



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 342 252**

② Número de solicitud: 200803728

⑤ Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **29.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**02.07.2010**

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Zaragoza**  
**Plaza Campus San Francisco**  
**Edificio Interfacultades, 1 Planta**  
**c/ Pedro Cerbuna, 12**  
**50009 Zaragoza, ES**

⑱ Inventor/es:  
**Álava Martínez de Contrasta, María Ángeles;**  
**Iturralde Navarro, María;**  
**Iñarrea Lasheras, Pedro y**  
**Aguiló Anento, Juan Ignacio**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Proteína SOD1 truncada y método de detección de células tumorales.**

㉑ Resumen:

Proteína SOD1 truncada y método de detección de células tumorales.

Proteína truncada derivada de la proteína superóxido dismutasa 1 (SOD1). La proteína SOD1 truncada tiene una masa molecular relativa (Mr) de entre 13,5 y 14,5 KDa. Asimismo, un método para detectar la proteína SOD1 truncada y para detectar células tumorales con un índice de proliferación (IP) menor de 0.8 teniendo en cuenta la relación entre el tiempo de proliferación de las células de la muestra respecto del tiempo de proliferación de células tumorales de referencia.

ES 2 342 252 A1

## DESCRIPCIÓN

Proteína SOD1 truncada y método de detección de células tumorales.

5 La presente invención se refiere a una proteína truncada derivada de la proteína superóxido dismutasa 1 (SOD1). La proteína SOD1 truncada tiene una masa molecular relativa (Mr) de entre 13,5 y 14,5 KDa. Asimismo, la presente invención también se refiere a un método para detectar la proteína SOD1 truncada y para detectar células tumorales con un índice de proliferación (IP) menor de 0.8 teniendo en cuenta la relación entre el tiempo de proliferación de las células de la muestra respecto del tiempo de proliferación de células tumorales de referencia.

10

### Estado de la técnica anterior

15 Las enzimas “superóxido dismutasa” (SOD) constituyen una familia de metaloproteínas pertenecientes al grupo de antioxidantes celulares que tienen como función principal la eliminación de aniones superóxido generados en la célula como consecuencia de su metabolismo o como resultado de tratamientos celulares externos. La principal proteína SOD es la Cu,Zn-SOD o SOD1, tradicionalmente ubicada en el citosol, aunque recientemente se ha descrito su presencia en el espacio mitocondrial intermembranal, en el que parece desempeñar un papel importante en la depuración de los aniones superóxidos generados en la función respiratoria (Iñarra *et al.* (2007). *Biochem. J.* 405: 173-9).

20

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se han considerado como moléculas citotóxicas perjudiciales durante décadas. Además, los ROS se han convertido en agentes capaces de promover la iniciación de tumores y su posterior progresión. La mayor parte de las células cancerosas parecen tener aumentados sus niveles de ROS en lo que respecta a las células normales. Se ha documentado que los procesos de metástasis están favorecidos en ausencia de Cu, ZnSOD (Tanaka *et al.* (1997). *Int J Cáncer* 73(2): 187-192).

25

Previamente se ha descrito que la ausencia de SOD1 causa la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Hirano *et al.* (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276(1) 52-56) así como un aumento en la incidencia de procesos neoplásicos (Elchuri *et al.* (2005). *Oncogene* 24(3):367-380). Por otra parte, se ha descrito que las mutaciones o truncamientos en el gen SOD1 causan el 25% de los casos de ELA (Ghanashyam *et al.* (2005). *Neurobiology of disease* 21(1): 194-205). También se han relacionado niveles altos de SOD1 en suero con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de estómago, tanto en etapas tempranas como avanzadas (Lin *et al.* (2002). *Japanese journal of cancer research* 93(10): 1071-1075).

30

35 Reciben el nombre de linfoma un grupo de tipos de cáncer que comienzan en el sistema linfático. Se calcula que por cada 100.000 habitantes un 7,7 por ciento de hombres y un 5,2 por ciento de mujeres sufren linfoma, y se estima que la incidencia del linfoma aumenta entre un 3 y un 4% cada año. Los linfomas son una enfermedad clínicamente heterogénea, existiendo más de 35 tipos de linfomas que se dividen en dos categorías principales: linfoma de Hodgkin y todos los demás linfomas, denominados linfomas no Hodgkin.

40

A pesar de la incidencia del linfoma en los países industrializados, la etiología de la mayoría de los linfomas es desconocida, pudiendo existir diferentes rutas moleculares afectadas. En este sentido, se ha relacionado una menor expresión de SOD1 durante el proceso de diferenciación de células leucémicas (Hiroyuki Saito *et al.* (1989). *FEBS Letters* 249(2): 253-256).

45

En la actualidad, la mayoría de los tratamientos empleados son aproximaciones no específicas a cada tipo de linfoma o alteración molecular, sino tratamientos generales basados en la quimioterapia o la radioterapia. Hasta la fecha actual no se han descrito proteínas o biomarcadores que permitan discriminar entre diferentes actividades proliferativas de células tumorales.

