterisco sobre las letras significa un nivel de pureza >85%. Los números sobre los picos indican el tiempo de retención de cada pico indicado.

Figura 2. Estructura de los ciclodipéptidos bacterianos de la presente invención. a) Ciclo(L-Pro-L-Leu); b) Ciclo(L-Pro-L-Val); c) Ciclo(L-Pro-L-Phe); d) Ciclo(L-Pro-L-Tyr).

Figura 3. Se graficó el porcentaje de viabilidad celular en el eje Y, contra la concentración de las fracciones purificadas, así como de la mezcla de los ciclodipéptidos procedentes de *P. aeruginosa*, en el eje X. Las concentraciones usadas son de 0, 0.001, 0.01, 0.1 y 1.0 mg/mL para cada fracción y para la mezcla [G=Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-leu); I=Ciclo(L-Pro-L-Phe); D=Ciclo(L-Pro-L-Tyr); M=Mezcla de PaCDPs (0.5:0.75:1.0:0.75); a) viabilidad de las células cancerosas HeLa y b) viabilidad de las células CaCo-2. Se grafica el promedio \pm el error estándar de tres resultados independientes.

Figura 4. Se graficó el porcentaje de células apoptóticas en el eje Y, contra la concentración de las fracciones purificadas, así como de la mezcla de los ciclodipéptidos procedentes de *P. aeruginosa* en el eje X. Las concentraciones usadas son de 0, 0.001, 0.01, 0.1 y 1.0 mg/mL para cada fracción de la figura 1 y para la mezcla; las barras representan el porcentaje de células HeLa en proceso de apoptosis. Se grafica el promedio \pm el error estándar de tres resultados independientes.

Figura 5. Se graficó el porcentaje de viabilidad celular en el eje Y, contra la concentración de ciclodipéptidos sintéticos procedentes de casa comercial BACHEM CO.: Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), así como de la mezcla de éstos. Las concentraciones usadas en el eje X son de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10, y 100 mg/mL para cada ciclodipéptido sintético indicado y para la mezcla (M) (1:1:1); a)

viabilidad de las células cancerosas HeLa y b) viabilidad de las células CaCo-2. Se grafica el promedio \pm el error estándar de tres resultados independientes.

Figura 6. Se graficó el porcentaje de células cancerosas apoptóticas en el eje Y, contra la concentración indicada en el eje X en mg/mL, de la mezcla de ciclodipéptidos sintéticos procedentes de casa comercial BACHEM CO. a) Porcentaje de células cancerosas HeLa y b) células CaCo-2, en proceso de apoptosis a las 12 horas de tratamiento con la mezcla de ciclodipéptidos sintéticos. Se grafica el promedio \pm el error estándar de tres resultados independientes.

Figura 7. Se graficó el porcentaje de viabilidad celular en el eje Y, contra la concentración de la mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), procedentes de *P. aeruginosa* en proporción (0.5:0.75:1:0.75), en el eje X. Las concentraciones usadas son de 0, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 y 200 mg/mL. a) en barra oscuras se representa la viabilidad de las células HeLa y en barras claras la viabilidad de células CaCo-2. b) representan la viabilidad de las células no cancerosas NOVA; en barra oscuras se representa la viabilidad de las células NOVA con medio completo (suero) y en barras claras la viabilidad de células NOVA en medio incompleto (sin suero). Se grafica el promedio \pm el error estándar de tres resultados independientes. c) Gráfica de un análisis de regresión no lineal de las curvas dosis respuesta de la mezcla de ciclodipéptidos procedentes de *P. aeruginosa*. Se grafica en el eje Y, el porcentaje de viabilidad contra la concentración de ciclodipéptidos en el eje X, la concentración de la mezcla se expresa en escala Logarítmica en mg/mL. En símbolos rellenos se representan las células HeLa y en símbolos vacíos las células CaCo-2.

Figura 8. Gráfica de un análisis de regresión no lineal de las curvas dosis respuesta correspondientes a la inducción de apoptosis causada por la mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), procedentes de *P. aeruginosa* en proporción 0.5:0.75:1:0.75. Se grafica en el eje Y, el porcentaje de células apoptóticas contra la concentración de ciclodipéptidos en el eje X, la concentración de la mezcla se expresa en escala Logarítmica en mg/mL. En

símbolos rellenos se representan las células HeLa y en símbolos vacíos las células CaCo-2.

Figura 9. Cambios morfológicos celulares en las células HeLa (A-C), CaCo-2 (D-F) y NOVA (J-L). Se presentan fotografías representativas de cultivos control (A, D y J), células tratadas con Actinomicina D como inductor de apoptosis celular (B, E y K) y células Hela (C), CaCo-2 (F) y NOVA (L), tratadas con 100 mg/mL de la mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), procedentes de *P. aeruginosa* en proporción 0.5:0.75:1:0.75. En los paneles G-I se puede observar los cuerpos apoptóticos teñidos con DAPI en células HeLa control (G), tratados con actinomicina A (H) y con la 100 mg/mL de la mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) procedentes de *P. aeruginosa* en proporción 0.5:0.75:1:0.75 (I).

Figura 10. Gráfica de las curvas dosis respuesta correspondientes a la inducción de apoptosis causada en células mononucleares de sangre periférica por la mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), procedentes de *P. aeruginosa* en proporción 0.5:0.75:1:0.75. Se grafica en el eje Y, el porcentaje de células apoptóticas contra el tiempo en horas en el eje X, las concentraciones de la mezcla usadas fueron 1 mg/mL (triángulos invertidos), 10 mg/mL (rombos) y 100 mg/mL (triángulos). Como control negativo se utilizó DMSO (círculos vacíos) y como control positivo actinomicina D (círculos rellenos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención, se refiere a la mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), en proporciones (0.5:0.75:1.0:0.75) producidos preferencialmente por *P. aeruginosa* PAO1, y su uso como inhibidores del crecimiento de células cancerosas de origen humano. La mezcla de ciclodipéptidos de la presente invención mostró efectos significativos en la reducción de la viabilidad y en la inducción de apoptosis en al menos dos líneas celulares cancerosas, en comparación con ciclodipéptidos sintéticos. Sorprendentemente, no mostró efectos sobre la viabilidad ni sobre la inducción de apoptosis de células no

cancerosas NOVA, ni en la inducción de apoptosis en células mononucleáres de sangre periférica.

