



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 345 526**

② Número de solicitud: 200900052

⑤ Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **09.01.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2010**

Fecha de la concesión: **13.06.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **24.06.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

⑰ Titular/es: **Universidad Pablo de Olavide
Ctra. de Utrera, Km 1
41013 Sevilla, ES**

⑱ Inventor/es: **Casares Fernández, Luis Fernando y
Dichtel Danjoy, Marie-Laure**

⑳ Agente: **Temño Ceniceros, Ignacio**

㉔ Título: **Gen Sox F de Drosophila con actividad supresora de tumores y usos del mismo.**

㉖ Resumen:

Gen Sox F de Drosophila con actividad supresora de tumores y usos del mismo.

La presente invención se refiere a la función supresora de tumores del gen Sox F de *Drosophila melanogaster*; la proteína, y sus mutantes, codificada por el gen Sox F; a anticuerpos contra la proteína Sox F; y a la interacción de dicho gen y sus productos con la vía Wnt (wg) de Drosophila, así como sus usos diagnósticos, terapéuticos e investigación de estos compuestos.

ES 2 345 526 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Gen Sox F de *Drosophila* con actividad supresora de tumores y usos del mismo.

5 La invención pertenece al campo de la terapia genética. Específicamente, la invención está dirigida al gen Sox F de *Drosophila*, su función supresora de tumores y a la interacción de dicho gen y sus productos con la vía Wnt (wg) de *Drosophila*.

Estado anterior de la técnica

10 El número de células en un organismo está determinado por el número de células generadas como resultado de la proliferación celular así como por el número de células que son eliminadas por muerte celular. Tanto la proliferación celular como la muerte celular son mecanismos estrictamente regulados por mecanismos que aseguran que un órgano de una forma y tamaño característicos es generado. Los diferentes mecanismos que regulan el crecimiento normal y la proliferación celular son a menudo aquellos que son perturbados en cánceres humanos. Los procesos mutacionales encontrados en cánceres pueden bien promover el crecimiento y proliferación celular o impedir la muerte celular. La progresión del cáncer está causada por la acumulación de múltiples mutaciones que provocan una ventaja selectiva durante el crecimiento del cancer, invasión y metástasis (Haber, D. A. and Fearon, E. R. *Lancet* 351 Suppl 2: S111-8, 1998; Loeb, K. R. and Loeb, L. A., *Carcinogenesis* 21 (3): 379-85, 2000; Loeb, L. A., *et al.* *Cáncer Research* 34 (9): 2311-21, 1974).

20 Muchos de los eventos genéticos que subyacen al cáncer son mutaciones que inactivan la función de genes supresores de tumores (Haber, D. A. and Fearon, E. R. *Lancet* 351 Suppl 2: S111-8, 1998). Los genes supresores de tumores identificados hasta la fecha exhiben diversas funciones celulares (Haber D. and Harlow E. *Nature Genetics* 16 (4): 320-2, 1997).

25 Se han logrado avances tecnológicos significativos para identificar regiones de cromosomas involucrados en la progresión tumoral. Sin embargo, estas regiones son difíciles de identificar debido a la complejidad de los cariotipos vistos en muestras clínicas.

30 La facilidad de llevar a cabo estudios en *Drosophila*, junto con la conservación general de los procesos celulares y moleculares entre *Drosophila* y mamíferos, ha propiciado que éste sea un sistema modelo para la investigación del cáncer. La investigación con *Drosophila* ha proporcionado un número importante de descubrimientos en el campo.

35 El primordio del ala (en inglés “wing primordium” o “wing imaginal disc”) de *Drosophila* es particularmente adecuado para la aplicación de aproximaciones genéticas para el estudio de la proliferación y muerte celulares en el contexto del desarrollo de órganos (Blume J. *Natl. Cancer Inst.* 1993; 85: 260-262). En el subdominio bisagra del ala, el homólogo de Wnt1 s en *Drosophila*, wingless (wg), regula la proliferación celular a través de la activación de la vía canónica Wnt (Neumann CJ, Cohen SM. *Development.* 1996 Jun;122(6):1781-9). El disco del ala está formado por un epitelio monoestratificado y por ello es un buen modelo para estudiar la regulación de la proliferación de células epiteliales. La vía canónica Wnt es necesaria para la proliferación de células epiteliales intestinales en mamíferos y su activación aberrante provoca neoplasia intestinal.

45 El estudio de mutaciones en los genes Wnt ha indicado un papel para los Wnt en el control del crecimiento y en la determinación del tejido. En *Drosophila*, wingless (wg) codifica un gen Wnt (Rijsewicz *et al.* *Cell* 50:649-657 (1987)), y las mutaciones en wg alteran el patrón del ectodermo embrionario, la neurogénesis y el crecimiento del disco imaginal (Morata y Lawrence, *Dev. Biol.* 56:227-240 (1977); Baker, *Dev. Biol.* 125:96-108 (1988); Klingensmith y Nusse, *Dev. Biol.* 166:396-414 (1994)).

50 Los niveles de expresión de Sox17, uno de los homólogos en mamíferos de SoxF y que se expresa en epitelio intestinal normal, están reducidos en neoplasias intestinales. Además, Sox17 es un antagonista a la señal Wnt. La sobreexpresión de Sox17 en células SW480 de carcinoma de colon causa la represión de la actividad beta-catenina/TCF dependiente de la dosis, e inhibe la proliferación. Además de unirse a beta-catenina, Sox17 interacciona físicamente con miembros de la familia TCF/LEF vía el dominio HMG. Sox17 fomenta la degradación tanto de beta-catenina como de proteínas TCF de un modo no canónico, mecanismo independiente de GSK3 que puede ser bloqueado por inhibidores de proteasoma (Sinner D, *et al.* *Mol Cell Biol.* 2007 in press). Estos resultados han sido confirmados en rata, donde el gen Sox17 es un regulador negativo del ciclo celular (Sohn J *et al.* *J Neurosci.* 2006 Sep 20; 26(38):9722-35) y en *Xenopus*, donde Sox17 directamente se asocia con beta-catenina (Sinner D, *et al.* *Development* 131, 3069-3080).