50

### Explicación de la invención

55 La presente invención se refiere a una proteína derivada de la proteína SOD1 de células T leucémicas de humanos, que presenta un truncamiento que consiste en la reducción de la masa molecular relativa (Mr) de entre 1,5 y 2,5 KDa respecto de la SOD1 completa. La proteína SOD1 truncada tiene una (Mr) de entre 13,5 y 14,5 KDa. La proteína truncada se localiza en células tumorales que tienen un tiempo de proliferación menor que las células tumorales de referencia. Estas células tumorales de referencia expresan una proteína SOD1 que tiene una Mr de 16 KDa. Asimismo, la presente invención también se refiere a un método para detectar la proteína SOD1 truncada y para detectar células tumorales con un índice de proliferación (IP) menor de 0.8 teniendo en cuenta la relación entre el tiempo de proliferación de las células de la muestra respecto del tiempo de proliferación de células tumorales de referencia (ver más adelante). El método de detección es reproducible, con alta sensibilidad, especificidad y sencillez.

60

65 Se entiende como tiempo de proliferación el tiempo necesario para la duplicación del número de células. Las células tumorales de referencia expresan una proteína SOD1 con Mr de 16 KDa y se seleccionan dependiendo del tipo de células tumorales que se desean detectar. Así pues, si se desean detectar células tumorales leucémicas, las células tumorales de referencia han de ser células tumorales leucémicas del mismo tipo.

## ES 2 342 252 A1

Según la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), la enzima superóxido dismutasa, SOD (EC 15.1.1), es una oxidoreductasa (EC 1), que tiene como aceptor al ión superóxido  $O_2^{\bullet-}$  (EC 1.15). El nombre sistemático de la proteína es el de superóxido oxidoreductasa. La SOD cataliza la reacción:  $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ = O_2 + H_2O_2$ .

Los nombres de la superóxido dismutasa aceptados son: superóxido dismutasa, cobre-zinc superóxido dismutasa, Cu-Zn superóxido dismutasa, ferrisuperóxido dismutasa, superóxido dismutasa I, superóxido dismutasa II, SOD, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD, SODF, SODS, SOD-1, SOD-2, SOD-3, SOD-4, hemocupreína, eritrocupreína, citocupreína, cupreína o hepatocupreína.

En humanos existen tres formas de superóxido dismutasa; SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en las mitocondrias y SOD3 en el líquido extracelular. La primera es un dímero (consiste en dos subunidades), mientras que las otras son tetrámeros (cuatro subunidades). SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo. El gen que codifica para la proteína SOD1 se encuentra localizado en el cromosoma 21 (21q22.1).

La enzima SOD1 también se conoce como superóxido dismutasa I, cobre-zinc superóxido dismutasa o Cu,Zn-SOD. La proteína SOD1 es un homodímero de masa molecular relativa (Mr) 32,5 kDa (se detectan las dos subunidades en una misma banda de alrededor de 16 kDa). Las dos subunidades están unidas por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Los ligandos de cobre y zinc son cadenas laterales de histidina.

La proteína SOD1 de *Homo sapiens* tiene 154 aminoácidos, su número de acceso (*Accesión number*) es CAG46542 (para la secuencia aminoacídica). El número de acceso en el EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) es CR541742.1 (para su secuencia nucleotídica).

En la presente invención se detecta la proteína SOD1 en células Jurkat, una leucemia humana tipo T, y se compara con la proteína SOD1 en linfocitos de sangre periférica (PBL) obtenidos de un individuo sano. Además, se estudia la correspondiente expresión de isoformas de SOD1 en dos sublíneas celulares (Jhp y Jws), que se han seleccionado a partir de las células Jurkat parentales (células de referencia), mediante el cultivo continuado a altas densidades celulares (Jhp) y en un medio modificado carente de suero fetal bovino (SFB) (Jws). Estas sublíneas presentan un fenotipo tumoral con un IP menor de 0.8 (ver más adelante).

La detección de la proteína de la presente invención, asociada a una mayor capacidad de proliferación (respecto de células de referencia) y mayor resistencia a la apoptosis inducida por drogas, podría ser de interés en el futuro diagnóstico y tratamiento de este tipo de patologías de características tumorales más agresivas. Mediante la detección de proteínas de la presente invención en células tumorales se pueden identificar células tumorales con alta capacidad de proliferación que dan lugar a patologías tumorales más agresivas y, de este modo, se podrían llevar a cabo tratamientos más eficaces en un momento clave en la evolución de la enfermedad, crítico para la supervivencia de la persona que la padece.

En este sentido, un aspecto de la presente invención es una proteína que consiste en una isoforma de la proteína SOD1 con una masa molecular relativa (Mr) de entre 13,5 y 14,5 kDa (en adelante, proteína de la presente invención o proteína de la invención).

Otro aspecto de la presente invención es un método para la detección de la proteína de la invención que comprende:

- a. Obtener una muestra biológica aislada,
- b. obtener el extracto celular de la muestra biológica del apartado (a) y separar las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas,
- c. añadir anticuerpos anti-SOD1 (Ac1) unidos a un compuesto marcador, al soporte del apartado (b) y
- d. detectar la proteína según la reivindicación 1 mediante la adición de un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente al producto obtenido en el apartado (c).

