



## CIENCIAS BIOMÉDICAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

### Nuevos eventos moleculares vinculados al mecanismo de acción antineoplásico del CIGB-300

Silvio E. Perea Rodríguez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5791-604X>  
Yasser Perera Negrin <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4224-0224>  
Arielis Rodríguez Ulloa <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1566-4865>  
Yassel Ramos Gómez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3508-3830>  
Mauro Rosales Menzoney <sup>2,1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1920-0064>  
Gabriel Padrón Palomares <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3308-2471>  
Evelin Caballero Menéndez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7800-6707>  
Osmany Guirola Cruz <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9987-3394>  
Alexis Musacchio Lasa <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6598-6067>  
Jorge Fernández De Cossio <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9046-8181>  
Luis J. González López <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8875-3642>  
Vladimir Besada López <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3584-7714>  
George V. Pérez Viltre <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4067-2093>  
Daylen Aguilar Noriega <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8739-2347>  
Dania M. Vázquez Blomquist <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5011-2850>  
Ailyn de la C. Ramón Sánchez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6353-5019>

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

\* Autor para la correspondencia: [silvio.perea@cigb.edu.cu](mailto:silvio.perea@cigb.edu.cu)

#### RESUMEN

**Introducción.** El CIGB-300 es un péptido antitumoral inhibidor de la fosforilación de los sustratos de la proteína quinasa CK2. El presente trabajo persigue como objetivo fundamental exponer nuevos elementos vinculados al mecanismo antineoplásico del CIGB-300 relacionados con el modo de inhibición de dicha fosforilación y la sinergia del péptido con drogas anticáncer. **Métodos.** Se realizaron ensayos de fosforilación mediada por la subunidad catalítica CK2 $\alpha$  o la holoenzima en presencia o no del CIGB-300. La interacción CIGB-300/CK2 se verificó mediante ensayos de *pull-down*, colocalización *in situ* y además se realizó un análisis fosfoproteómico en células de cáncer de pulmón tratadas con el péptido. El sinergismo del CIGB-300 y las drogas anticáncer se evaluó *in vitro* y en el caso del cisplatino también *in vivo*. Además, se realizó un estudio de proteómica comparativa de la combinación del CIGB-300 con el cisplatino. **Resultados.** El CIGB-300 interaccionó directamente con la subunidad CK2 $\alpha$  e inhibió la actividad de la holoenzima en diferentes condiciones experimentales. Asimismo, el análisis de fosfoproteómica y *Western blot* permitió conocer el perfil de inhibición temprana de CK2 por el CIGB-300 a los 10 min y 30 min. Adicionalmente, el CIGB-300 sinergizó con quimioterapéuticos e inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y se conocieron los eventos moleculares que pueden sustentar la sinergia del péptido con las drogas anticáncer estudiadas. Como conclusiones, el CIGB-300 inhibe la fosforilación me-

#### Palabras claves

CIGB-300; CK2; drogas anticáncer



diada por CK2 a través de un mecanismo alternativo de interacción directa con la enzima. Además, sinergiza con quimioterapéuticos e inhibidores del EGFR, modulando diferentes proteínas relacionadas con la resistencia a dichas drogas.

## Novel molecular events related to CIGB-300 antineoplastic mechanism of action

### ABSTRACT

**Introduction.** CIGB-300 is an antitumor peptide that inhibits the CK2-mediated phosphorylation by direct targeting of substrates. This paper aims to describe breakthroughs about the CIGB-300 antineoplastic mechanism related to the inhibition of CK2-mediated phosphorylation and the synergism with anticancer drugs. **Methods.** CK2 phosphorylation assays were performed with catalytic CK2 $\alpha$  subunit or the CK2 holoenzyme in presence or not of CIGB-300. CIGB-300/CK2 interaction was verified by pull-down experiments, in situ colocalization and phosphoproteomic analysis of CIGB-300-treated lung cancer cells were also performed. Synergism of the peptide with anticancer drugs was evaluated in vitro and for Cisplatin; it was also tested in vivo. Besides, comparative proteomics of CIGB-300 combined with Cisplatin was conducted. **Results.** CIGB-300 targeted the CK2 $\alpha$  subunit and inhibited the enzymatic activity of the holoenzyme in different experimental settings. Likewise, phosphoproteomic and Western Blot analysis allowed for knowing the early CK2 inhibition profile elicited by CIGB-300 at 10 and 30 minutes of treatment. Moreover, CIGB-300 did synergize with chemotherapeutics and EGFR inhibitors, and molecular events that reportedly support such synergistic interactions were also known. **Conclusions.** CIGB-300 inhibits the CK2-mediated phosphorylation by using an alternative mechanism of direct interaction with the enzyme itself. Besides, CIGB-300 synergizes with chemotherapeutics and EGFR inhibitors by modulating different proteins related to drug resistance.