60 El patrón de expresión del gen SoxF en *Drosophila*, también conocido como Sox15, ha sido descrito sucintamente por Crémazy F, y col. *Genome-wide analysis of Sox genes in Drosophila melanogaster*, *Mech Dev.* 2001 Dec; 109 (2):371-5; y en Butler *et al.*, 2003, *Development* 130(4): 659-670.

Explicación de la invención

65 La presente invención se refiere a la función supresora de tumores del gen Sox F (también denominado gen Sox 15) de *Drosophila*; la proteína, y sus mutantes, codificada por el gen Sox F; a anticuerpos contra la proteína Sox F;

ES 2 345 526 B1

y a la interacción de dicho gen y sus productos con la vía Wnt (wg) de *Drosophila*, así como sus usos diagnósticos, terapéuticos e investigación de estos compuestos.

5 De acuerdo con una realización de la presente invención, está dirigida al uso del gen SoxF (SEQ ID NO 1) de *Drosophila melanogaster*, la proteína codificada por el gen SoxF (SEQ ID NO 2) o sus mutantes en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. Este uso puede también ser formulado como un método de tratamiento de cáncer por la administración del gen SoxF de *Drosophila melanogaster*, la proteína codificada por el gen SoxF o sus mutantes, a un mamífero, preferentemente un humano en necesidad dicho tratamiento.

10 Según otra realización de la presente invención, ésta proporciona el uso de la proteína codificada por el gen Sox F, o sus mutantes, para bloquear la señal Wnt relacionada con la progresión del cáncer.

15 En una realización adicional de la invención, ésta se refiere al uso de la proteína codificada por el gen SoxF o sus mutantes en la preparación de un medicamento para bloquear la proliferación de células cancerígenas.

La invención proporciona un sistema modelo para el estudio de la señal Wnt relacionada con ciertos tipos de cáncer, como por ejemplo cáncer de colon, utilizando tejidos de la región bisagra del ala derivados de discos imaginal mutantes de SoxF, y de este modo permitir la identificación de fármacos anti-cancerígenos.

20 En una realización adicional, la invención está dirigida a un método para diagnosticar un tumor asociado con la señal Wnt.

En una realización adicional, la invención está dirigida a un método para tratar un tumor asociado con la señal Wnt en un paciente, en el cual el crecimiento de dicho tumor refleja una alteración en la señal Wnt o de la actividad supresora de tumores de SoxF o sus homólogos humanos Sox 17 y 18 en la célula tumoral; comprendiendo el método proporcionar el gen SoxF funcional, la proteína codificada por el gen SoxF o sus mutantes a las células tumorales del paciente, de una manera que permita la expresión de la proteína SoxF codificada por el gen, durante un tiempo y en una cantidad suficientes para inhibir el crecimiento del tumor en el paciente. En definitiva, según otro aspecto de la presente invención, la misma proporciona el uso del gen SoxF, la proteína codificada por dicho gen SoxF o sus en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor asociado con la señal Wnt, donde la administración de dicho gen SoxF o la proteína codificada por éste, permite inhibir el crecimiento del tumor.

30 En una realización adicional, la invención está dirigida a un método de terapia génica de un paciente sintomático o presintomático, comprendiendo el método proporcionar un gen Sox F funcional a las células pertinentes del paciente, tanto normales como tumorales que se hallan en necesidad de la terapia, de una manera que permite la expresión de la proteína Sox F codificada por el gen durante un tiempo y en una cantidad suficientes para proporcionar la función supresora de tumores de SoxF a las células del paciente.

40 El ala de *Drosophila* está formada por dos capas de células epiteliales monoestratificadas. Este tipo de “saco de células” está separado en distintas regiones: “pouch” y “notum”, que están separadas por la región bisagra del ala (ver Figura 1). En esta última región wg es esencial para la proliferación, como en mutantes wg, la proliferación en la región bisagra se ha perdido (Neumann CJ, Cohen SM. *Development*. 1996 Jun;122 (6): 1781-9). A la inversa, la sobreexpresión de wg mantiene las células bisagra proliferando sin grandes cambios en el destino celular. Por estos motivos, las células bisagra son adecuadas para el estudio de la proliferación de células epiteliales regulada por Wnt.

45 La invención está basada en parte en las propiedades supresoras de tumores del gen SoxF de *Drosophila*. Una línea mutante que contiene una inserción en una región intrónica del gen resulta en una acusada sobre-proliferación de las células bisagra, tal y como se ha demostrado morfológicamente (ver Figura 2) o por la mayor incorporación del análogo de timidina BrdU (ver Figura 3). Por lo tanto, SoxF actúa como un supresor tumoral.

50 Durante las investigaciones que han dado lugar a la presente invención, los inventores han generado nuevas mutaciones que son genéticamente nulas. Se ha confirmado el fenotipo del gen mutante SoxF utilizando la línea dsRNAi (stock numero 45482 en centro de Viena: <http://www.vdrc.at/>, Dietzl *et al* *Nature* 448, 151-156, 12 Jul 2007) cuya expresión fue específicamente dirigida a las células bisagra.

55 El gen SoxF pertenece a la familia de factores de transcripción de alta movilidad (HMG) (Bowles J, Schepers G, Koopman P. *Dev Biol*. 2000 Nov 15;227(2):239-55). De acuerdo con su función específica en células bisagra, SoxF es expresado en estas células exclusivamente. Cuando SoxF es sobre-expresado, la proteína que codifica puede ser detectada en el núcleo celular utilizando un antisuero policlonal que reconoce de manera selectiva a al menos una parte de la proteína. Dicho antisuero está dirigido a los aminoácidos 418 a 432 y 606 a 621 de la proteína.

60 De acuerdo con otro aspecto de la invención, ésta se refiere a un antisuero policlonal que reconoce de manera selectiva al menos a una parte de la proteína codificada por el gen SoxF. De modo preferente, dicho antisuero se une de manera específica a los aminoácidos 418 a 432 y 606 a 621 de la proteína. De acuerdo con realizaciones particulares, el antisuero comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une de manera específica a los aminoácidos 418 a 432 y 606 a 621 de la proteína codificada por el gen SoxF.