La muestra biológica aislada puede proceder de cualquier tipo de tejido biológico de un animal, ya sea de un tumor o neoplasia o de cualquier otra muestra no tumoral. Preferiblemente la muestra biológica aislada comprende células tumorales. Preferiblemente el animal es un mamífero.

El extracto celular se obtiene por lisis de las células presentes en la muestra y las proteínas presentes en el extracto celular han de separarse en un medio de soporte que sea capaz de retenerlas. La separación proteica se hace bien por cromatografía o bien por electroforesis.

Mediante las técnicas cromatográficas se pueden separar moléculas en función de sus cargas, tamaños, masas moleculares, a través de la polaridad de sus enlaces o sus potenciales redox, entre otros. La técnica cromatográfica se selecciona de la lista que comprende cromatografía de líquidos (Cromatografía de reparto, C. de adsorción, C. de exclusión o C. de intercambio iónico), cromatografía de gases o cromatografía de fluidos supercríticos.

## ES 2 342 252 A1

La electroforesis es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula viene dado por su movilidad electroforética y ésta por la carga, tamaño y forma de la misma. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico.

Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. La electroforesis se selecciona de la lista que comprende electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional. Preferiblemente la electroforesis se lleva a cabo en gel de poliacrilamida (PAGE). La electroforesis PAGE se selecciona de la lista que comprende SDS-PAGE, PAGE no desnaturizante o PAGE desnaturizante.

El soporte capaz de retener tanto las proteínas de la invención como las proteínas SOD1 debe permitir el movimiento de las mismas a su través. El soporte debe tener poros de tamaño controlable. Así pues, el soporte es preferentemente no restrictivo (en los que el entramado no interfiere en la migración en el caso de que el tamaño de las proteínas sea muy pequeño en comparación con el tamaño de poro del soporte), en este caso, la separación depende de la densidad de carga de las moléculas. El soporte puede ser, pero sin limitarse, de agar-agar, almidón o poliacrilamida.

Una vez acabada la electroforesis, se practica en el gel un canal paralelo a la dirección de migración en el que se deposita un antisuero que contenga anticuerpos específicos frente a la proteína SOD1. El gel se incuba a una temperatura de entre 15 y 28°C durante 24-48 horas. Los anticuerpos y las proteínas difunden si se encuentran en la proporción adecuada, produciendo precipitados de los complejos SOD1-anticuerpo insolubles. Una vez formadas las bandas de precipitación, el gel puede lavarse para eliminar las proteínas que no hayan inmunoprecipitado y, posteriormente, teñirse o añadirse un sustrato en el caso de que el anticuerpo empleado esté marcado (tal como se describe más adelante).

Una vez separadas las proteínas, y antes de la detección, las proteínas también pueden ser transferidas a un soporte diferente donde pueden ser detectadas. En este caso el soporte es, preferentemente, acetato de celulosa.

Los anticuerpos anti-SOD1 (Ac1) pueden ser policlonales o monoclonales. Estos anticuerpos reconocen tanto a la proteína SOD1 como a la proteína de la presente invención con lo que se simplifica el método de detección ya que permite detectar ambos tipos de proteína con el mismo anticuerpo.

El anticuerpo Ac1 unido a un compuesto marcador, tal como se entiende en la presente invención, es un anticuerpo conjugado con un compuesto capaz de reaccionar con algún sustrato, de forma que se derive de ello una detección cromogénica, fluorogénica y/o quimioluminiscente. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Un ejemplo de compuesto susceptible de ser detectado es la enzima fosfatasa alcalina. Preferiblemente el sustrato indicador es cromogénico, como por ejemplo, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP), nitro azul tetrazolio (NBT) o *iodoblu tetrazolium* (IBT), o cualquiera de las combinaciones de NBT o IBT con BCIP, sin limitación de utilizar otros sustratos.

En el caso de emplear un sustrato cromogénico, la presencia de proteína SOD1 o de la proteína de la presente invención en la muestra se evidencia por la aparición de un color cuya intensidad varía directamente con el número de moléculas de las proteínas anteriores unidas a los anticuerpos Ac1 y su cuantificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por medio de espectrofotometría. Si se emplea un sustrato fluorogénico la detección y cuantificación se realiza por medio de fluorimetría y si el sustrato es quimioluminiscente, la señal se puede cuantificar por medio de un luminómetro.

La proteína de la invención se detecta, tal como se ha descrito anteriormente, mediante la adición de un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente al producto obtenido en el apartado (c) del método donde reacciona con alguno de los compuestos del producto y da lugar a un compuesto diferente del sustrato y que a su vez es detectable. Una vez detectada la proteína, se debe determinar su Mr, comparando su migración con la migración de una proteína control que se detecte de forma simultánea, preferiblemente en el mismo soporte, que tiene un tamaño conocido.

Otro aspecto más de la presente invención es un método de detección de células tumorales con un índice de proliferación (IP) menor de 0.8 que incluye los apartados (a)-(d) según el aspecto anterior, y que además comprende:

e. comparar la Mr de la proteína del apartado (d) con la Mr de una proteína SOD1 de referencia y

f. asignar la diferencia de Mr del apartado (e) a la presencia de células tumorales con un IP menor de 0.8.