### Keywords

CIGB-300; CK2; anticancer drugs

## INTRODUCCIÓN

La proteína quinasa CK2 se encuentra frecuentemente desregulada en células tumorales y es responsable del 20 % del fosfoproteoma celular. <sup>(1)</sup> Esta quinasa se vincula con rasgos característicos del cáncer como la proliferación exacerbada, supervivencia celular, inhibición de la apoptosis, angiogénesis, y metástasis. <sup>(2)</sup> Se han descrito hasta el momento más de 300 sustratos celulares para CK2 y modula la función de los supresores tumorales PTEN y PML, así como los oncogenes AKT y c-myc. <sup>(3-6)</sup> De igual forma, la expresión aberrante de CK2 impacta en múltiples cascadas de señalización cuya desregulación conlleva a la transformación maligna las cuales incluyen Wnt, Hh, JAK/STAT, y PI3K/AKT. <sup>(7)</sup>

La actividad enzimática de CK2 se lleva a cabo por las subunidades catalíticas CK2 $\alpha$  y CK2 $\alpha'$  por separado o unidas con el dímero de subunidades reguladoras CK2 $\beta$  para formar la holoenzima. <sup>(8)</sup> La fosforilación de los llamados sustratos clase III puede ser solo ejercida por la holoenzima, mientras los sustratos clase I pueden ser fosforilados por la holoenzima o las subunidades catalíticas individuales. <sup>(9)</sup> Los sustratos clase II son solo fosforilados por las subunidades catalíticas de CK2. <sup>(9)</sup>

La CK2 es actualmente considerada como un blanco promisorio y “drogable” en cáncer debido a las exitosas pruebas de concepto *in vitro* e *in vivo* usando moléculas químicas pequeñas inhibitoras de la actividad enzimática mediante el bloqueo del sitio de unión al ATP en la subunidad catalítica CK2 $\alpha$  o por inhibición de la interacción entre las subunidades para formar la holoenzima. <sup>(10,11)</sup> De igual forma el uso de oligonucleótidos antisentido contra la CK2 $\alpha$  ha servido para validar la perspectiva de esta enzima como blanco para el tratamiento del cáncer. <sup>(12)</sup>

El CIGB-300 es un péptido que actualmente se evalúa en la clínica y forma parte de la cartera de nuevos desarrollos farmacéuticos anticáncer del CIGB. Es un inhibidor de la fosforilación mediada por CK2 a través de su unión directa y bloqueo del dominio fosfoceptor conservado en los sustratos para dicha enzima. <sup>(13)</sup> Evidencias experimentales en líneas celulares de tumores sólidos indicaron que la proteína B23/NPM1 era un sustrato de CK2 mayoritariamente unido por el CIGB-300 en ensayos de *pull-down in vivo*. <sup>(14)</sup> Igualmente en lisados celulares el CIGB-300 une diferentes sustratos de CK2 y en células de leucemia linfocítica crónica se encontró que el CIGB-300 inhibió la fosforilación de otros sustratos como AKT y PTEN. <sup>(15,16)</sup>

Teniendo en cuenta el mecanismo descrito para el CIGB-300 y que ha sido reportado un dominio fosfoceptor en la subunidad CK2 $\beta$ ,<sup>(17,18)</sup> nos propusimos investigar si el CIGB-300 es capaz de interactuar directamente con la enzima e inhibir su actividad. Los resultados permitieron validar dicha hipótesis científica y además conocer el fosfoproteoma regulado por el CIGB-300 en células tumorales.

Como parte de la presente investigación nos propusimos además explorar la posible sinergia antineoplásica del CIGB-300 con quimioterapéuticos e inhibidores del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) brindando así una contribución a las bases moleculares que pueden sustentar la sinergia del CIGB-300 con esas drogas anticáncer.

De conjunto, el presente trabajo persigue como objetivo fundamental exponer nuevos elementos vinculados al mecanismo de acción antineoplásico del CIGB-300, relacionados con el modo de inhibición de dicha fosforilación y la sinergia del péptido con drogas anticáncer. De manera importante, los resultados obtenidos no solo tienen un impacto científico-técnico, sino que sustentan el uso racional del péptido CIGB-300 en esquemas terapéuticos combinados con la terapia estándar para el tratamiento del cáncer.

## MÉTODOS

### Ensayos radiométricos y de interacción

Las reacciones de fosforilación se realizaron con la holoenzima o la subunidad CK2 $\alpha$  usando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (6000 Ci/mmol) en presencia del CIGB-300 y los péptidos sustratos M y 29, o los sustratos recombinantes GST-Olig2 y GST-Six1. La actividad enzimática se expresa como valores directos de conteos por minuto (CPM). La interacción entre las subunidades de CK2 y el CIGB-300 se realizó por incubación de GST-CK2 $\alpha$  en ausencia o presencia del CIGB-300 (50  $\mu$ M) y se adsorbió a una matriz de glutatión-sefarosa. Seguidamente se adicionó CK2 $\beta$  y se determinó la actividad enzimática. Para la interacción en solución, la CK2 $\alpha$  se incubó por 30 min en presencia o ausencia del CIGB-300 (100  $\mu$ M) y cantidades crecientes de CIGB-300 biotinilado (CIGB-300-B) adsorbido en matriz de estreptavidina-sefarosa. Finalmente, se realizó la reacción enzimática usando el péptido 29.

### Ensayos de pull-down y colocalización *in situ*

Los ensayos de *pull-down* se realizaron usando el CIGB-300-B para capturar las diferentes proteínas de interés como CK2 $\alpha$ , AKT, PTEN, o B23/NPM1 en los lisados celulares. Las proteínas adheridas al CIGB-300 se analizaron por *Western blot*. Para la microscopía fluorescente, las células NCI-H125 se trataron a diferentes tiempos con el CIGB-300-B. Después de la fijación y permeabilizaron las células se incuba-

ron con anticuerpos anti-CK2 $\alpha$ , anti-CK2 $\beta$  o anti-B23/NPM1. Finalmente, se añadió el conjugado avidina-FITC o el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 594 y el análisis se realizó en un microscopio Confocal Leica Microsystem.