ES 2 345 526 B1

La técnica de producción de anticuerpos policlonales (o antisueros) es bien conocida. Están disponibles varios libros de texto de laboratorio para el experto donde se describen técnicas adecuadas para su producción.

De acuerdo con una realización más preferida, el anticuerpo policlonal es obtenible por inmunización de mamíferos con al menos un péptido seleccionado entre el grupo constituido por: el péptido de SEQ ID NO 3 (aa 418-432: C+PSPSRAAKSRQEKLA-CONH₂); el péptido de SEQ ID NO 4 (aa 606-621: CLKYPDTNQNYDDYEA-CONH₂); los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4. Según una realización todavía más preferida, la inmunización se lleva a cabo con los péptidos de SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

En una realización particularmente preferida, los mamíferos son conejos.

Según una realización de la presente invención, ésta se refiere al uso del antisuero policlonal según se ha definido anteriormente, para la detección de la presencia o ausencia de la proteína codificada por el gen SoxF en una muestra biológica tomada y aislada de un animal, incluidos los humanos.

Así, la presente invención proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de la proteína codificada por el gen SoxF en una muestra, que comprende poner en contacto la citada muestra con el antisuero policlonal de la invención, y detectar la presencia o ausencia del complejo formado por dicha proteína y dicho polipéptido.

Según otro aspecto de la presente invención, ésta proporciona composiciones farmacéuticas conteniendo una cantidad terapéuticamente efectiva del gen SoxF, la proteína codificada por dicho gen, sus mutantes y/o el antisuero policlonal anteriormente descrito, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

El término “farmacéuticamente aceptable” en el contexto de la presente invención, debe ser entendido como un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del agente activo, en este caso el gen SoxF, la proteína codificada por el mismo, sus mutantes y/o el antisuero policlonal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquiera de las rutas de administración convencionales, incluyendo inyección o infusión gradual en el tiempo. La administración puede ser también, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, o transdérmica.

Las preparaciones de la invención, son administradas en cantidades efectivas. De acuerdo con la presente invención, el término “cantidad efectiva” es la cantidad de una composición farmacéutica que sola, o junto con dosis adicionales, estimula una respuesta deseada. En el caso del tratamiento del cáncer, la respuesta deseada es la inhibición de la progresión de la enfermedad. Esta inhibición de la progresión, puede englobar desde el ralentizar la progresión temporalmente, hasta la detención de la misma de modo permanente.

Según otra realización de la presente invención, ésta proporciona un método de obtención de una línea celular tumoral a partir de tejido mutante de SoxF que comprende las etapas:

a) selección de larvas con el genotipo MS209; UAS p35; UAS de SoxF para la obtención de células inmortales o del genotipo SoxF^{kg09145} por la obtención de células sobreproliferando;

b) disección de alas de larvas de tercer estadio en PBS; y

c) disociación de las alas en medio con tripsina.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, ésta se refiere al uso del gen SoxF, la proteína codificada por el mismo o sus mutantes en procesos de cribado de fármacos antitumorales. De modo preferente, dicho cribado de fármacos antitumorales se lleva a cabo en los mutantes SoxF^{kg09145} SoxF²⁶ o en MS209; UAS p35; UAS ds SoxF o en las células que derivan de esos mutantes.

Según una realización adicional de la presente invención, ésta se refiere a un método de diagnóstico para el diagnóstico de la progresión del cáncer. De acuerdo con esta realización, el método consiste en detectar la presencia o ausencia de la proteína codificada por el gen SoxF en una muestra biológica tomada y aislada de un animal, incluido humanos, y comparar los resultados obtenidos con los de una segunda muestra tomada y aislada una vez transcurrido un tiempo. Una variación en la expresión de la proteína codificada por el gen SoxF es indicador de la progresión de la enfermedad.

De acuerdo con otra realización de la invención, ésta se refiere a kits de diagnóstico para llevar a cabo los métodos de diagnóstico de la invención. Los kits incluyen uno o más antisueros policlonales según se han definido anteriormente; uno o más agentes de control; y instrucciones para el uso de los mismos en el diagnóstico de la enfermedad.

ES 2 345 526 B1

SoxF y la vía wg

a) *La vía wg es activada en las células mutantes*

5 Se ha observado (ver Fig. 6) una elevación de la expresión del gen *wg* y una acumulación de su producto, así como la activación de la expresión de dianas corriente abajo de la vía *wg* bien en clones de células mutantes *SoxF* o bien en discos derivados de mutantes individuales.

b) *La vía wg es esencial para el fenotipo sobre-proliferativo de SoxF*

10 Se ha creado un mutante doble incluyendo el mutante doble *SoxF*; *wg^{spfdlg}*. El mutante *wg^{spfdlg}* es un alelo regulador del gen *wg* que causa la pérdida de expresión de *wg* específicamente en la región bisagra (C.J. Neumann and S. M. Cohen Development 122, 1781-1789 (1996)). En ausencia de *wg*, las células mutantes *SoxF* ya no sobre-proliferan. Así la sobre-proliferación causada por la pérdida de las funciones de *SoxF* está mediada, al menos en parte, por la
15 activación de la vía *wg*.

c) *SoxF antagoniza la vía wg*

20 Se ha observado una disminución de la proteína *wg* cuando *SoxF* está sobre-expresado (ver Fig. 7).

d) *SoxF esta corriente abajo de la vía wg*

25 La sobre-expresión de *wg*, o la activación ectópica de su vía canónica, conduce a una elevación del nivel de transcripción de *SoxF* como se muestra por hibridación *in situ* (ver Fig. 8).

Por lo tanto, *SoxF* está implicado en un circuito de retroalimentación negativa de la vía *wg* que permite que la proliferación celular sea estrictamente regulada en la bisagra.

30 Como se describe previamente, la comprensión de la inducción de cáncer puede ser dilucidado mediante el establecimiento de sistemas modelo en *Drosophila*. La presente invención proporciona las herramientas necesarias para dilucidar la relación entre el Wnt y genes *Sox17* y la inducción de cáncer.