5 La presente invención se entenderá de manera detallada mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Preparación de la mezcla de los ciclodipéptidos (PaCDPs)

10 Se inoculó medio LB con la bacteria de *P. aeruginosa* cepa PAO1 por 12 h a una temperatura de 30-37°C en agitación constante a ~200 rpm. Posteriormente se inoculó 1 L de medio LB con el pre-inóculo y se incubó en las mismas condiciones por 24 h. Una vez que transcurrió el tiempo mencionado del cultivo se tomó 1 mL para tomar lectura a una D.O. a $\lambda=600$ nm, dando una D.O. de 1.8-2.2 y se procedió a eliminar las células bacterianas por centrifugación a 7000 rpm por 10 min.

15 Se recuperó el total del sobrenadante y se agregó un volumen igual de acetato de etilo con ácido acético 0.01% v/v. Se realizan dos agitaciones vigorosas de 2 min, se toma la fase orgánica y se repite el paso anteriormente descrito, para recuperar la fase orgánica. Una vez obtenida, se procede a evaporar hasta sequedad en un rotavapor a 60°C y vacío. A la cantidad que se obtiene es necesario redissolverla con acetato de etilo acidificado. La muestra fue concentrada hasta sequedad en vacío en un Concentrador. Para realizar la determinación de los PaCDPs se preparó una dilución 1:100 (1 mL con acetonitrilo o metanol) y se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) (Figura 1). Se determinó por GC-EM y RMN que la mezcla contiene los ciclodipéptidos
20 Ciclo(L-Pro-L-Leu) (Fracción E, Figura 1), Ciclo(L-Pro-L-Val) (Fracción G, Figura 1),
25 Ciclo(L-Pro-L-Phe) (Fracción I, Figura 1) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) (Fracción D, Figura 1), en proporciones (0.5:0.75:1.0:0.75) producidos preferentemente por la bacteria de *P. aeruginosa* PAO1 (PaCDPs) mostrados en la Figura 2.

30 Ejemplo 2

Ensayos de viabilidad celular

Las células provenientes de varias líneas celulares cancerosas humanas se cultivaron en cajas de Petri con medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), suplementado con

10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina, 40 µg/mL de gentamicina y 1 µg/mL de anfotericina B. Las células se incubaron en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C.

5 La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (thiazolyl blue tetrazolium bromide ; MTT).

10 Las líneas celulares cancerosas HeLa (cáncer cérvico-uterino), CaCo-2 (cáncer de colon), así como el cultivo primario NOVA (fibroblastos de pulmón humano), se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 3×10^4 células por pozo en un volumen de 200 µL de Medio Completo (CM) y se incubaron 24 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 12 h, las células se sincronizaron con Medio incompleto, desprovisto de suero (SS) durante 12 h a 37°C y se incubaron con diferentes concentraciones de la mezcla de los PaCDPs (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/mL), como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para
15 disolver la mezcla de PaCDPs y como control positivo de generación de apoptosis se usó Actinomycin D a una concentración de 5 mM.

Para determinar la viabilidad celular, se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/mL) en cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37°C.

20 Finalmente, se añadieron 100 µL de 2-propanol:HCl (1 M) (19:1 v/v) para disolver los cristales de formazán. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro de microplacas a $\lambda=595$ nm.

Se graficó la viabilidad celular contra la concentración de las fracciones G=Ciclo(L-Pro-L-Val); I=Ciclo(L-Pro-L-Phe); D=Ciclo(L-Pro-L-Tyr) y la mezcla de ciclodipéptidos PaCDPs en proporción 0.5:0.75:1:0.75 (Figura 3) en células HeLa (Figura 3 a) y CaCo-2
25 (Figura 3b). Se obtuvo la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) (Figura 7c), obteniendo una CI₅₀ de 0.53 mg/mL para las células HeLa y de 0.66 mg/mL para las células CaCo-2. Sorprendentemente ninguna concentración de la mezcla de los PaCDPs probados mostró efecto sobre la viabilidad de la línea celular no cancerosa NOVA (Figura 7b).

30 **Ejemplo 3**

Ensayo de Apoptosis/Necrosis

Las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2, así como el cultivo primario NOVA (línea celular no-cancerosa), se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano a una

densidad de 3×10^4 células por pozo, en un volumen de 200 μ L de Medio Completo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 12 h, las células se sincronizaron durante 12 h a 37°C y se incubaron con diferentes concentraciones de todas las fracciones (D, E, F, G, H, I) mostradas en la figura 1 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μ g/mL), y de la mezcla de los PaCDPs Ciclo(L-Pro-L-Leu); Ciclo(L-Pro-L-Val); Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) en proporción 0.5:0.75:1:0.75; como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de PaCDPs y como control positivo de generación de apoptosis se utilizó Actinomicina D a una concentración de 5 mM.

5

10 Para determinar el efecto apoptótico, las células se sometieron a un tratamiento con tripsina y posteriormente se centrifugaron a 600 \times g durante 5 min a 4°C. El pellet de células fue lavado con PBS 1X, la pastilla fue suspendida en 300 μ L de buffer de Anexina V (HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM, pH= 7.4) durante 15 min. Posteriormente las células se centrifugaron a 600 \times g durante 5 min a 4°C, el pellet fue

15 re-suspendido en 50 μ L de buffer de Anexina V y se le adicionó 1 μ L del anticuerpo acoplado al fluoróforo Alexa-Fluor 488 (anti-Anexina V) y 1 μ L de Ioduro de propidio (PI). La suspensión se dejó en incubación por 15 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Después se adicionó 0.3 mL de buffer de Anexina V, para realizar la lectura de fluorescencia.