### Estudios de proteómica

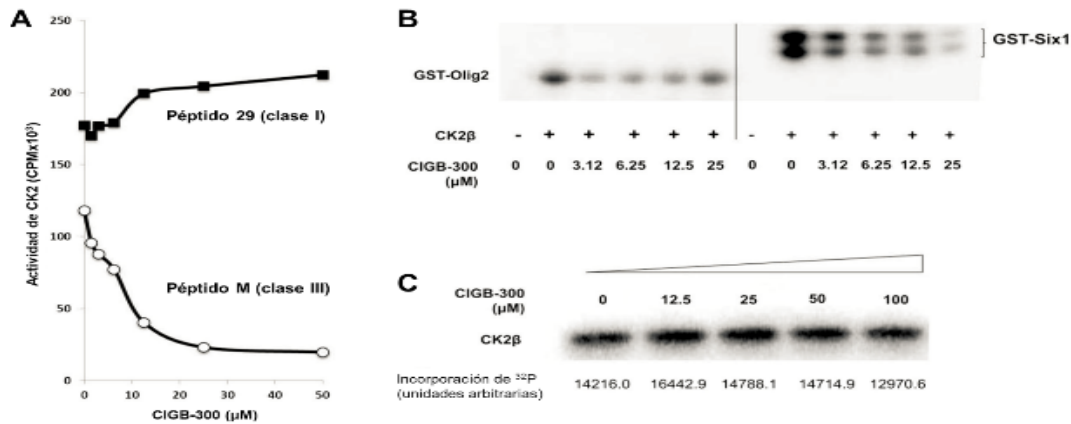
El fosfoproteoma de CK2 regulado por el CIGB-300 se exploró en células NCI-H125 tratadas o no con el CIGB-300 durante 10 y 30 minutos. Los fosfopéptidos de los extractos celulares fueron aislados por enriquecimiento mediante adherencia a matriz de TiO<sub>2</sub> y posteriormente sometidos a LC-MS/MS para su análisis de identidad. Para la proteómica comparativa, la combinación CIGB-300 (50  $\mu$ M/ml) + Cisplatino (0,5  $\mu$ M/ml) o los agentes por separados fueron incubados con las células NCI-H125 y los extractos nucleares preparados al final del tratamiento. Después del aislamiento proteico, la digestión triptica y el marcaje isotópico diferencial se realizó la identificación y cuantificación de las proteínas mediante LC-MS/MS. Los resultados muestran el factor de cambio de los niveles de cada proteína.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La investigación realizada en este trabajo se centra en responder 2 preguntas científicas esenciales dentro del mecanismo de acción del CIGB-300. En primer lugar, conocer si este péptido además de interactuar e inhibir el sitio fosfoceptor de los sustratos de CK2 era capaz de inhibir también a la propia enzima, y en segundo lugar explorar el sinergismo del CIGB-300 con drogas anticancerígenas con un acercamiento a las bases moleculares que puedan sustentar dicha sinergia.

Para despejar un posible efecto directo del CIGB-300 sobre la enzima CK2 se realizaron ensayos radiométricos de fosforilación mediada tanto por CK2 $\alpha$  (subunidad catalítica) como por la holoenzima (CK2 $\alpha$  + CK2 $\beta$ ), en presencia de dosis seriadas del CIGB-300 (figura 1).<sup>(19)</sup>

De manera interesante, al usar como sustrato al péptido M, el cual es fosforilado solo por la holoenzima CK2, se observó una marcada inhibición dosis dependiente de la actividad enzimática en presencia del CIGB-300 (figura 1a). De igual forma, otros 2 sustratos específicos para la holoenzima CK2 (GST-Olig2 y GST-Six1) fueron inhibidos también en presencia del CIGB-300 (figura 1b). Por el contrario, el péptido 29 y la calmodulina, los cuales son fosforilados fundamentalmente por las subunidades CK2 $\alpha$ , no fueron inhibidos en presencia del CIGB-300. Tampoco la autofosforilación de la subunidad reguladora de CK2 $\beta$  fue modificada en presencia de dosis seriadas del péptido lo cual sugiere que el CIGB-300 no está bloqueando ese sitio fosfoceptor en particular (figura 1c).

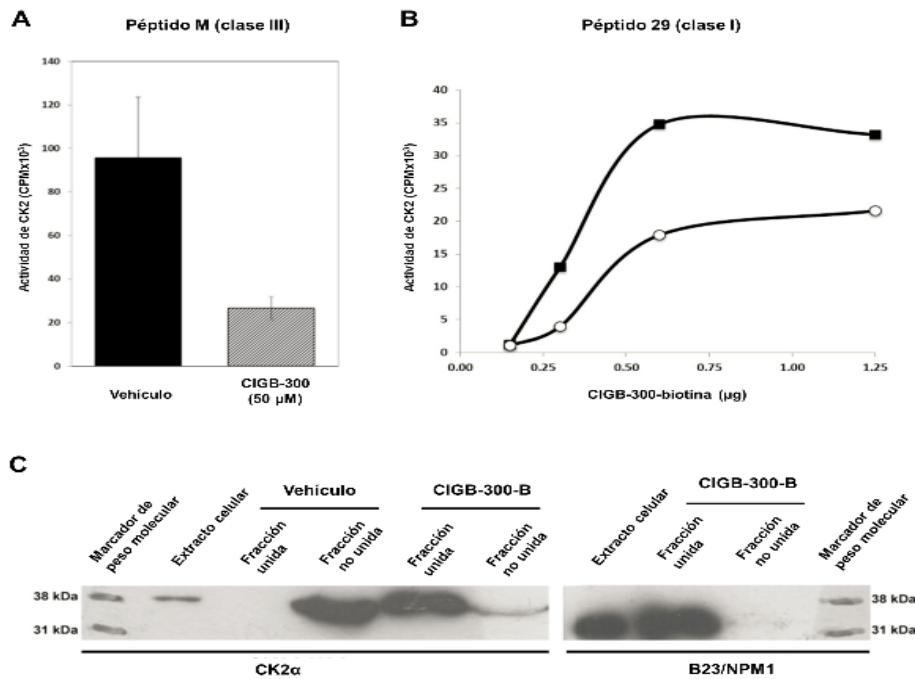


**Fig. 1.** Efecto del CIGB-300 sobre la actividad de la holoenzima CK2. Los ensayos radiométricos para la fosforilación por la holoenzima CK2 o la subunidad CK2α se realizaron usando 28 ng de estas y cantidades crecientes del CIGB-300. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 100 mM [γ-<sup>32</sup>P]-ATP (6000 Ci/mmol), así como 1 mM de los péptidos sustratos M, 29 (A), los sustratos recombinantes GST-Olig2, GST-Six1 (B), o la subunidad CK2β (C).