Las posibles aplicaciones derivadas de la presente invención pueden ser:

35 i) La identificación de nuevos genes por cribados genéticos que pueden revertir la sobre-proliferación de la mutación de *SoxF*. Estos pueden interactuar con, o actuar corriente abajo o en paralelo con *SoxF*. Dado que el grado de conservación a nivel molecular y celular es alto entre *Drosophila* y humanos, los genes identificados que pueden interactuar con *SoxF* serán buenos candidatos para modular la proliferación celular controlada por Wnt a través de la interacción con los homólogos de *SoxF* humanos, *Sox17* y 18 NCBI BAB83867 y BAA94874 (Zhang W, *et al.*
40 *Cáncer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2764-72 y *Int J Mol Med.* 2002 Sep;10(3):339-44. Saitoh T, Katoh M. Los genes así identificados pueden ser utilizadas para diseñar nuevas estrategias anticancerígenas.

45 ii) Probar el efecto de fármacos sobre células bisagra sobre-proliferativas. Las células mutantes *SoxF* de la región bisagra pueden ser utilizadas en fases preclínicas de ensayos de fármacos anticancerígenos. Los fármacos pueden ser administrados a las larvas durante los estadios iniciales del desarrollo (en el alimento, por ejemplo) y el efecto puede ser evaluado en estadios posteriores del desarrollo (varios días después de la administración). Este podría ser una rápida y económica vía para realizar una preselección de fármacos antes de su ensayo en mamíferos.

50 iii) Cultivo celular de células mutantes *SoxF*. La única línea celular tumoral de *Drosophila* descrita es derivada de hemocitos (*mbn2*). La presente invención puede permitir establecer una línea celular específicamente derivada de células bisagra y una línea celular tumoral específica derivada de éstas.

55 iv) Bloquear la proliferación de células cancerígenas por administración de la proteína. La proteína codificada por el gen, o su ARN mensajero codificante, pueden ser utilizados para bloquear la proliferación celular por transfección de éstos en una línea celular humana mutante. Esto podría dar lugar a un bloqueo efectivo de la proliferación celular.

60 El gen *SoxF* es conocido en el estado de la técnica, con número de acceso en GenBank NM_079015 que también incluye la secuencia de la proteína. Es también conocido como *Sox15* o CG8404. En la presente invención se utiliza el término *SoxF* según se indica en Bowles J, Schepers G, Koopman P. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):239-55.

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.

65 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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

ES 2 345 526 B1

Breve descripción de las figuras

Figura 1 Disco imaginal de ala silvestre de larva de *Drosophila* de tercer estadio, teñido con rodamina-faloidina para marcar los contornos celulares. Se han marcado la región del ala y la del notum con flechas. La región del hinge es la que queda comprendida entre ambas zonas (también delimitada con flechas).

Figura 2 Disco imaginal de ala de larva de tercer estadio mutante para SoxF (individuos homocigóticos SoxF^{kg09145}). La pérdida de la función del gen Sox causa un sobrecrecimiento de la región del hinge.

Figura 3 Incorporación de BrdU en discos mutantes SoxF^{kg09145}. Este ensayo detecta las células que se encuentran proliferando. Se detecta un incremento de células BrdU-positivas en la región del hinge.

Figura 4 Supresión de la muerte celular en discos mutantes SoxF mediante expresión de la proteína inhibidora de caspasas P35. El disco de ala se ha teñido con rodamina-faloidina para visualizar los contornos celulares. En estas condiciones, el crecimiento de la región del hinge es todavía mayor, e incluye desorganización del tejido.

Figuras 5A y 5B Disco de ala de tercer estadio tardío, teñido con suero anti-SoxF (mareaje nuclear marcado con flechas, sólo visible en B), anticuerpo anti-Arm (lowa University Hybridoma Bank solo visible en A) que marca los perfiles celulares.

La expresión de SoxF es capaz de bloquear la proliferación inducida por una forma constitutivamente activa del transductor de la vía Wnt, Arm (ArmS10).

(A) La expresión de ArmS10 se ha dirigido al saco ("pouch") y la bisagra ("hinge") del disco. Se observa el sobrecrecimiento en la bisagra dorsal (marcado con flechas).

(B) Se dirige la coexpresión de SoxF y ArmS10 en los mismos dominios que en (A). No se observa sobrecrecimiento en la bisagra dorsal.

Figuras 6A y 6B Las imágenes muestran proyecciones de secciones confocales de la señal *wg-lacZ*. Los perfiles celulares se marcan con rodamina-faloidina (actina filamentososa). En los discos silvestres, se detectan dos anillos separados de *wg-lacZ*. En la condición mutante *soxF^{KG0914}* la expresión de *wg-lacZ* se extiende, de manera que no hay separación entre las bandas.

Figura 7 Clones de expresión ectópica de SoxF. Se han marcado las células que sobreexpresan SoxF. Fuera de la marca está el nivel de expresión de *wg* (ver figura 6). Las células que expresan ectópicamente SoxF pierden la expresión de *wg*.

Figura 8 Hibridación *in situ* fluorescente para detectar los transcritos SoxF en discos de genotipo *dpp-GAL4; UAS-GFP-wg*. La sobre-expresión de *wg* causa la sobreproliferación del hinge e induce la expresión de SoxF (flecha).

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 es la secuencia del gen SoxF de *Drosophila melanogaster*

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de la proteína codificada por el gen SoxF de *Drosophila melanogaster*

SEQ ID NO: 3 es un péptido utilizado en la inmunización de mamíferos para la obtención del anticuerpo policlonal

SEQ ID NO: 4 es un péptido utilizado en la inmunización de mamíferos para la obtención del anticuerpo policlonal.

Exposición detallada de modos de realización

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos policlonales

Se utilizó una estrategia con dos péptidos para obtener los anticuerpos policlonales. Los dos péptidos seleccionados para las inyecciones fueron los péptidos de SEQ ID NO 3 (aa 418-432: C+PSPSRAAKSRQEKLA-CONH2) y SEQ ID NO 4 (aa 606-621: CLKYPDTNQNYYDDYEA-CONH2).