Preferiblemente las células tumorales de la muestra son de un animal. Más preferiblemente las células son de mamífero.

## ES 2 342 252 A1

El término “índice de proliferación” (IP), tal como se entiende en la presente invención, hace referencia a la relación entre el tiempo necesario para la duplicación de un tipo determinado de células respecto del tiempo de proliferación de células de referencia. Las células tumorales de referencia expresan una proteína SOD1 con Mr de 16 KDa y se seleccionan dependiendo del tipo de células tumorales que se deseen detectar. Así pues, si se desean detectar células tumorales leucémicas, las células tumorales de referencia han de ser células tumorales leucémicas del mismo tipo.

El índice de proliferación (IP) se definió como;

$$\text{IP} = \frac{\text{tiempo de proliferación de las células de la muestra}}{\text{tiempo de proliferación de las células de referencia.}}$$

Las células de referencia de los ejemplos de la presente invención son células T leucémicas Jurkat aisladas *in vitro* procedentes de humanos. Tal como se ha descrito anteriormente, las células Jurkat de referencia tienen un tiempo de proliferación de 24 horas. Las células Jhp tienen un tiempo de proliferación de 12 horas (su IP es de 0,5). Las células Jws tienen un tiempo de proliferación de 18 horas (su IP es de 0,75). Además, las células con un IP menor de 0.8 sobreviven a densidades celulares de entre 3 (Jws) y 5 (Jhp) veces las de la leucemia parental Jurkat (1-1.5 millón de células/ml de cultivo).

La proteína de referencia es SOD1, que tiene una masa molecular relativa (Mr) de 16 KDa. Esta proteína se encuentra en las células con metabolismo normal y también en células tumorales de referencia. El método de la presente invención presenta una ventaja que se basa en que, mediante la utilización de los mismos anticuerpos anti-SOD1, se pueden detectar tanto la proteína SOD1 normal como la proteína de la invención (SOD1 truncada). Por tanto, se detectan de forma simultánea y de este modo se puede comparar la masa molecular relativa de ambas. Para ello se compara el valor Rf de la proteína de la invención con el de proteína SOD1 de referencia cuyo Mr se conoce. El Rf se define como el cociente entre la distancia que migra una determinada proteína y la distancia que migra el frente del gel. El frente del gel se determina por la posición de un compuesto de referencia de movilidad máxima, como por ejemplo, pero sin limitarse, el colorante azul de bromofenol.

La Masa molecular relativa (Mr) se refiere a la masa de un mol de moléculas, es decir, la masa de  $6,02 \cdot 10^{23}$  moléculas de una misma sustancia e indica las veces que es más pesada una molécula de una sustancia respecto de la unidad de masa atómica (u.m.a.) o de 1 Dalton (Da), que corresponde a la Mr del átomo de hidrógeno. Así, la Mr de la proteína SOD1 es de 16.000 Da, es decir, que es 16.000 veces más pesada que un átomo de hidrógeno o que tiene la misma masa que 16.000 átomos de hidrógeno.

Puesto que la masa Mr de la proteína de referencia es siempre la misma, la diferencia de Mr con respecto a otra proteína detectada en alguna de las muestras significa que las células de la muestra presentan un IP menor de 0.8 teniendo en cuenta la relación entre el tiempo de proliferación de las células de la muestra respecto del tiempo de proliferación de las células de referencia.

Un IP menor de 0.8 indica que el tiempo de proliferación de las células de la muestra es menor de 19 horas y 12 minutos en el caso de que el tiempo de proliferación de las células referencia sea de 24 horas.

Según una realización preferida del método, las células de la muestra son leucémicas. Preferiblemente las células leucémicas son células T. Las células T leucémicas pueden proceder, pero sin limitarse, de la lista que comprende linfomas precursores de células T que producen leucemia linfoblástica precursora aguda de células T (LLA-T), linfoma linfoblástico precursor de células T (LBL), linfoma periférico de célula T, linfoma hepatoesplénico de células T gamma y delta, linfoma subcutáneo de células T, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma extranodal de células T de tipo nasal, linfoma intestinal de células T de tipo enteropático, linfoma que produce leucemia de células T en adultos (HTLV 1+), linfoma anaplásico de células grandes tipo cutáneo primario, leucemia agresiva de células NK (*Natural Killer*). Las células también se seleccionan, pero sin limitarse, de la lista que comprende células cuya proliferación da lugar a leucemia mieloide crónica (LMC), leucemia linfoide crónica (LLC), leucemia linfoide aguda (Leucemia Linfoblástica; LLA), leucemia mieloide aguda (Leucemia Mieloblástica; LMA) o leucemia mielógena (LM).

Según una realización aún más preferida, las células leucémicas pertenecen a las sublíneas Jhp o Jws que son células leucémicas con un IP menor de 0.8. Las sublíneas celulares anteriores proceden del clon de células Jurkat E6.1 que se generan tal como se describe en los ejemplos de la presente invención.