De esta forma el CIGB-300 inhibe la actividad enzimática de la holoenzima CK2 sin interactuar con la subunidad CK2β. De igual forma se realizaron ensayos radiométricos donde la CK2α se incubó con cantidades crecientes de CK2β en presencia o no del CIGB-300. Como esperado, la actividad enzimática de la holoenzima se incrementó de manera proporcional a la adición de la subunidad CK2β en la reacción, sin embargo, en presencia del CIGB-300 la actividad fue

inhibida.<sup>(19)</sup> Sin embargo, el péptido interactuó directamente con la subunidad CK2α tanto en solución como cuando se fijó a un soporte sólido (figura 2 A, B).<sup>(19)</sup>

En aras de corroborar esta interacción en el contexto celular se realizaron ensayos de pull-down usando el CIGB-300 biotinilado para capturar la CK2α en lisados celulares. Los resultados de la figura 2c demuestran que el CIGB-300 se unió directamente a la CK2α con más de un 90 % de captura total



**Fig. 2.** Evaluación de la interacción del CIGB-300 con CK2α. La proteína de fusión GST-CK2α (80 ng) fue incubada en ausencia o presencia del CIGB-300 (50 μM). Una vez adsorbida a una matriz de glutatión-sefarosa se añadieron 160 ng de CK2β y se determinó la actividad enzimática usando el péptido M (A). Alternativamente, la CK2α (240 ng) fue incubada en presencia o ausencia de 100 μM del CIGB-300 y cantidades crecientes de CIGB-300-B adsorbido en matriz de estreptavidina-sefarosa. Después de varios lavados, se llevó a cabo la reacción enzimática con el péptido 29 (B). Para capturar la CK2α en los lisados celulares se realizaron ensayos de pull-down con CIGB-300-B adsorbido a una matriz de estreptavidina-sefarosa. Después de varios lavados, las proteínas adheridas al CIGB-300 se analizaron por Western blot usando anticuerpos específicos contra CK2α y B23/NPM1 (C).