Dos conejos fueron inyectados con ambos péptidos y los sueros de ambos conejos fueron recogidos. Antes de su análisis por inmunostaining, el suero fue bloqueado por pre-incubación sobre tejido fijado durante la noche a 4°C en PBT (Suero fisiológico PBS con el Detergente TRITON a 0.1%).

Los discos del ala fueron fijados durante 20 minutos a temperatura ambiente, en una solución de 3,7% de formaldehído diluido en PBS. Posteriormente fueron lavados 3 veces con PBT y fueron incubados toda la noche con el suero pre-absorbido anterior a una concentración de 1:300. El material fue lavado con PBT e incubado durante 1 h 30

ES 2 345 526 B1

min. con un anticuerpo secundario anti-conejo fluorescente en PBT (“fluorescent conjugated secondary antibody of anti rabbit”) (dilución 1:800). Después de lavar los discos, fueron montados en una solución de glicerol/PBS 50:50 y analizado con un microscopio confocal.

5

Ejemplo 2

Creación de un modelo tumoral en los discos del ala

10 Se observó una abundante muerte celular en la zona proliferativa de los discos del ala de individuos mutantes SoxF (bien en el nulo SoxF^{kg09145} o por inhibición de RNAi). Para inhibir la muerte celular (apoptosis) se co-expresó el inhibidor de caspasas P35 de baculovirus (Perez-Garijo, A., F. A. Martin, *et al.* 2004 Development 131(22): 5591-8). Específicamente, se creó una línea que incluye el constructo UAS-dsSoxF RNAi (disponible en la biblioteca pública VDCR <http://stockcenter.vdrc.at> como Transformant ID 45482) y el constructo UAS p35 (“Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. Bruce A. Hay, Tanya Wolff and Gerald M. Rubin Development 120, 2121-2129 (1994)”).

15 Los dos constructos fueron colocados bajo el control de MS209 (zfh2MS209, disponible en la base de datos pública flybase con el numero: FBal0143099 el cual dirige la expresión de los genes bajo el control de UAS (Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) Development 118, 401-415) específicamente en la posible bisagra del disco imaginal del ala.

20 Cuando dsSoxF RNAi y p35 fueron co-expresados, se observó un incremento en la sobre-proliferación, junto con una desorganización de alguna parte del tejido. Grupos de células alrededor y células dentro perdieron polaridad (como se demostró por DE-Cadherin immunostaining, utilizando el anticuerpo DCAD2 disponible en la base de datos de hibridomas <http://dshb.biology.uiowa.edu>), esto fue indicativo de la pérdida de estructura epitelial normal. Algunas células también se desprendieron del epitelio. Esta observación rememora el proceso de transición epitelio-mesenquimática (EMT, “epithelial mesenchymal transition”) que acompaña a la formación de metástasis (Jang AC, Starz-Gaiano M, Montell DJ., J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2007 Sep; 12(2-3): 103-14). Por lo tanto, la presente invención permitió la generación de un modelo para el estudio de la formación de tumores epiteliales en los discos del ala de Drosophila.

30 SoxF^{kg09145} es conocido con anterioridad, número de acceso en la base de datos flybase, <http://flybase.bio.indiana.edu/>, FlyBase ID: FBal0147414.

35 Se generó un alelo nulo, SoxF26a, que utilizado como el otro alelo SoxF^{kg09145} confirmó que el fenotipo observado es específico de la depleción del gen SoxF. El alelo SoxF26a se corresponde con una mutación caracterizada por una delección de una parte del gen SoxF que incluye el primer exon (dicha delección va desde 10096166 hasta 10102012 y una inserción del gen yellow (y) de Drosophila (de la base 249053 hasta la base 257289, GB:AE014298; release=r5.6).

40

SoxF26a:

45 TGCTGCATGCTCGTACCACTAAGTAGAGTAATTGCATGTGGAGGATCCG
TACTTAGCTAGTTGGCTGGATTCGAAAACAATAACCGGACTTAAATCAG
GGTGTTCCTCAAAGGTTCCAACC **10096286**

50

10102012

55 CTGCAAGAAATCAGACAGCTCCACTCCAAATCGAGCCCGATTCTGAAGTG
CTCCGATTTCTCGCTGTGCACCGCCAGGTAGGAGGTGCAGTTTGTGACT
CCTTATCGCTGATGGAGCCCGGCACACGTTGCTGTGGTCCAGGTCCGG
GCCTCATGCTTTGATGATGGCTGTCTGTTTCCGCGGCTCTTGCCGTTCT
60 GTTATGTAAGAAATACTTGGCAATAGCAACTGCGGTAGGTACGACCGCC
TGCAGATCGCACAGTTCGCCGCATCGAAGGAGTGTTCCGGCATCGCACA
ATTTGGTGGCCAATGTGTGGTTGACAATTAAGTTATTAGTGGAATGCATA
65 GTTTTCGAAACTGAAACTAAGAGCAAGTCCTGAGTTCGC

ES 2 345 526 B1

Este alelo es un nulo, que se ha generado en el desarrollo de la presente invención, se puede usar como el otro alelo SoxF^{kg09145} y permitió confirmar que el fenotipo observado es específico de la depleción del gen SoxF.

5 Ejemplo 3

Supresión del efecto de sobre-proliferación de la vía Wnt-Armadillo/beta-atenina

10 La sobre-expresión de wingless (wg), el homólogo Wnt-1 de Drosophila, conduce a una sobre-proliferación por activación de la vía Armadillo- β -catenina (C.J. Neumann and S. M. Cohen Development 122, 1781-1789 (1996)). Existe un gran número de tipos de tumores asociados a la activación constitutiva de esta vía en humanos.

15 Los experimentos realizados en la presente invención, mostraron en Drosophila, que la expresión de SoxF es suficiente para bloquear el efecto sobre-proliferativo inducido por la sobre-expresión de una señal constitutiva de Armadillo-beta-catenina.

Los genotipos fueron los siguientes:

20 Genotipo 1: UAS ArmS 10/MS 1096; UAS GFP (Timmons L. *Et al.* Dev

Genet. 1997;20(4):338-47).