Otra realización preferida es el método en el que se añaden anticuerpos anti-Ac1 (Ac2) unidos a un compuesto marcador, a los anticuerpos Ac1 (pero sin marcar) del apartado (c) del método, para formar el complejo Ac1-Ac2-compuesto marcador. Los anticuerpos Ac2 se unen al compuesto marcador definido anteriormente y el complejo Ac2-compuesto marcador se añade a los anticuerpos Ac1 que, en el caso de esta realización preferida, no están unidos a ningún compuesto marcador, de modo que se forma el complejo Ac1-Ac2-compuesto marcador que puede ser detectado mediante la adición del sustrato correspondiente, tal como se ha definido anteriormente.

Según otra realización preferida del método, se incluye además un paso de cultivo de las células presentes en la muestra biológica, previo a la obtención del extracto celular descrito en el apartado (b) del método. Este paso adicional

## ES 2 342 252 A1

puede ser necesario para obtener un número de células suficiente para obtener una concentración detectable tanto de proteínas SOD1 como de las proteínas de la invención.

5 Otro aspecto de la presente invención es el uso de la proteína de la invención como biomarcador de células tumorales.

10 El término “biomarcador” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a la identificación de una señal fisiológica concreta inducida por un metabolismo celular alterado que produce una mayor proliferación celular respecto de células cancerígenas control. La señal fisiológica concreta se basa en el truncamiento de la proteína SOD1 de modo que se obtiene una proteína de menor Mr que puede ser detectada de forma reproducible, con alta sensibilidad, especificidad y sencillez. Es decir, es una molécula biológica que “marca” los cambios medibles bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a un cáncer muy agresivo. Las células tumorales que dan lugar al cáncer agresivo tienen un IP menor de 0.8, tal como se entiende el término IP en la presente invención. Este biomarcador permite distinguir el cáncer agresivo de otros menos agresivos.

15 Un aspecto más de la presente invención es el uso de la proteína biomarcadora para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de células tumorales con un IP menor de 0.8.

20 Las decisiones acerca de comenzar, seguir, cambiar o suspender el tratamiento de las células tumorales cuyo IP sea menor de 0.8, pueden basarse en los resultados de pruebas que ayuden a monitorizar la evolución de un cáncer.

25 El tratamiento principal del cáncer habitualmente suele ser la cirugía en el caso de existir neoplasias o tumores definidos (esplenectomía en el caso de la extirpación de bazo). Después de la cirugía, muchos pacientes reciben terapia adyuvante. El término “terapia adyuvante”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al tratamiento que se da después de la cirugía, con el objetivo de prevenir la recaída del cáncer. Las personas afectadas de tumores producidos por las células que expresan la proteína de la presente invención (con un IP menor de 0.8) pueden recibir la terapia adyuvante, un tratamiento previo a la cirugía, o un tratamiento sin cirugía.

30 El tratamiento del cáncer se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende radioterapia, quimioterapia, terapia biológica, trasplante de células madre o plasmaféresis.

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer el cual utiliza rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir las células cancerosas e impedir que crezcan.

35 La quimioterapia es un tratamiento del cáncer que utiliza medicamentos para interrumpir la proliferación de células cancerosas, mediante la eliminación de las células o evitando su multiplicación. Los compuestos quimioterapéuticos se seleccionan, pero sin limitarse, de la lista que comprende inhibidor de la tirosina cinasa (por ejemplo, pero sin limitarse, mesilato de imatinib o dasatinib), corticosteroides, inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, pero sin limitarse, talidomida o lenalidomida), inhibidor de la proteasa (por ejemplo, pero sin limitarse, bortezomib), interleucina-2 o interferón alfa, inhibidor de la mitosis (por ejemplo, pero sin limitarse paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinblastina, vincristina o vinorelbina), antibiótico antitumoral (por ejemplo, pero sin limitarse bleomicina o antraciclinas. La antraciclina se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina o idarrubicina).

45 La terapia biológica es un tratamiento que utiliza el sistema inmunitario del paciente para combatir el cáncer. Se utilizan sustancias elaboradas por el cuerpo o en un laboratorio para reforzar, dirigir o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer.

50 El trasplante de células madre reemplaza las células que generan la sangre que fueron destruidas por el tratamiento del cáncer. La plasmaféresis es un procedimiento mediante la cual se extrae la sangre del paciente y se procesa en una máquina que separa el plasma. Las células sanguíneas normales se devuelven a la corriente sanguínea junto con plasma de un donante.

55 La monitorización de la respuesta a un tratamiento de células tumorales que tienen un IP menor de 0.8, puede llevarse a cabo mediante la aplicación del método de la presente invención sólo o en combinación con la medida de un parámetro que sea indicativo de la enfermedad como por ejemplo, pero sin limitarse, morfología linfocitaria, índice proliferativo linfocitario, velocidad de crecimiento que tiene el linfoma, extensión de la enfermedad, determinada según el número, localización y tamaño de las áreas ganglionares y extraganglionares afectas, marcadores séricos (como por ejemplo, pero sin limitarse, LDH y beta2-microglobulina), la expresión de marcadores de la superficie linfocitaria y la morbilidad o mortalidad, donde un cambio favorable con el nivel del indicador en relación con el cambio de referencia usando animales no tratados en condiciones comparables, indica que el compuesto es activa/o para tratar dicha enfermedad. El estudio de dichos parámetros puede ser realizado por diferentes técnicas conocidas por un experto en la materia, entre los que se encuentran, pero sin limitarse, hemograma, radiografías, ultrasonido, tomografía axial computarizada (CT Sean), resonancia magnética por imágenes (MRI), centellograma con galio, tomografía por emisión de positrones TEP (PET sean), gammagrafía ósea, análisis de médula ósea, punción lumbar, citometría de flujo, biopsia quirúrgica o necropsia. La determinación de la efectividad del tratamiento, puede ser llevada a cabo mediante la aplicación del método de la presente invención en células derivadas de modelos experimentales de animales mamíferos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Fig. 1.- *Muestra la detección de dos isoformas de la proteína SOD1 por inmunoblot en diferentes células humanas aisladas.*