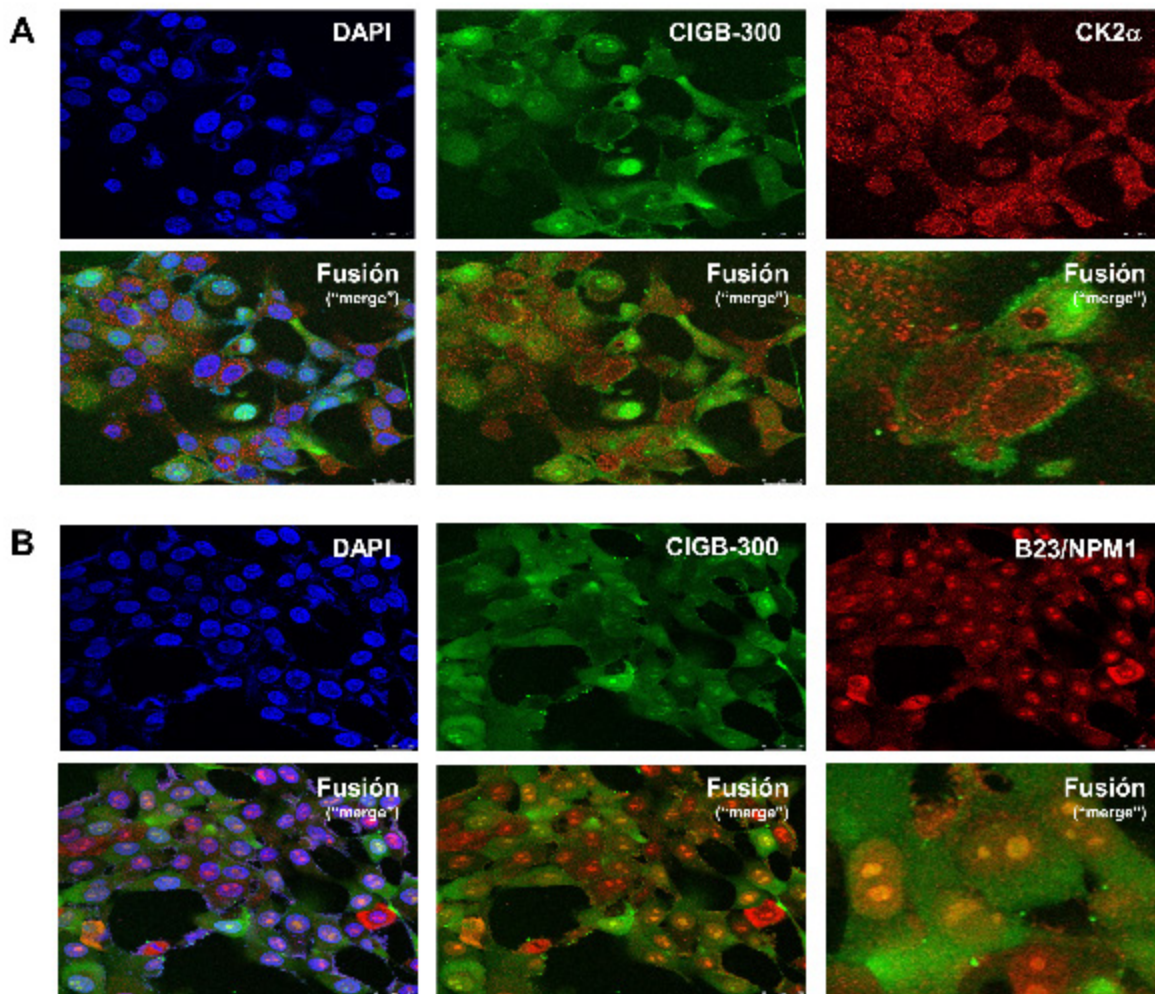


tanto en lisados de células NCI-H125 como de HPB-ALL de leucemia linfocítica aguda. <sup>(19,20)</sup> La unión del CIGB-300 a la proteína B23/NPM1 fue usada como control positivo de interacción en estos ensayos (figura 2C). <sup>(14)</sup>

Finalmente, para confirmar la proximidad física del CIGB-300 con la CK2 $\alpha$  en el contexto celular se realizaron ensayos de colocalización *in situ* mediante microscopía de fluorescencia confocal en células NCI-H125. Los resultados demostraron una evidente colocalización del CIGB-300 con la subunidad CK2 $\alpha$  en el citoplasma de las células con un aparente reforzamiento en el área perinuclear y más ligeramente dentro del área nuclear según indica la fluorescencia color naranja (figura 3A). <sup>(19)</sup> En cambio, la colocalización del CIGB-300 con B23/NPM1 usado como control positivo en esta experimentación, fue más evidente en el núcleo y nucléolos (figura 3B).

En línea con esta hipótesis hemos observado que el tratamiento de células HPB-ALL con CIGB-300 inhibió la fosforilación de 2 sustratos claves de CK2 como son AKT y PTEN sin mediar interacción directa del péptido con estos en ensayos de pull-down. <sup>(20)</sup> Este mecanismo dual de inhibición de la fosforilación mediante interacción tanto con el sustrato como con la holoenzima CK2 permiten robustecer la condición del CIGB-300 como compuesto "Primero de su Clase" y resulta un elemento distintivo respecto a otros inhibidores de CK2 y de otras quinasas. Por tal motivo, estos hallazgos constituyen parte esencial de la novedad científica de este trabajo.

Como parte de la investigación relacionada con la inhibición de la fosforilación mediada por CK2 del CIGB-300, en nuestro trabajo exploramos por primera vez el fosfoproteoma celular regulado tempranamente por este péptido. Los



**Fig. 3.** Colocalización *in situ* del CIGB-300 con CK2 $\alpha$ . Las células NCI-H125 se trataron con CIGB-300-B (50  $\mu$ M) durante 10 min y seguidamente se lavaron, fijaron y permeabilizaron. Después del bloqueo con BSA (4 %) se incubaron con anticuerpo anti-CK2 $\alpha$  (A) o anti-B23/NPM1 (B), este último usado como referencia de colocalización. Finalmente, los conjugados avidina-FITC, o anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 594 fueron añadidos. El análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica Microsystem. La tinción con DAPI (azul) se realizó para contrastar el núcleo celular.

resultados permitieron conocer el perfil global de inhibición de la fosforilación por el CIGB-300, el cual se caracterizó por una gran disminución de la fosforilación de sitios que contenían Ser en un entorno de residuos ácidos, típico de sustratos de CK2. <sup>(19)</sup> La identidad de los sustratos de CK2 a los cuales pertenecían los fosfositos inhibidos por el CIGB-300 indicó que 8 y 10 sustratos para esta quinasa fueron inhibidos a los 10 min y 30 min, respectivamente. <sup>(19)</sup> Además, el análisis bioinformático indicó que los sustratos inhibidos están involucrados en procesos como la biogénesis ribosomal, el metabolismo, procesamiento de ARN, apoptosis, expresión génica y ciclo celular, lo cual pudiera contribuir al efecto antineoplásico *in vitro* e *in vivo* del CIGB-300.

Al integrar los resultados de este trabajo podemos concluir que el CIGB-300 inhibe un conjunto de sustratos de CK2 (tabla 1) y que en el contexto celular ambos mecanismos de inhibición de CK2 por el CIGB-300 pudieran operar de manera concomitante.

La integración de los resultados nos permite proponer un modelo en el cual la inhibición de la holoenzima CK2 por el CIGB-300 se realiza por interacción directa con la subunidad CK2 $\alpha$  dando lugar a una forma "no productiva" o inactiva de dicha holoenzima. Estos resultados también refuerzan la novedad científica del trabajo por ser la primera descripción del fosfoproteoma global regulado por el CIGB-300 en células tumorales y por otro lado por brindar un panorama más amplio de la inhibición que ejerce el CIGB-300 sobre la fosforilación mediada por CK2 en el contexto celular.