Genotipo 2: UAS ArmS10/MS1096; UAS SoxF M2.

25 ArmS 10 es una forma no degradable de Arm y por lo tanto, activa la vía de señales Wnt cuando se expresa, a pesar de la presencia del ligando. El constructo UAS ArmS10 (Pai *et al.*, 1997, Development 124(11): 2255-2266) y la línea MS 1096 (w1118 P{GawB}Bx^{MS1096}) son descritos en Flybase FBal0093489.

30 UAS SoxF M2 fue generado por inserción de SoxF cDNA (genbank BT022122) en el plásmido PUASt (Brand AH, Perrimon N. Development. 1993 Jun;118(2):401-15). Este constructo fue inyectado y de este modo se obtuvieron moscas transgénicas siguiendo métodos estándar.

35 La figura 5 muestra como SoxF fue capaz de bloquear la proliferación inducida por ArmS10. (A) El constructo UAS ArmS10 está presente en el saco ("pouch") y la bisagra ("hinge"). Se observa el sobre-crecimiento en la bisagra dorsal. (B) El constructo UAS SoxF M2 está dirigido junto con UAS ArmS 10. No se observa sobre-crecimiento en la bisagra dorsal.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de la proteína codificada por el gen SoxF de *Drosophila melanogaster* o sus mutantes, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

2. Uso de la proteína codificada por el gen SoxF de *Drosophila melanogaster* para bloquear la señal Wnt relacionada con la progresión del cáncer.

10 3. Uso de la proteína codificada por el gen SoxF de *Drosophila melanogaster* en la preparación de un medicamento para bloquear la proliferación de células cancerígenas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1:

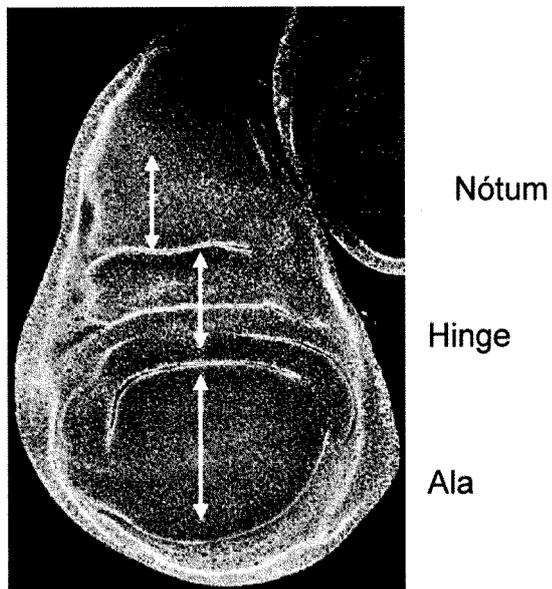


Figura 2:



Figura 3:

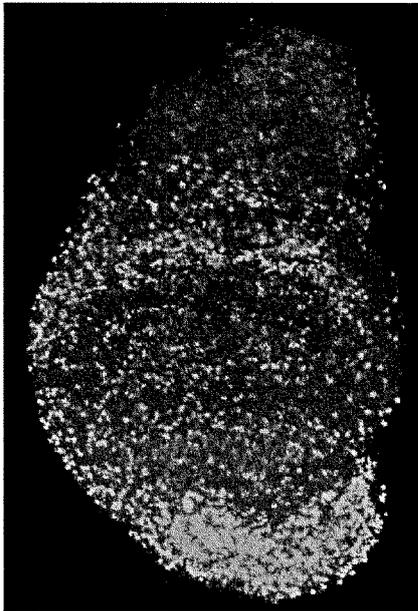


Figura 4:



Figuras 5A y 5B

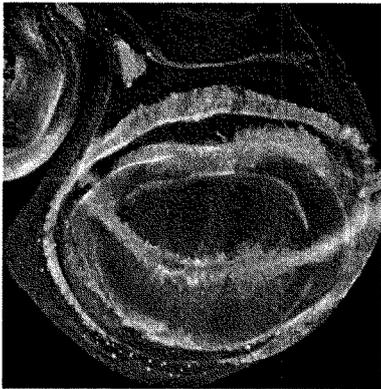


A

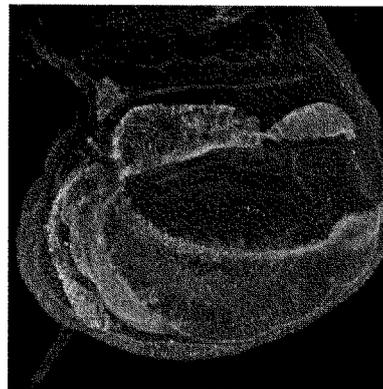


B

Figuras 6A y 6B



A



B

Figura 7

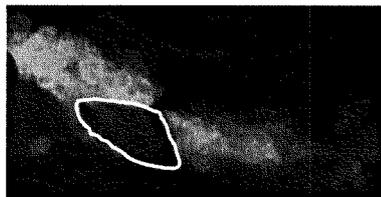


Figura 8



ES 2 345 526 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Pablo de Olavide

5 <120> Gen Sox F de Drosophila con actividad supresora de tumores y usos del mismo