20 La fluorescencia se cuantificó inmediatamente por citometría de flujo (FC) con un Citómetro de flujo BD Accuri C6.

Para los ensayos de apoptosis y necrosis, la fluorescencia del sistema Alexa-Fluor 488 anti-Anexina V fue observada en el canal de emisión de fluorescencia FL1 a 495/519 nm y para el caso de Ioduro de propidio fue en el canal FL2 a 535/617 nm. Se analizó un mínimo de 20,000 eventos celulares. Se graficó el porcentaje de células apoptóticas contra la concentración de todas las fracciones mostradas en la figura 1 (Figura 4) y la mezcla de los PaCDPs conteniendo Ciclo(L-Pro-L-Leu); Ciclo(L-Pro-L-Val); Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) en proporción 0.5:0.75:1:0.75 (Figura 8). Se calculó la CI₅₀, obteniendo una CI₅₀ para las células HeLa de 6.5×10^{-5} mg/mL y para las células CaCo-2 de 1.8×10^{-4} mg/mL (Figura 8). En este caso la IC₅₀ indica la concentración de la mezcla de PaCDPs necesaria para inducir la apoptosis al 50 % de las células cancerosas. Sorprendentemente ninguna concentración de la mezcla de los PaCDPs probada indujo incremento en el número de células apoptóticas en la línea no

25

30

cancerosas NOVA (Figura 9), ni en células mononucleares de sangre periférica (Figura 10).

Ejemplo 4

- 5 Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de PaCDPs en las líneas celulares cancerosas y no cancerosas.

Las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2, así como el cultivo primario NOVA se sembraron en placas de 12 pozos de fondo plano, con un cubreobjetos redondo cubierto con colagenasa estéril. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en 1 mL de CM y se incubaron durante 24 h a 37°C . A continuación, las células se sincronizaron con Medio Incompleto durante 12 h a 37°C y se incubaron con diferentes concentraciones de la mezcla de los PaCDPs (0.1, 1, 10, y 100 $\mu\text{g/mL}$). Se utilizó como control DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de PaCDPs. Después de 12 h de tratamiento, las células se lavaron con PBS, para posteriormente ser fijadas con paraformaldehído (PFA al 4%) durante 10 min en hielo. Después las células se incubaron con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000) durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se retiraron los cubreobjetos, para ser colocado de forma invertida en un portaobjetos con PBS y glicerol 1:1.

Las células cultivadas fueron fotografiadas usando un microscopio de contraste de fase invertida Carl Zeiss-HB0-50 equipado con una cámara digital.

Los cultivos de células HeLa fueron cultivados siguiendo el mismo protocolo anteriormente mencionado, se incubaron con DAPI y se visualizaron usando un microscopio confocal Olympus FV1000. Las células se observaron con una emisión de fluorescencia entre 405 y 505 nm. En la figura 9 se muestran los cambios morfológicos inducidos por la mezcla de PaCDPs en células HeLa (Figura 9C) y CaCo-2 (Figura 9F), donde se puede observar una morfología de apoptosis celular de estas líneas celulares tratadas con los PaCDPs, morfología que fue similar comparando con las células cancerosas tratadas con Actinomicina D (Figura 9B y 9E). De manera sorprendente, ninguna concentración de los PaCDPs probada induce la morfología apoptótica en células no cancerosas NOVA (Figura 9).

Ejemplo 5.

Efecto de ciclodipéptidos sintéticos sobre la viabilidad de líneas cancerosas.

Las células provenientes de varias líneas celulares cancerosas humanas se cultivaron en cajas de Petri con medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), suplementado con
5 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-estreptomocina, 40 µg/mL de gentamicina y 1 µg/mL de anfotericina B. Las células se incubaron en una atmósfera al 5% de CO₂ a 37°C.

La viabilidad celular se determinó por el método colorimétrico utilizando 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (thiazolyl blue tetrazolium bromide;
10 MTT).

Las líneas celulares cancerosas HeLa (cáncer cérvico-uterino), CaCo-2 (cáncer de colon), se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 3×10^4 células por pozo en un volumen de 200 µL de Medio Completo (CM) y se incubaron 24 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 12 h, las células se sincronizaron con
15 Medio Incompleto, desprovisto de suero (SS) durante 12 h a 37°C y se incubaron con diferentes concentraciones de los ciclodipéptidos sintéticos Ciclo(L-Pro-L-Val); Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) por separado y de la mezcla en proporción 1:1:1 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 µg/mL), como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver la mezcla de ciclodipéptidos sintéticos y como
20 control positivo de generación de apoptosis se usó Actinomicina D a una concentración de 5 mM.

Para determinar la viabilidad celular, se añadió 10 µl de MTT (5 mg por mL) en cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37°C.

Finalmente, se añadieron 100 µL de 2-propanol:HCl (1 M) (19:1 v/v) para disolver los
25 cristales de formazán. Las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro de microplacas a 595 nm.

Se graficó la viabilidad celular contra la concentración de los ciclodipéptidos sintéticos Ciclo(L-Pro-L-Val); Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) y la mezcla en proporción 1:1:1 (Figura 5) en células HeLa (Figura 5a) y CaCo-2 (Figura 5b). Se puede observar
30 que estos compuestos, solos y en mezcla tienen efectos significativos hasta la concentración más alta utilizada (100 µg/mL) en ambas células cancerosas (Figura 5).

Ejemplo 6.

Ensayo de Apoptosis/Necrosis con ciclodipéptidos sintéticos.

Las líneas celulares cancerosas HeLa y CaCo-2, se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 3×10^4 células por pozo, en un volumen de 200 μL de Medio Completo y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% durante 12 h, las células se sincronizaron durante 12 h a 37°C y se incubaron con diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de los ciclodipéptidos sintéticos Ciclo(L-Pro-L-Val), (L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) o su mezcla en proporción 1:1:1; como control negativo se utilizó DMSO a la misma concentración usada para disolver los compuestos y como control positivo de generación de apoptosis se utilizó Actinomicina D a una concentración de 5 mM.