Como parte del mecanismo de acción antineoplásico del CIGB-300 se investigó además la capacidad del péptido de sinergizar con algunos quimioterapéuticos de amplio uso en oncología clínica e inhibidores del EGFR. En particular, exploramos la combinación *in vitro* del CIGB-300 con el cisplatino (agente alquilante), el paclitaxel (antimitótico), la doxorubicina (antitopoisomerasa II) y el 5-fluorouracilo (antimetabolito) en células humanas de cáncer de pulmón y de cuello uterino. <sup>(21)</sup>

**Tabla 1** Relación de sustratos de CK2 inhibidos por el CIGB-300

Sustrato	Nombre	Sitio inhibido	Metodología empleada
B23/NPM1	Nucleofosmina 1	Ser125	Western Blot/Marcaje Metabólico/ Fosfoproteómica <sup>(14,19)</sup>
HDAC1	Histona deacetilasa 1	Ser393	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3 fosfatasa	Ser380	Western Blot <sup>(16,20)</sup>
AKT	Proteína quinasa B	Ser129	Western Blot <sup>(16,20)</sup>
EEF1D	Factor de elongación 1 delta	Ser162	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
USP7	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa A7	Ser18	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
STMN1	Estatmina 1	Ser16/63	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
ABCF1	Transportador ABC de la subfamilia F1	Ser109	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
PDCD5	Proteína de muerte celular programada 5	Ser119	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
PPP1R2	Inhibidor de proteína fosfatasa 2	Ser121/ Ser122	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
SEPT2	Septina 2	Ser218	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
HMGA1	Proteína del grupo de alta movilidad A1	Ser102/ Ser103	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
CDC37	Proteína co-chaperona de HSP90	Ser13	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
MYH9	Miosina 9	Ser1943	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
HSP90AB1	Proteína de choque térmico de 90 kDa	Ser255	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>
HSP90AB2P	Proteína de choque térmico de 90 kDa beta 2	Ser177	Fosfoproteómica <sup>(19)</sup>

Para determinar el tipo de interacción (sinérgica, aditiva o antagónica) se realizó un diseño de cuadrado latino donde se mezclan diferentes dosis de cada droga y el efecto sobre la viabilidad celular es cuantificado y procesado por el programa *Calculusyn* el cual a partir de análisis dosis-respuesta de las combinaciones genera parámetros farmacológicos importantes como el índice de combinación (IC). Valores de IC menor e igual que de 0,5 indica fuerte sinergismo, de 0,5 a 0,9 sinergia/aditividad, igual a 1,0 aditividad y mayor que 1,0 antagonismo. De manera interesante se observó sinergismo del CIGB-300 con el paclitaxel y el cisplatino con valores de IC de 0,30 y 0,83, respectivamente. En cambio, para la doxorubicina y el 5-fluorouracilo, el análisis indicó muy escasa sinergia y áreas de ligero antagonismo para el rango de dosis investigado. Adicionalmente, se exploró *in vivo* la combinación del CIGB-300 con el Cisplatino en un modelo preclínico de cáncer.<sup>(21)</sup> Los resultados demostraron sinergismo de efecto antitumoral significativo entre ambas drogas en términos de supervivencia de los animales con tumor. Las combinaciones más relevantes fueron: CIGB-300 (50 µg) más cisplatino (1 mg/kg) y CIGB-300 (200 µg) más cisplatino (4 mg/kg).

Por su parte, los resultados de la combinación *in vitro* del CIGB-300 con inhibidores del EGFR indicaron sinergia del péptido con el erlotinib con valores de IC de 0,54 a 0,76 para células NCI-H460 y de 0,35 a 0,83 en células A549.<sup>(22)</sup> De manera similar se pudo apreciar un incremento del efecto citotóxico de la combinación del CIGB-300 con el nimotuzumab en las dosis evaluadas en células A431.<sup>(23)</sup> De conjunto podemos asegurar que el CIGB-300 no solo es capaz de incrementar su efecto antineoplásico combinado con quimioterapéuticos sino también en presencia de inhibidores del EGFR, aspecto que robustece la novedad científica de este trabajo.

Finalmente nos propusimos investigar las bases moleculares que sustentan el sinergismo entre el CIGB-300 y las drogas anticancerígenas. En este sentido, los resultados observados anteriormente que refieren inhibición de la fosforilación por CK2 en PTEN y AKT por el CIGB-300 sirven de soporte molecular para sustentar el sinergismo antineoplásico del CIGB-300 tanto con los quimioterapéuticos como con los inhibidores del EGFR, pues se conoce que dicho evento bioquímico en ambos sustratos juega un rol crucial en la resistencia tumoral.<sup>(24)</sup>

Adicionalmente se exploró mediante proteómica comparativa el proteoma de células NCI-H125 en presencia de la combinación CIGB-300 más cisplatino y cada agente por separado. Como resultado se logró identificar un total de 28 proteínas vinculadas con la resistencia al cisplatino cuyos niveles resultaron modificados por la combinación de este con el CIGB-300 (tabla 2).<sup>(25)</sup>

Como se ha descrito por otros autores el factor transcripcional NF-kB juega un papel esencial como mediador de la

resistencia al Cisplatino y otros quimioterapéuticos.<sup>(26,27)</sup> Teniendo en cuenta tales antecedentes nos propusimos evaluar cómo impactaría el CIGB-300 en los niveles de dicho factor en el contexto de un fenotipo de resistencia adquirida al Cisplatino en células de cáncer de pulmón. Con ese propósito se generó, a partir de las células parentales A549, una sublínea denominada A549-cispR, las cuales desarrollaron un fenotipo resistente al Cisplatino mediante exposición crónica *in vitro* a esa droga. Los resultados obtenidos demostraron que la sublínea A549-cispR tenía niveles intrínsecos del factor NF-kB más elevados que la línea celular parental los cuales fueron reducidos por el CIGB-300. Además, la sensibilidad de esta línea al CIGB-300 fue mayor que la observada en la parental.<sup>(28)</sup>

De conjunto, los resultados obtenidos aportan un grupo de eventos moleculares modulados por el CIGB-300 los cuales pudieran contribuir a las bases moleculares que soportan la sinergia y aditividad con otros quimioterapéuticos ampliamente usados en oncología clínica como el paclitaxel y el cisplatino, así como con inhibidores del EGFR como el erlotinib y el nimotuzumab, los cuales han probado demostrada eficacia en el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos. Estos hallazgos pueden tener un impacto científico-técnico y social en cuanto a la posibilidad de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer basadas en combinaciones del CIGB-300 con dichas drogas.