<130>

10 <160> 4

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 2355

<212> DNA

20 <213> *Drosophila melanogaster*

<400> 1

atggaaccct catatgatca cgaacatcca catcatctgc taacaaatta caattcgaaa
60

25 aagtatccgc acgtctcgcg cactccggag tacagtcact ccaccggcag cgattatccg
120

30 gagcacggtg gctatctgac ggatggacgc ctgatgcacg agagcaacag cgatgccggg
180

atctaccacg tgcgccaggg aagcgcgac tcctcgcca gtctgcactc gccagccata
240

35 cagagctccg gatacgagaa tgagcacctg aacgaggcgg ttctggccgc gcacagccac
300

40 agtcactcgc ccatgccgat ggtgtccagt gcctatgtgg gcggaggaac tgcctccgga
360

tcgctgatta acagcaatat tcctctgctc ggtggcggcg gtaattccgt actgaacaaa
420

45 tttctatcgc atccgcacgc tggcatggtg ggcggtggaa ccggacagat ggaggactgc
480

50 acatcgcact cgccaattga agcggcgtcc atgtggagct acgactaaa gggcgacctg
540

tgccgcgcca attgtggcta tctggagcga cacaagccgc tgcccgcga ccttaagtat
600

55 cggcccggcg gaaccagtc aaaaagtgcc aaagaatcgc gcatccggcg gccgatgaac
660

60 gccttcatgg tctgggcca a gatcgcgac aagaagctgg ccgacgagaa tcccgatctg
720

cataatgccg acctcagcaa gatgttggga aaaaaatggc gatcgcctgac gccgcaagat
780

65

ES 2 345 526 B1

cgcagaccct acgtggagga ggcggagcgt ctgcgggtga ttcacatgac ggagcatccg
840

5 aactacaagt accgaccccg acgacgcaag cagtccaagc tgcggggccat gcagccgggc
900

ggcaaggagc agagcgagag ttcacccaat cggggcactg gtggatccaa gtcgaatccc
10 960

aagctggcca caccaccggt ggccaccgca tcatccagct atacaacgcc caccgacgaa
1020

15 agcacctgca attccacgaa ccagaatcac ggacaatcaa ctccgggtgg cctgtacgag
1080

caaccgctga agcccacgta ctgcccagt tccgtggact gctacagcaa tgcggacagc
20 1140

acggaacaga tcgagtcact ggccgccaac tgtccgcccg cctgtctcaa tgaatcgctc
1200

25 cccacggggc gtggctaoga caactcgctg ttgctcaaga agttaaccaa gccgtcgccg
1260

agtcgtgccc ccaagtgcg ccaggagaag ctggccaagt ccgaggagaa gaacaagggg
30 1320

tcacaatgac agggacagtc tcagcaaggt atatatgctg ccacctatcc gctagcacc
1380

35 acctccgtgg ccgtgggtgg ccgacggggg atgtacgtga cgtgcaacaa tcggggattg
1440

ctggatcatg gtcactccgt caagggcaca ttctatccac cagtatccgt ttcggaagat
40 1500

gacaatagca cctcaatgcg gaacagcatt agtgctctgc agcagcactg taatgtggtc
1560

45 acaagtacac cctcaagctc cggcggcacc atgccaaacca gcgagatgag cagctacacg
1620

gtctccatgg cggataactg cggaaatctc aggctcagca tgaacgagtt gtcgggcaat
50 1680

gagtatctgc ccagcgccaa tgcctatggg atgcaatacg aggacttctt gcgctatcag
1740

55 agcaacgata tggactactc aacgtcggcg gtggagcaca aggagaccac atcggattcg
1800

gcgagcggcc agaagtgcct taagtatccg gacacgaatc agaactacga cgactacgag
60 1860

gcgaggcct acagtaacgc catgctgctt gcaacggcag ctagctacta caccacaactt
1920

65 ccgtatccgc ccacctcgtt ggccgccttt cctctccagc tggccgtgcc gttccagcag
1980

ES 2 345 526 B1

```

acgacatcgg ggcctacgg agcgcagccc attcagagtg gttacctgca ctacggcaac
2040

5   tatggcggat acgaggggaat ggcccagagt cagccacaga accaagcgcc cgtccacat
    2100

    cagcaggcat cccactcggc tccgccctcc ctgtcagtgc cacccaacca gacggtgacc
10   2160

    tccaattcgg cagcaattag catgcagcag caccatcatc atcactttgg acccgcaccc
    2220

15   ggcatggtgg gcgtgggctg gggagtgggc gtcggagtgc gagtcggtga gatgctcttc
    2280

    gagcagcagc agcgcгааага tgatgagatt agcaacattc tggcaggagt gcgcaagacc
20   2340

    tgctacagca attga
    2355

25 <210> 2
    <211> 784
    <212> PRT
    <213> Drosophila melanogaster
30
    <400> 2

    Met Glu Pro Ser Tyr Asp His Glu His Pro His His Leu Leu Thr Asn
35   1          5          10          15

    Tyr Asn Ser Lys Lys Tyr Pro His Val Ser Arg Thr Pro Glu Tyr Ser
40           20          25          30

    His Ser Thr Gly Ser Asp Tyr Pro Glu His Gly Gly Tyr Leu Thr Asp
45           35          40          45

    Gly Arg Leu Met His Glu Ser Asn Ser Asp Ala Gly Ile Tyr His Val
50          50          55          60

    Arg Gln Gly Ser Glu His Ser Ser Pro Ser Leu His Ser Pro Ala Ile
55          65          70          75          80

    Gln Ser Ser Gly Tyr Glu Asn Glu His Leu Asn Glu Ala Val Leu Ala
60           85          90          95

    Ala His Ser His Ser His Ser Pro Met Pro Met Val Ser Ser Ala Tyr
65           100         105         110

    Val Gly Gly Gly Thr Ala Ser Gly Ser Leu Ile Asn Ser Asn Ile Pro