Para determinar el efecto apoptótico, las células se sometieron a un tratamiento con tripsina y posteriormente se centrifugaron a $600 \times g$ durante 5 min a 4°C . El pellet de células fue lavado con PBS 1X, la pastilla fue suspendida en 300 μL de buffer de Anexina V (HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM. pH= 7.4) durante 15 min. Posteriormente las células se centrifugaron a $600 \times g$ durante 5 min a 4°C , el pellet fue re-suspendido en 50 μL de buffer de Anexina V y se le adicionó 1 μL del anticuerpo acoplado al fluoróforo Alexa-Fluor 488 (anti-Anexina V) y 1 μL de ioduro de propidio (PI). La suspensión se dejó en incubación por 15 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Después se adicionó 0.3 mL de buffer de Anexina V, para realizar la lectura de fluorescencia.

La fluorescencia se cuantificó inmediatamente por citometría de flujo (FC) con un Citómetro de flujo BD Accuri C6.

Para los ensayos de apoptosis y necrosis, la fluorescencia del sistema Alexa-Fluor 488 anti-Anexina V fue observada en el canal de emisión de fluorescencia FL1 a 495/519 nm y para el caso de ioduro de propidio fue en el canal FL2 a 535/617 nm. Se analizó un mínimo de 20,000 eventos celulares. Se graficó el porcentaje de células apoptóticas contra las concentraciones indicadas de los ciclodipéptidos sintéticos o de la mezcla en la línea cancerosa HeLa (Figura 6a) y CaCo-2 (Figura 6b). Se puede observar que el porcentaje de inducción de apoptosis es bajo, incluso para la concentración mas alta (100 mg/mL) de los tratamiento utilizadas en ambas líneas cancerosas.

REIVINDICACIONES

1.- Una mezcla de ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) en proporciones 0.5:0.75:1.0:0.75 para usarse en el
5 tratamiento del cáncer; en donde los ciclodipéptidos se obtienen de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, y en donde la mezcla de ciclodipéptidos está a una concentración de entre 0.1 y 1 mg/ml.

2.- El uso de una mezcla de ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu), Ciclo(L-Pro-L-Val),
10 Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr) en proporciones 0.5:0.75:1.0:0.75 para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer; en donde los ciclodipéptidos se obtienen de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa PAO1*, y en donde el medicamento está adaptado para administrar la mezcla de ciclodipéptidos a una concentración de entre 0.1 y 1 mg/ml.

15

20

25

30

RESUMEN

La presente invención se refiere a una mezcla de los ciclodipéptidos Ciclo(L-Pro-L-Leu),
5 Ciclo(L-Pro-L-Val), Ciclo(L-Pro-L-Phe) y Ciclo(L-Pro-L-Tyr), en proporciones
(0.5:0.75:1.0:0.75), obtenida de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,
caracterizada porque es capaz de inducir citotoxicidad reduciendo la viabilidad celular e
inducir apoptosis en líneas cancerosas humanas, pero sorprendentemente a
concentraciones 100-1000 veces mayores no causa esos efectos en líneas celulares no
10 cancerosas humanas ni en células mononucleares de sangre periférica. Se refiere
además a su uso en la fabricación de una composición farmacéutica y a una
composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