## Conclusiones

Los aportes científicos generados de la presente investigación se pueden resumir de la siguiente forma:

El CIGB-300 interacciona directamente con la subunidad CK2α e inhibe la actividad enzimática de la holoenzima dando lugar a un mecanismo dual de inhibición no previamente descrito para otros inhibidores de CK2 y de otras proteínas quinasas.

El fosfoproteoma de CK2 regulado por el CIGB-300 se caracterizó por la inhibición de la fosforilación de varios sustratos de CK2 vinculados con procesos celulares relevantes en cáncer como la biogénesis ribosomal, el metabolismo exacerbado y procesamiento de ARN, la apoptosis, la expresión génica y ciclo celular.

El CIGB-300 sinergiza con el paclitaxel, el cisplatino, e inhibidores del EGFR, lo cual es un elemento de gran valor para la práctica médica en particular para el diseño de futuros estudios clínicos del CIGB-300 en cáncer.

La inhibición por el CIGB-300 de la fosforilación de PTEN y AKT, así como la reducción de los niveles de NF-kB y la modulación de un conjunto de proteínas vinculadas con la resistencia al cisplatino, constituyen las bases moleculares que pueden sustentar la sinergia del péptido con quimioterapéuticos y con inhibidores del EGFR.

**Tabla 2** Proteínas relacionadas con el fenotipo de resistencia al cisplatino que cambiaron sus niveles en presencia de la combinación con CIGB-300

Uniprot_ID	Proteína	FC: CIGB-300 + cisplatino vs. control	Expresión en células resistentes al cisplatino
P00558	Fosfoglicerato quinasa 1	0	Elevada
P38919	Factor eucarionte de iniciación 4A-III	0	Elevada
P22626	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear A2/B1	0,1	Elevada
P09429	Proteína de alta movilidad B1	0,1	Elevada
Q09028	Proteína de unión a histona RBBP4	0,1	Elevada
P62888	Proteína ribosomal 60S L30d	0,1	Elevada
P33991	Componente del complejo de mantenimiento de minicromosomas 4	0,1	Elevada
Q02952	Proteína de anclaje de A-quinasa 12	0,1	Elevada
Q15233	Proteína NonO	0,1	Elevada
P08670	Vimentina	0,2	Elevada
Q04695	Citoqueratina 17	0,2	Elevada
P08107	Proteína de choque térmico de 70kDa 1A	0,2	Elevada
P21291	Proteína rica en cisteína y glicina 1	0,2	Elevada
P11142	Proteína de choque térmico de 71 kDa	0,2	Elevada
P13073	Citocromo C oxidasa subunidad 4 (isoforma 1, mitocondrial)	0,2	Elevada
Q15149	Plectina	0,3	Elevada
P60709	Actina, citoplasmática 1	0,3	Elevada
P0C0S5	Histona H2A.Z	0,3	Elevada
P51858	Factor de crecimiento derivado de hepatoma	0,3	Elevada
P07910	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear C1/C2	0,3	Elevada
Q96PK6	Proteína de unión al ARN 14	0,3	Elevada
Q03252	Lamina B2	0,3	Elevada
P52272	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear M	0,3	Elevada
P09382	Galectina 1	0,3	Elevada
P04264	Queratina 1	3,3	Disminuida
P47756	Proteína CapZ beta	3,6	Disminuida
P31946	Proteína 14-3-3 beta/alfa	8,2	Elevada/Disminuida
Q15070	Proteína de la membrana mitocondrial interna OXA1L	42,3	Disminuida

FC: Factor de cambio

## Agradecimientos

Agradecemos a Lorena G. Caligiuri, Norailys Lorenzo, Florencia Gottardo, Hernán G. Farina, Odile Filhol, Claude Cochet, Joao Barata, Estefano Cirigliano y Alejandro Ultreguer como colaboradores directos de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Salvi M, Cesaro L, Pinna LA. Variable contribution of protein kinases to the generation of the human phosphoproteome: a global weblogo analysis. *Biomolecular Concepts*. 2010;1(2):185-95.
- Ruzzene M, Pinna LA. Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1804(3):499-504.
- Barata JT. The impact of PTEN regulation by CK2 on PI3K-dependent signaling and leukemia cell survival. *Advances in Enzyme Regulation*. 2011;51(1):37-49.
- Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell*. 2006;126(2):269-83.
- Di Maira G, Salvi M, Arrighoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, et al. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12(6):668-77.