Jurkat: Linfocitos T que sufren leucemia; Jhp: Sublínea celular con fenotipo muy proliferativo derivada de células Jurkat; Jws: Sublínea celular con fenotipo muy proliferativo derivada de células Jurkat; PBL: Linfocitos T normales de sangre periférica de un individuo sano.

A la izquierda se indican los Mr correspondientes a las isoformas de SOD1 detectadas en las células analizadas. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos que describen el uso de la proteína de la presente invención para discriminar células tumorales con menor tiempo de proliferación que las células tumorales de referencia.

#### Ejemplo de la invención

##### 1.1 Cultivos celulares

El clon E6.1 de células Jurkat, leucemia humana tipo T (ATCC, Rockville Pike, EE.UU.) y la sublínea Jhp se cultivaron en medio RPMI-1640 (El medio RPM11640 es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular utilizado para obtener la sincronización de la división celular por no tener timidina en su composición. GIBCO, Merk) suplementado con 5% SFB (Suero Fetal Bovino), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomycin. La sublínea Jws se cultivó en el medio RPMI 1640/DMEM/Ham's F12 (2:1:1) complementado con albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/ml), selenito de sodio (4,3 ng/ml) y etanolamina (1,53 µg/ml). Las células estaban libres de Mycoplasma, por la prueba rutinaria por RT-PCR.

Las células Jurkat del clon E6.1 están disponibles en el *American Type Culture Collection* (ATCC) con el número TIB 152. Estas células se emplean como células de referencia.

Las sublíneas celulares Jhp y Jws proceden de las células Jurkat descritas. La obtención de la sublínea celular Jhp se llevó a cabo por medio de cultivos prolongados de células parentales (Células Jurkat del clon E6.1) en el medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 5% SFB, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 microg/ml estreptomycin, produciendo una alta densidad de células. La selección de las células supervivientes fue llevada a cabo por medio de varias centrifugaciones en gradiente de Ficoll. Las células Jws fueron generadas por cultivos de células parentales en un medio de cultivo libre de suero que contiene RPMI-1640/DMEM/Ham's F-12 (2:1:1 v/v) complementado con albúmina de suero bovino (BSA) (1mg/ml), selenito de sodio (4.3 ng/ml), etanolamina (1.53 µg/ml), transferrina (10 µg/ml), insulina (5 µg/ml), glutamina (2 mM) y los antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomycin, 100 µg/ml). El cultivo de células en medio libre de suero causa la muerte de la mayor parte de células parentales y las subpoblaciones viables fueron seleccionadas por varias centrifugaciones en gradiente de Ficoll.

##### 1.2. Medida de la expresión de las proteínas SOD1 y truncada por electroforesis (SDS-PAGE) seguida de inmunoblot

Se recogieron los cultivos celulares a 37°C, 5% CO2 y atmósfera con vapor de agua (tiempos de cultivo, 3 días Jhp y Jws y 5 días para Jurkat, densidad de sembrado, 100.000 células/ml de cultivo) y las células se lavaron dos veces en suero fosfatado salino (PBS). Se prepararon los lisados celulares (1 millón de células por carril) por incubación de 30 minutos a 4°C en el tampón de lisis que contiene Tritón X-100 (1% final) e inhibidores de fosfatasa y proteasas celulares (leupeptina 10 microgramos/ml; PMSF 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; pirofosfato sódico 10 mM). Tras centrifugar, 10 minutos a 12000 rpm en Minifuga Beckman, los sobrenadantes se incubaron con el tampón de electroforesis (SDS 1% y azul de bromofenol), durante 5 minutos a 100°C, y se aplicaron de entre 20 y 60 microlitros/carril) en los pocillos para la electroforesis. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (15%) y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa [2], El inmunoblot se realizó con anti-SOD1 (la proteína SOD1 procede de humanos), obtenido en conejo, como anticuerpo primario, y un anti-inmunoglobulina contra conejo obtenido en ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, Madrid), como anticuerpo secundario. La membrana se reveló durante 30 minutos a temperatura ambiente de entre 15 y 28°C por incubación con bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitro azul tetrazolio (BCIP/NBT).