15

20

25

30

Figura 1

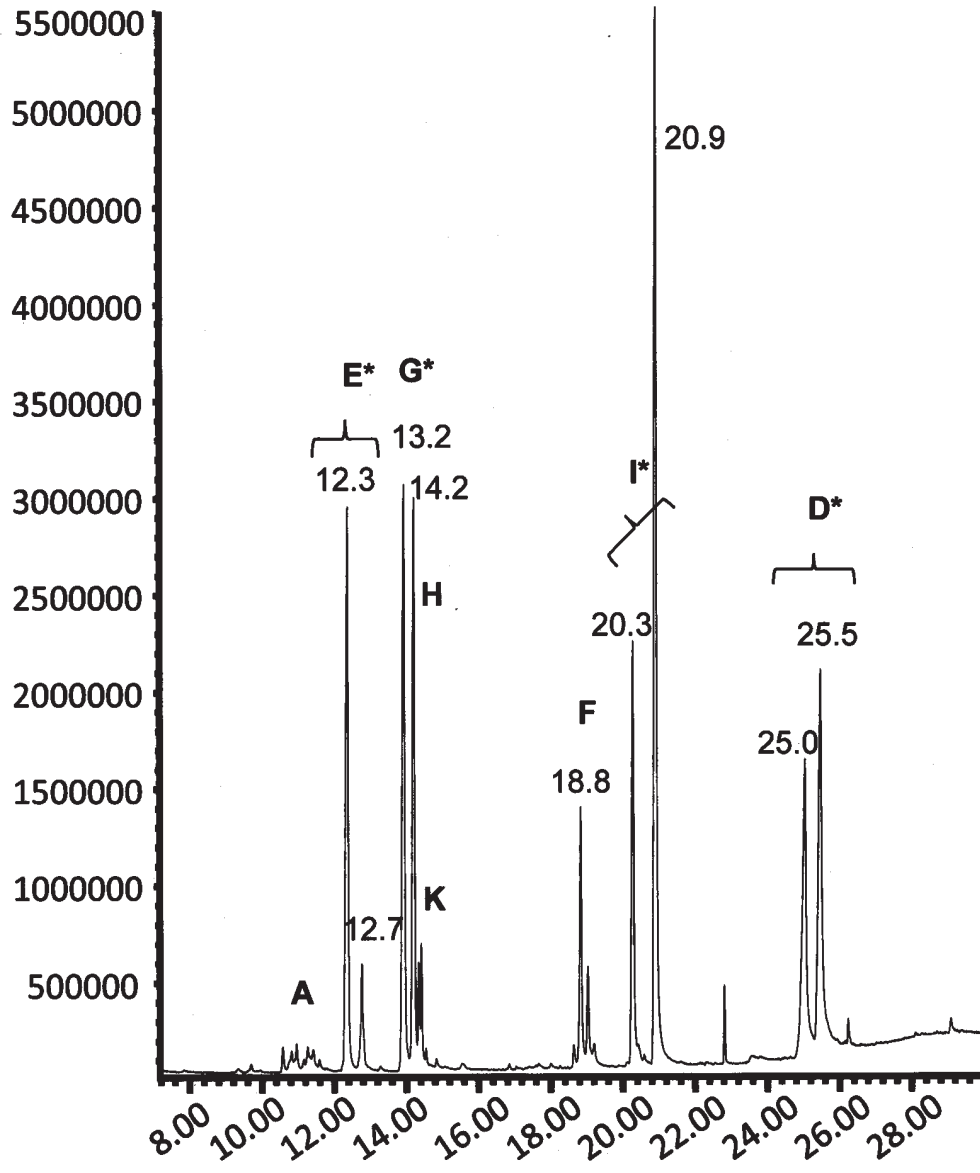


Figura 2

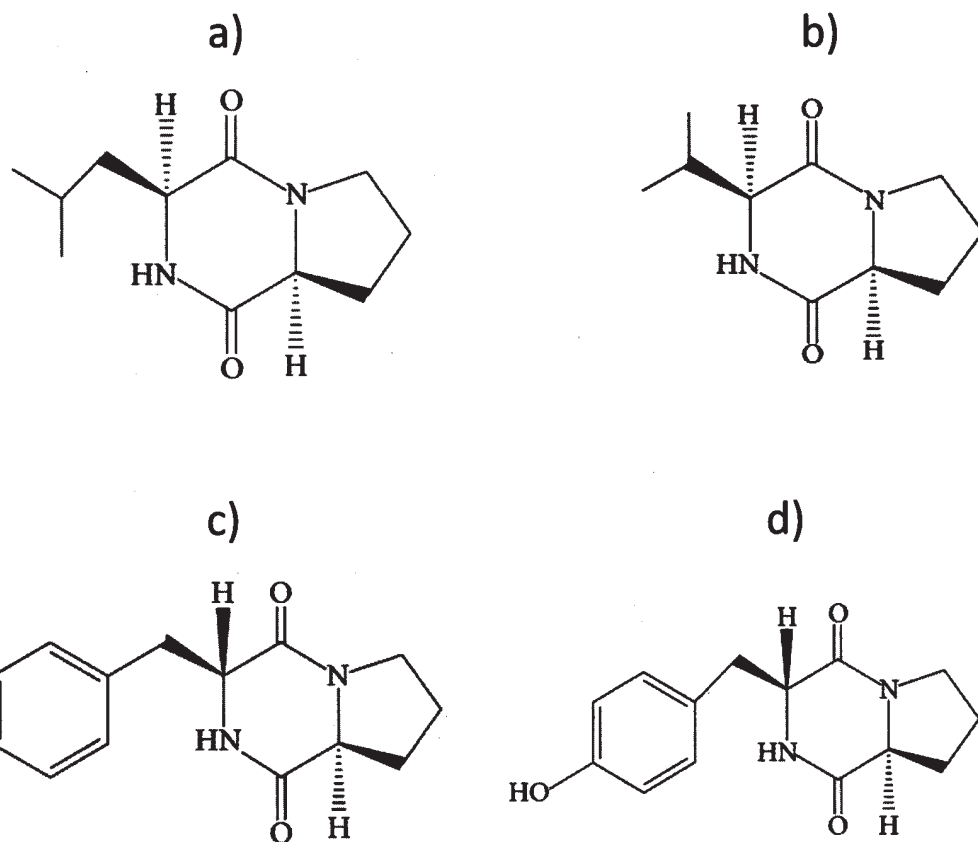
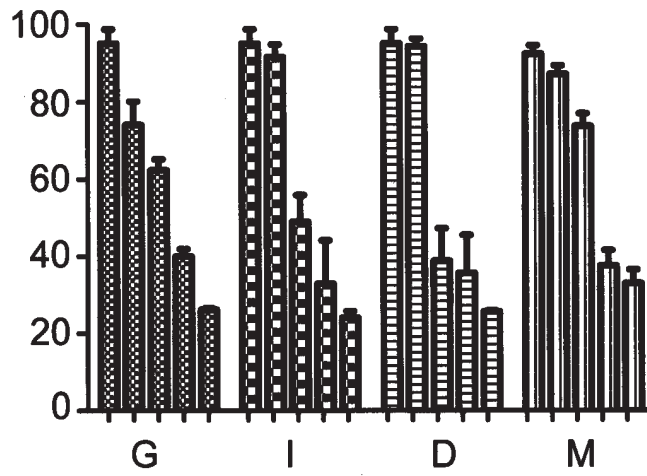


Figura 3

a)



b)