6. Channavajhala P, Seldin DC. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene*. 2002;21(34):5280-8.
7. Chua MM, Ortega CE, Sheikh A, Lee M, Abdul-Rassoul H, Hartsorn KL, et al. CK2 in Cancer: Cellular and Biochemical Mechanisms and Potential Therapeutic Target. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). 2017;10(1).
8. Pinna LA. Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 20):3873-8.
9. Núñez de Villavicencio-Díaz T, Mazola Y, Perera Negrín Y, Cruz García Y, Guirola Cruz O, Perea Rodríguez SE. Predicting CK2 beta-dependent substrates using linear patterns. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2015;4:20-7.
10. Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE, et al. CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Research*. 2010;70(24):10288-98.
11. Laudet B, Barette C, Dulery V, Renaudet O, Dumy P, Metz A, et al. Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction. *The Biochemical Journal*. 2007;408(3):363-73.
12. Slaton JW, Unger GM, Sloper DT, Davis AT, Ahmed K. Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Molecular Cancer Research*. 2004;2(12):712-21.
13. Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo NS, Torrens I, et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Research*. 2004;64(19):7127-9.
14. Perera Y, Farina HG, Gil J, Rodríguez A, Benavent F, Castellanos L, et al. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(5):1189-96.
15. Perea SE, Baladrón I, García Y, Perera Y, López A, Soriano JL, et al. CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phosphoacceptor domain. *Translational and clinical research. Molecular and Cellular Biochemistry*. 2011;356(1-2):45-50.
16. Martins LR, Perera Y, Lúcio P, Silva MG, Perea SE, Barata JT. Targeting chronic lymphocytic leukemia using CIGB-300, a clinical-stage CK2-specific cell-permeable peptide inhibitor. *Oncotarget*. 2014;5(1):258-63.
17. Boldyreff B, James P, Staudenmann W, Issinger OG. Ser2 is the autophosphorylation site in the beta subunit from bicistronically expressed human casein kinase-2 and from native rat liver casein kinase-2 beta. *European Journal of Biochemistry*. 1993;218(2):515-21.
18. Pagano MA, Sarno S, Poletto G, Cozza G, Pinna LA, Meggio F. Autophosphorylation at the regulatory beta subunit reflects the supramolecular organization of protein kinase CK2. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005;274(1-2):23-9.
19. Perera Y, Ramos Y, Padrón G, Caballero E, Guirola O, Caligiuri LG, et al. CIGB-300 anticancer peptide regulates the protein kinase CK2-dependent phosphoproteome. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2020;470(1-2):63-75.
20. Perera Y, Melão A, Ramón AC, Vázquez D, Ribeiro D, Perea SE, et al. Clinical-Grade Peptide-Based Inhibition of CK2 Blocks Viability and Proliferation of T-ALL Cells and Counteracts IL-7 Stimulation and Stromal Support. *Cancers* (Basel). 2020;12(6).
21. Perera Y, Toro ND, Gorovaya L, Fernandez DECJ, Farina HG, Perea SE. Synergistic interactions of the anti-casein kinase 2 CIGB-300 peptide and chemotherapeutic agents in lung and cervical preclinical cancer models. *Molecular and Clinical Oncology*. 2014;2(6):935-44.
22. Perea SE, Perera Y, Baladrón I, González L, Benavent F, Fariña HG, et al. CIGB-300: a promising anti-casein kinase 2 (CK2) peptide for cancer targeted therapy. *Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States: Springer*; 2015:281-98p.
23. Perea SE, Baladrón I, Valenzuela C, Perera Y. CIGB-300: A peptide-based drug that impairs the Protein Kinase CK2-mediated phosphorylation. *Seminars in Oncology*. 2018;45(1-2):58-67.
24. Borgo C, Ruzzene M. Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38(1):287.
25. Arielis R-U, Yassel R, Aniel S-P, Yasser P, Alexis M-L, Jorge F-d-C, et al. The Combination of the CIGB-300 Anticancer Peptide and Cisplatin Modulates Proteins Related to Cell Survival, DNA Repair and Metastasis in a Lung Cancer Cell Line Model. *Current Proteomics*. 2019;16(4):338-49.
26. Jones DR, Broad RM, Madrid LV, Baldwin Jr AS, Mayo MW. Inhibition of NF- $\kappa$ B sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2000;70(3):930-6.
27. Mabuchi S, Ohmichi M, Nishio Y, Hayasaka T, Kimura A, Ohta T, et al. Inhibition of NF $\kappa$ B increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(22):23477-85.
28. Cirigliano SM, Díaz Bessone MI, Berardi DE, Flumian C, Bal de Kier Joffé ED, Perea SE, et al. The synthetic peptide CIGB-300 modulates CK2-dependent signaling pathways affecting the survival and chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Cell International*. 2017;17:42.

---

Recibido: 17/06/2021

Aprobado: 23/09/2021

---

#### Conflicto de intereses

No existen conflictos de intereses que declarar.

#### Contribución de los autores

Conceptualización: Silvio E. Perea Rodríguez, Yasser Perera Negrín  
 Curación de datos: Arielis Rodríguez Ulloa, Mauro Rosales Menzoney, Vladimir Besada López, Osmany Guirola Cruz  
 Adquisición de fondos: Silvio E. Perea Rodríguez, Yasser Perera Negrín  
 Investigación: Mauro Rosales Menzoney, George V. Pérez Viltre, Daylen Aguilar Noriega, Dania M. Vázquez Blomquist, Ailyn de la C. Ramón Sánchez  
 Metodología: Yassel Ramos Gómez, Gabriel Padrón Palomares, Alexis Musacchio Lasa, Luis J. González López, Vladimir Besada López  
 Administración del proyecto: Silvio E. Perea Rodríguez  
 Software: Osmany Guirola Cruz, Jorge Fernández De Cossio

Supervisión: Silvio E. Perea Rodríguez

Redacción-borrador original: Silvio E. Perea Rodríguez, Yasser Perera Negrín

Redacción-revisión y edición: Mauro Rosales Menzoney

#### **Financiación**

La investigación realizada fue financiada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

#### **Cómo citar este artículo**

Perea Rodríguez SE, Perera Negrin Y, Rodríguez Ulloa A, Ramos Gómez Y, *et al.* Nuevos eventos moleculares vinculados al mecanismo de acción antineoplásico del CIGB-300. An Acad Cienc Cuba [internet] 2022 [citado en día, mes y año];12(2):e1110. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1110>