## ES 2 342 252 A1

### 1.3. Medida de la actividad de la proteína SOD

Las células ( $15 \times 10^6$ ) se resuspendieron en 1 ml de PBS y se sonicaron para obtener un extracto celular para el análisis enzimático. El contenido total de proteína se determinó por el método de Bradford (Bio-rad, Heidemannstrasse, München). La actividad enzimática de SOD se midió con la reacción xantina/xantina oxidasa que produjo un flujo de  $O_2^{\bullet-}$  con la sal de tetrazolium sulfonada XXT, como lo indican los captadores de iones  $O_2^{\bullet-}$ . Se utiliza  $CN^-$  5 mM para inhibir la actividad de Cu,Zn-SOD y obtener la de la MnSOD (Iñarra *et al.* (2007). *Biochem. J.* 405:173-179).

### 1.4. Método de detección de la proteína de la invención en células leucémicas con IP menor de 0.8

Se determinó que el tiempo de proliferación de las células procedentes de las líneas celulares Jhs o Jws era inferior al tiempo de proliferación de las células parentales, empleadas estas últimas como células de referencia para el cálculo del IP. Así pues, el tiempo de proliferación de las células de referencia fue de 24 horas mientras que el tiempo de proliferación de las células Jhs fue de 12 horas y el de las células Jws de 18 horas. El índice de proliferación (IP) se definió como;

$$IP = \text{tiempo de proliferación de las células de la muestra} / \text{tiempo de proliferación de las células de referencia.}$$

Por tanto, el IP de las células Jhs =  $12/24$ , es decir,  $IP_{Jhs} = 0.5$ . Por otro lado, el IP de las células Jws =  $18/24$ , es decir  $IP_{Jws} = 0.75$

En la Fig. 1 se muestra la detección de la proteína SOD1 normal que correspondió con una única banda de Masa molecular relativa (Mr) de 16 KDa en las células Jurkat (células de referencia). Se observó un resultado similar en el carril correspondiente a los PBLs obtenidos de un donante sano. Sin embargo, se observó que la expresión de SOD1 en las células Jhp y en las Jws correspondió también a una única banda, de intensidad comparable, pero con Mr de 14 KDa. Este resultado indicó que estas células expresaron una isoforma truncada de SOD1 (2 KDa menor con respecto a las células Jurkat de referencia y a sus homólogos País (Leucocitos de sangre periférica normales).

La aparición de esta isoforma truncada de SOD1 estuvo asociada a una disminución de la actividad SOD1 en estas células en relación con las células de referencia, determinada por las técnicas espectrofotométricas de rutina en la literatura (Iñarra *et al.* (2007). *Biochem. J.* 405:173-179). Así, la actividad SOD1 de ambas sublíneas fue menor que la correspondiente a las células Jurkat de referencia, siendo la disminución más marcada en las células Jhp, con una reducción de alrededor de dos veces la de las células Jurkat. Siendo la actividad SOD1 en Jurkat (5 U/mg); Jhp (0,2 U/mg) y Jws (2 U/mg).

# ES 2 342 252 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína que consiste en una isoforma de la proteína SOD1 con una masa molecular relativa (Mr) de entre 13,5 y 14,5 KDa.
2. Método de detección de la proteína según la reivindicación 1 que comprende:
- 10 a. Obtener una muestra biológica aislada,
  - b. obtener el extracto celular de la muestra biológica del apartado (a) y separar las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas,
  - 15 c. añadir anticuerpos anti-SOD1 (Ac1) unidos a un compuesto marcador, al soporte del apartado (b) y
  - d. detectar la proteína según la reivindicación 1 mediante la adición de un sustrato indicador cromogénico, fluorogénico y/o quimioluminiscente al producto obtenido en el apartado (c).
- 20 3. Método de detección de células tumorales con un índice de proliferación (IP) menor de 0.8, que incluye los apartados (a)-(d) según la reivindicación 2, y que además comprende:
- 25 e. comparar la Mr de la proteína del apartado (d) con la Mr de una proteína SOD1 de referencia y
  - f. asignar la diferencia de Mr del apartado (e) a la presencia de células tumorales con un IP menor de 0.8.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 donde las células de la muestra son células leucémicas.
- 30 5. Método según la reivindicación 4 donde las células leucémicas pertenecen a las sublíneas Jhp o Jws.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde se añaden anticuerpos anti-Ac1 (Ac2) unidos a un compuesto marcador, a los anticuerpos Ac1 sin marcar del apartado (c).
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6 donde además se incluye un paso de cultivo de las células presentes en la muestra biológica, previo a la obtención del extracto celular del apartado (b).
8. Uso de la proteína según la reivindicación 1 como biomarcador de células tumorales.
- 40 9. Uso de la proteína según la reivindicación 8, para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de células tumorales con un IP de las células de la muestra respecto de células tumorales de referencia, menor de 0.8.