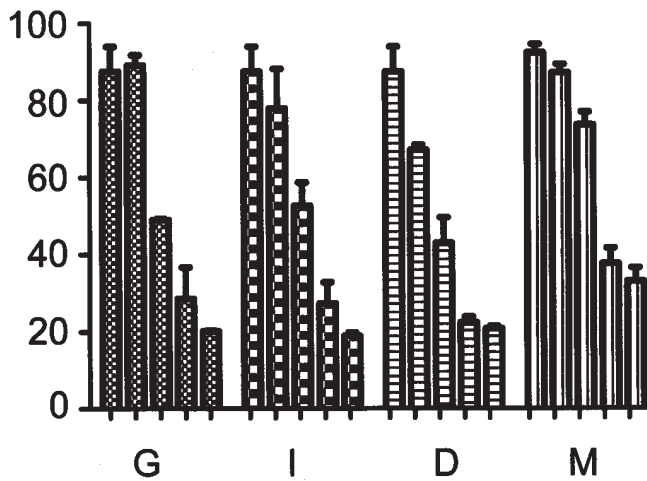


Figura 4

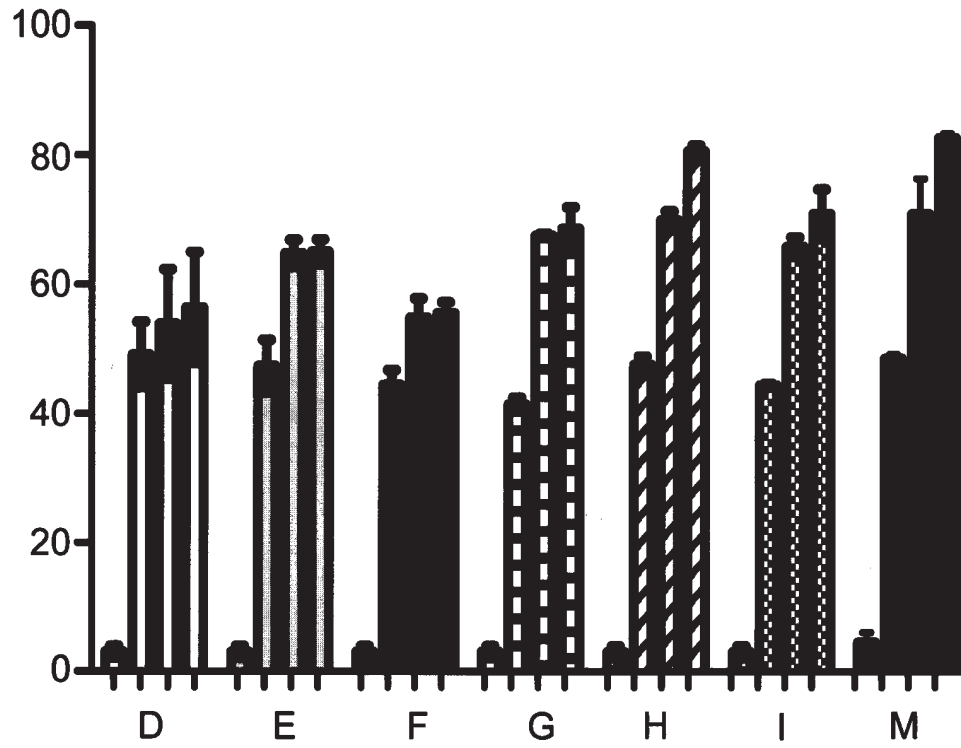
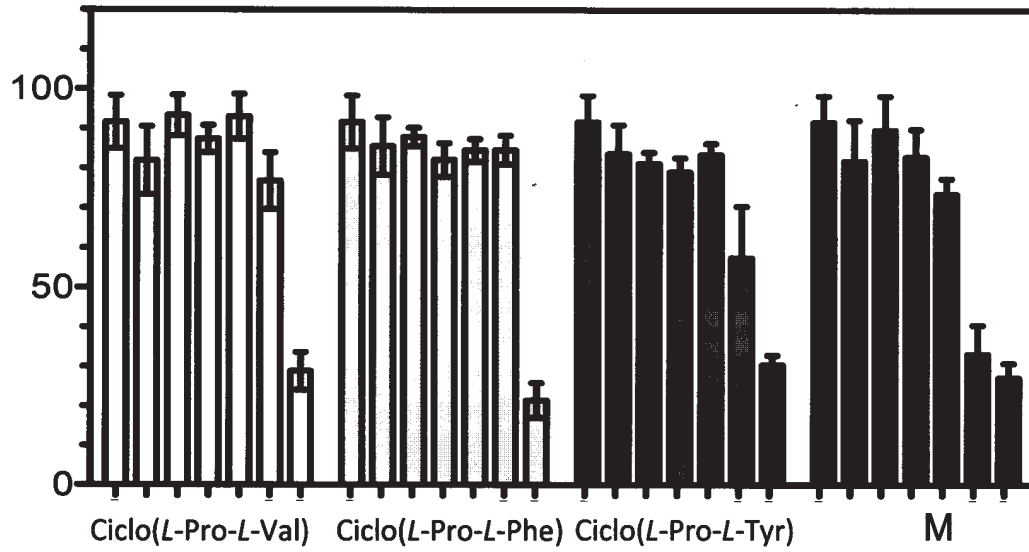


Figura 5

a)



b)

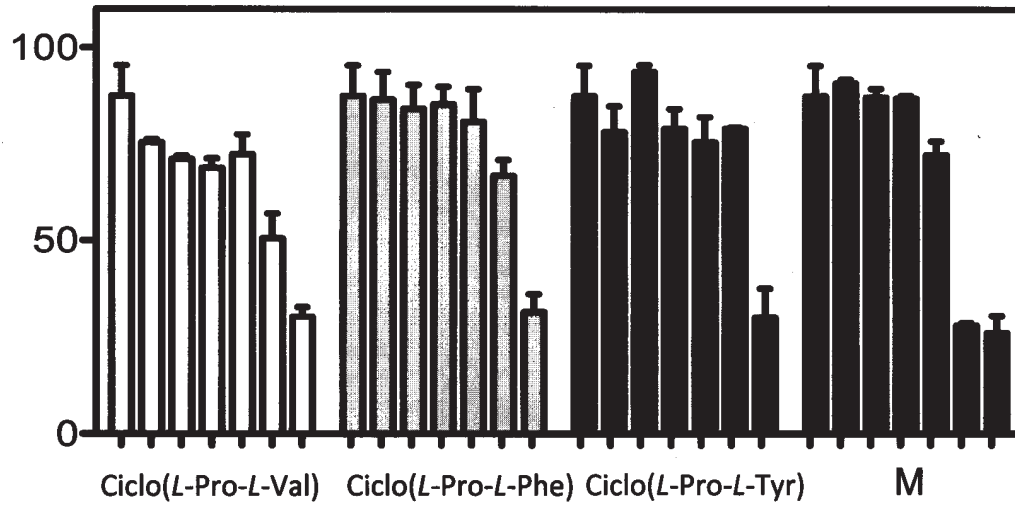


Figura 6

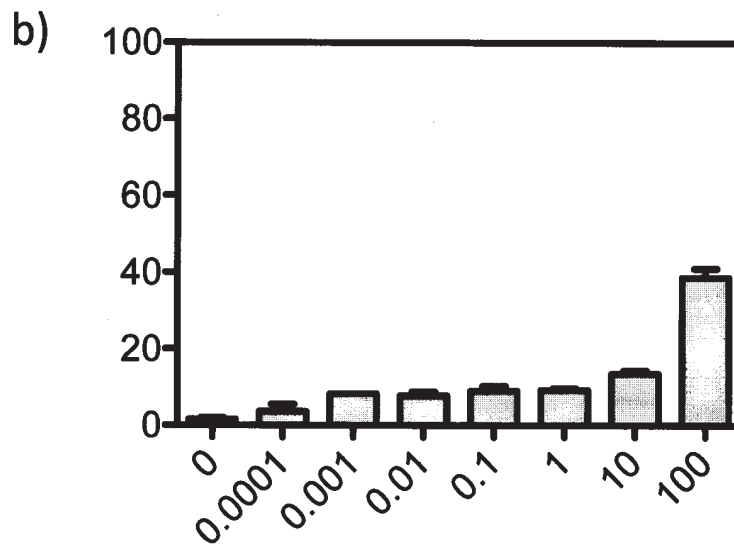
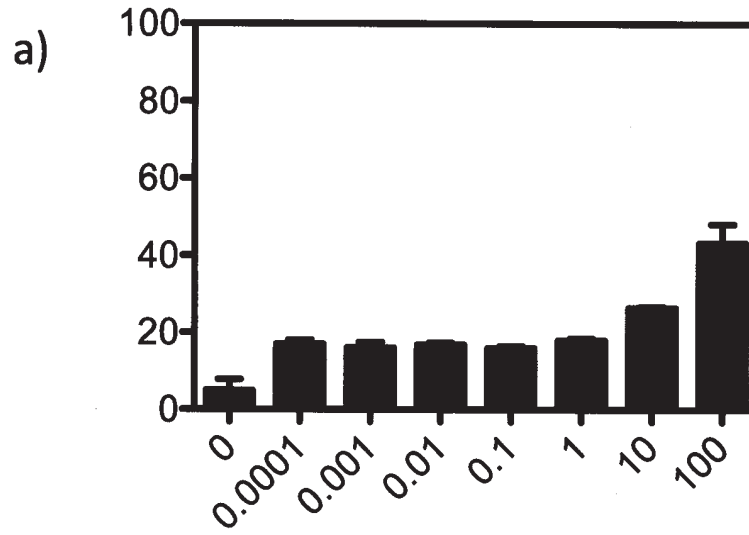