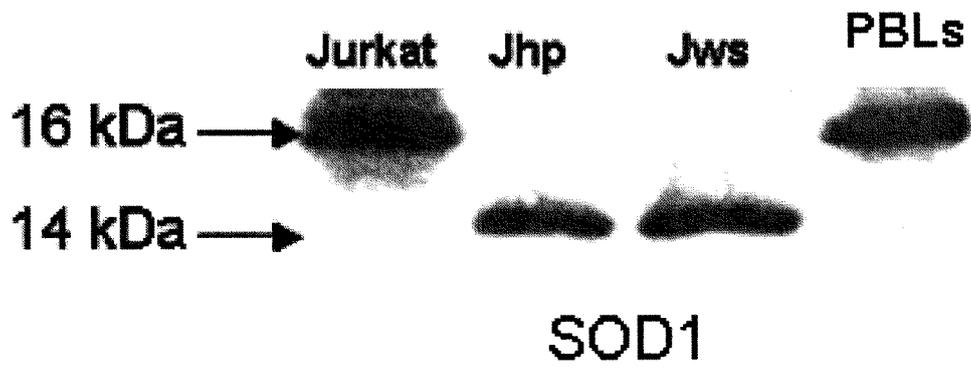
45

50

55

60

65



**FIG. 1**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 252

② Nº de solicitud: 200803728

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.12.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JACKSON, M. et al. "Copper/Zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation". ANNALS OF NEUROLOGY. 01.11.1997. Vol. 42, Nº. 5, páginas 803-807; Resultados y Fig. 3.	1,2
Y		1-9
X	ZUO, X.L. et al. "Levels of Selenium, Zinc, Copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia". BIOLOGICAL TRACE ELEMENTS RESEARCH. 2006. Vol. 114, Nº. 1-3, páginas 41-53; discusión.	2-7
Y		1,8,9
X	US 4910133 A (UDA, T. et al.) 20.03.1990, resumen.	2-7
Y		1,8,9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.05.2010

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12Q 1/26** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.05.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-9	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-9	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JACKSON, M. et al. "Copper/Zinc superoxide dismutase 1 and sporadic amyotrophic lateral sclerosis: analysis of 155 cases and identification of a novel insertion mutation". ANNALS OF NEUROLOGY. 01.11.1997. Vol. 42, Nº. 5, páginas 803-807.	--
D02	ZUO, X.L. et al. "Levels of Selenium, Zinc, Copper, and antioxidant enzyme activity in patients with leukemia". BIOLOGICAL TRACE ELEMENTS RESEARCH. 2006. Vol. 114, Nº. 1-3, páginas 41-53.	--
D03	US 4910133 A	20-03-1990

**Observaciones sobre documentos:**

El documento D01, analiza las mutaciones de SOD1 en 155 casos de ELA y describe una nueva mutación en la V118 que da lugar a una proteína truncada. La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), es una enfermedad neurodegenerativa relacionada con mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa. Estas mutaciones dan lugar a distintas isoformas de la proteína, directamente implicadas en el origen de la grave enfermedad.

El documento D02, describe la determinación de los niveles de distintas enzimas, entre las que se encuentra la superóxido dismutasa SOD1, en pacientes enfermos de leucemia. Los niveles de SOD1, se encontraron elevados en pacientes con leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda y leucemia no linfocítica aguda; la enzima no estaba alterada en enfermos de leucemia mielocítica crónica.

El documento D03, describe en la columna 1, líneas 53-64, que se han medido los niveles de SOD1 en suero humano, en relación a distintas enfermedades y las determinaciones se han realizado con un inmunoensayo utilizando antisuero anti-SOD1 humano obtenido en conejo. El documento describe también un anticuerpo monoclonal anti-SOD1 que puede utilizarse para el diagnóstico de cáncer de estómago en cualquier tipo de inmunoensayo.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención consiste en una isoforma de la enzima superóxido dismutasa SOD1 humana, que se caracteriza por tener una masa molecular relativa (Mr) comprendida entre 13.5 y 14.5 KDa. También forman parte de la invención, un método de detección de dicha isoforma y un método de detección de células tumorales utilizando la isoforma como biomarcador.

La enzima truncada se ha identificado en dos sublíneas celulares, Jhs y Jws, obtenidas a partir de células Jurkat de leucemia humana tipo T, ATCC TIB 152 por medio de electroforesis SDS-PAGE.

La reivindicación nº 1 de la invención, se refiere a una isoforma de SOD1 definida de una forma tan general y poco concreta, que no puede considerarse nueva de acuerdo a el contenido del documento D01. Cabe incluso la posibilidad de que la isoforma reivindicada, corresponda a dos isoformas diferentes pero con masas moleculares relativas similares, analizando el resultado de que las actividades SOD1 de las dos sublíneas Jhs y Jws obtenidas, son sustancialmente diferentes.

En el ejemplo presentado en la descripción, se identifica una proteína con afinidad por un anticuerpo anti-SOD1, presente en dos sublíneas celulares obtenidas a partir de células Jurkat que se identifica como una isoforma truncada de dicha proteína. Se define también el "índice de proliferación celular" y se relaciona la presencia de dicha isoforma en las dos sublíneas celulares que presentan un "índice de proliferación celular" que el de las células Jurkat de referencia. No se ha demostrado que la isoforma de SOD1 identificada en el ensayo, esté presente en células tumorales excluidas las sublíneas Jhs y Jws y por tanto el método reivindicado debe limitarse a células leucémicas.

Se ha descrito previamente la relación existente entre el aumento de la expresión de SOD1 y la leucemia. Considerando la falta de características técnicas de la proteína descrita en la reivindicación 1, se considera que las reivindicaciones 1-9 no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.