Figura 7

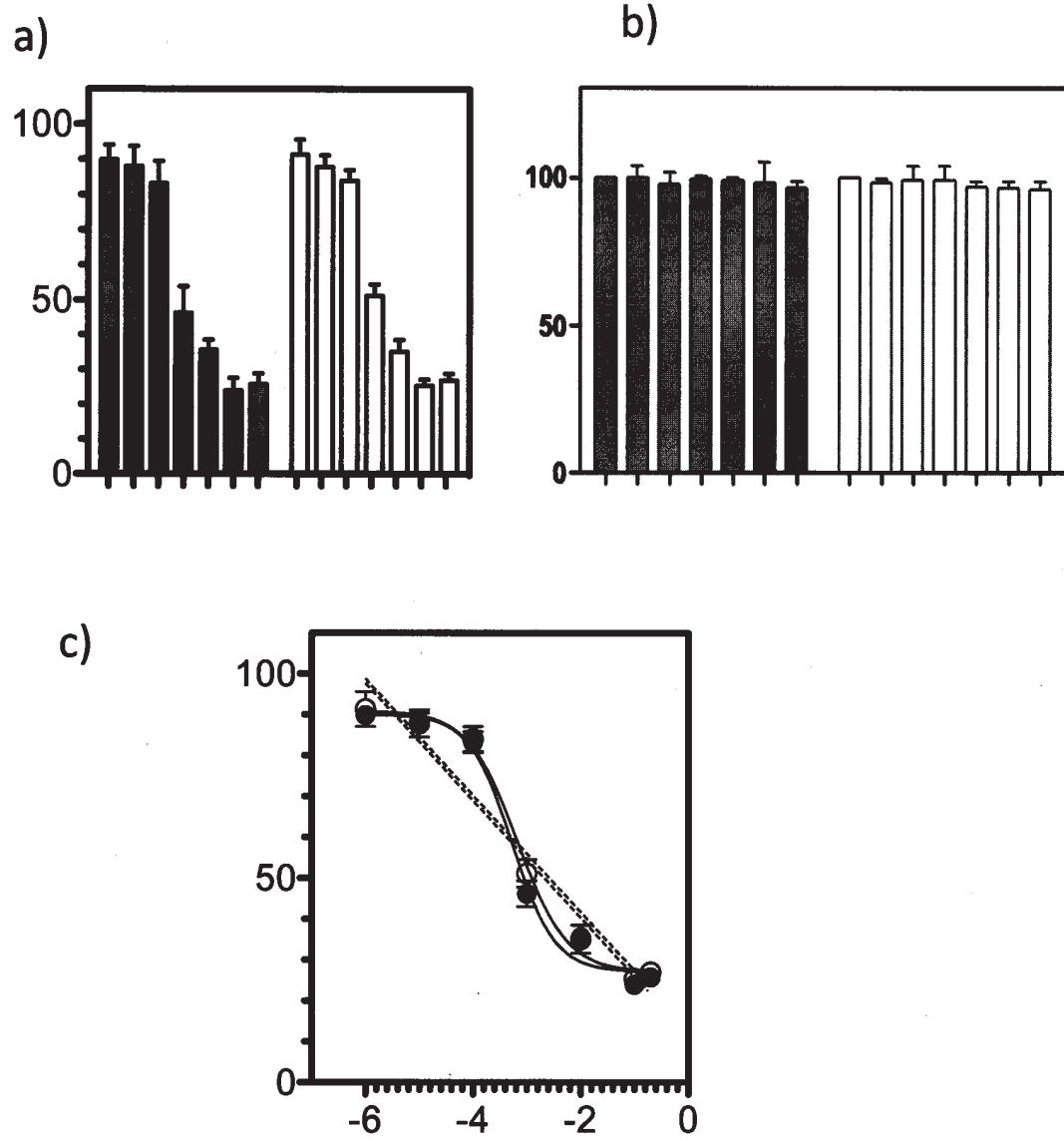


Figura 8

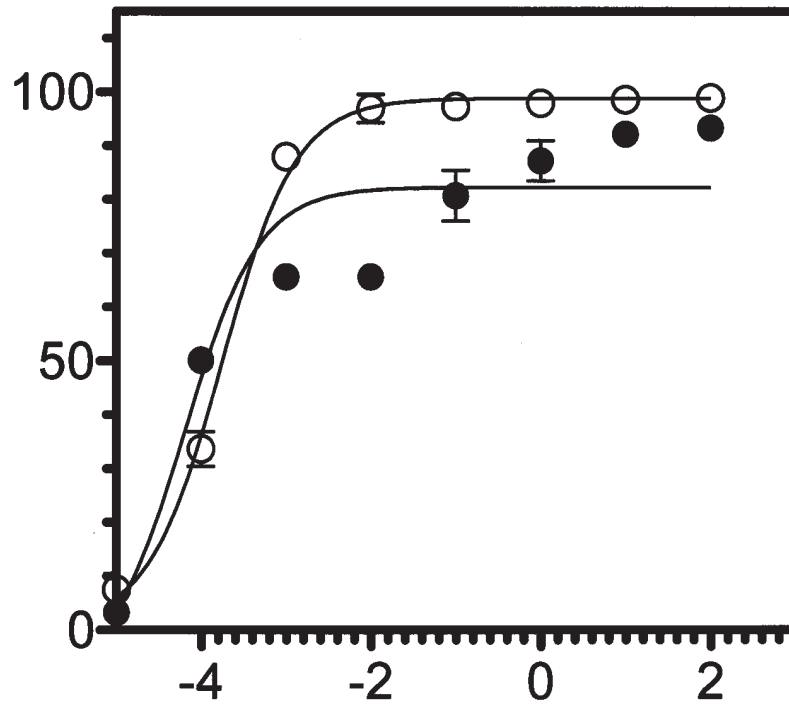


Figura 9

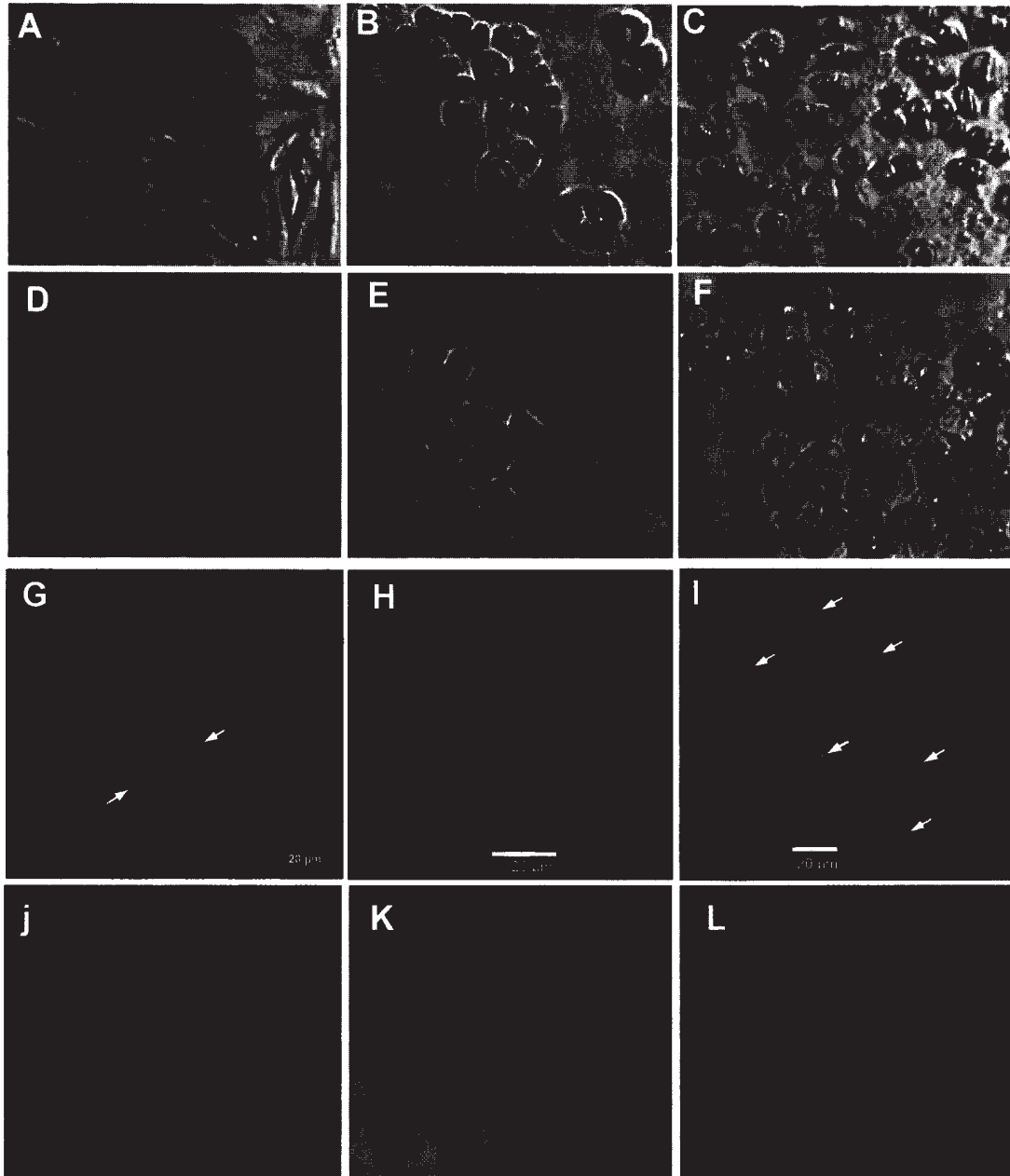


Figura 10