```

ES 2 345 526 B1

| | 115 | 120 | 125 |
|----|--|--|---------|
| 5 | Leu Leu Gly Gly Gly Gly 130 | Asn Ser Val Leu Asn Lys Phe Leu Ser His 135 | |
| 10 | Pro His Ala Gly Met Val Gly Gly Gly Thr Gly Gln Met Glu Asp Cys 145 | 150 | 155 160 |
| 15 | Thr Ser His Ser Pro Ile Glu Ala Ala Ser Met Trp Ser Tyr Asp Tyr 165 | 170 | 175 |
| 20 | Lys Gly Asp Leu Cys Ala Pro Asn Cys Gly Tyr Leu Glu Arg His Lys 180 | 185 | 190 |
| 25 | Pro Leu Pro Ala Asp Leu Lys Tyr Arg Pro Gly Gly Thr Gln Ser Lys 195 | 200 | 205 |
| 30 | Ser Ala Lys Glu Ser Arg Ile Arg Arg Pro Met Asn Ala Phe Met Val 210 | 215 | 220 |
| 35 | Trp Ala Lys Ile Glu Arg Lys Lys Leu Ala Asp Glu Asn Pro Asp Leu 225 | 230 | 235 240 |
| 40 | His Asn Ala Asp Leu Ser Lys Met Leu Gly Lys Lys Trp Arg Ser Leu 245 | 250 | 255 |
| 45 | Thr Pro Gln Asp Arg Arg Pro Tyr Val Glu Glu Ala Glu Arg Leu Arg 260 | 265 | 270 |
| 50 | Val Ile His Met Thr Glu His Pro Asn Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Arg 275 | 280 | 285 |
| 55 | Arg Lys Gln Ser Lys Leu Arg Ala Met Gln Pro Gly Gly Lys Glu Gln 290 | 295 | 300 |
| 60 | Ser Glu Ser Ser Pro Asn Pro Gly Thr Gly Gly Ser Lys Ser Asn Pro 305 | 310 | 315 320 |
| 65 | Lys Leu Ala Thr Pro Pro Leu Ala Thr Ala Ser Ser Ser Tyr Thr Thr 325 | 330 | 335 |
| 70 | Pro Thr Asp Glu Ser Thr Cys Asn Ser Thr Asn Gln Asn His Gly Gln 340 | 345 | 350 |

ES 2 345 526 B1

His Lys Glu Thr Thr Ser Asp Ser Ala Ser Gly Gln Lys Cys Leu Lys
 595 600 605
 5
 Tyr Pro Asp Thr Asn Gln Asn Tyr Asp Asp Tyr Glu Ala Glu Ala Tyr
 610 615 620
 10
 Ser Asn Ala Met Leu Pro Ala Thr Ala Ala Ser Tyr Tyr Thr Gln Leu
 625 630 635 640
 15
 Pro Tyr Pro Pro Thr Ser Leu Ala Ala Phe Pro Leu Gln Leu Ala Val
 645 650 655
 20
 Pro Phe Gln Gln Thr Thr Ser Gly Ala Tyr Gly Ala Gln Pro Ile Gln
 660 665 670
 25
 Ser Gly Tyr Leu His Tyr Gly Asn Tyr Gly Gly Tyr Glu Gly Met Ala
 675 680 685
 30
 Gln Ser Gln Pro Gln Asn Gln Ala Pro Val His His Gln Gln Ala Ser
 690 695 700
 35
 His Ser Ala Pro Pro Ser Leu Ser Val Pro Pro Asn Gln Thr Val Thr
 705 710 715 720
 40
 Ser Asn Ser Ala Ala Ile Ser Met Gln Gln His His His His His Phe
 725 730 735
 45
 Gly Pro Ala Pro Gly Met Val Gly Val Gly Val Gly Val Gly Val Gly
 740 745 750
 50
 Val Gly Val Gly Glu Met Leu Phe Glu Gln Gln Gln Arg Lys Asp Asp
 755 760 765
 55
 Glu Ile Ser Asn Ile Leu Ala Gly Val Arg Lys Thr Cys Tyr Ser Asn
 770 775 780

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

60

<220>

<223> péptido utilizado en la inmunización de mamíferos para la obtención del anticuerpo policlonal

65

ES 2 345 526 B1

<400> 3

5 Pro Ser Pro Ser Arg Ala Ala Lys Ser Arg Gln Glu Lys Leu Ala
 1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

15 <223> péptido utilizado en la inmunización de mamíferos para la obtención del anticuerpo policlonal

<400> 4

20 Cys Leu Lys Tyr Pro Asp Thr Asn Gln Asn Tyr Asp Asp Tyr Glu Ala
 1 5 10 15

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 526

② Nº de solicitud: 200900052

③ Fecha de presentación de la solicitud: **09.01.2009**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/17** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | YAN HONG-TAO et al. "Overexpression of SOX15 inhibits proliferation of NT2/D1 cells derived from a testicular embryonal cell carcinoma". Molecules and cells. 31.12.2007. Vol. 24. Nº. 3. Páginas 323-328. ISSN 1016-8478 (Print). | 1,3 |
| A | | 2 |
| X | GUO LIZHENG et al. "Sox7 is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells". Molecular Cancer Research. Sep. 2008. Vol. 6. Nº. 9. Páginas 1421-1430. ISSN 1541-7786. | 1,3 |
| A | MASARU KATOH et al. "WNT/PCP signaling pathway and human cancer". Oncology reports. 01.01.2006. Vol. 14. Nº. 6. Páginas 1583-1588. | 2 |
| A | WO 2006128025 A2 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 30.11.2006 | 2 |

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
09.09.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

A61K, 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, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.09.2010

Declaración

| | | | |
|--|------------------|-----|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | 2 | SÍ |
| | Reivindicaciones | 1,3 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | 2 | SÍ |
| | Reivindicaciones | 1,3 | NO |

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 | Yan Hong-Tao et al. "Overexpression of SOX15 inhibits proliferation of NT2/D1 cells derived from a testicular embryonal cell carcinoma". <i>Molecules and cells</i> . 31.12.2007. Vol. 24. Nº. 3. Páginas 323 - 328. ISSN 1016-8478 (Print). | 31-12-2007 |
| D02 | Guo Lizheng et al. "Sox7 is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells". <i>Molecular Cancer Research</i> . Sep. 2008. Vol. 6. Nº. 9. Páginas 1421-1430. ISSN 1541-7786. | 2008 |
| D03 | Masaru Katoh et al. "WNT/PCP signaling pathway and human cancer". <i>Oncology reports</i> . 01.01.2006. Vol. 14. Nº. 6. Páginas 1583-1588. | 01-01-2006 |
| D04 | WO 2006128025 A2 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER) 30.11.2006. | 30-11-2006 |

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 presente solicitud divulga la generación de un modelo para el estudio de la formación de tumores epiteliales en los discos del ala de *Drosophila*, en base al descubrimiento de que la expresión de la proteína SoxF, en *Drosophila* bloquea el efecto sobre-proliferativo inducido por la sobre-expresión de una señal constitutiva de la vía Wnt-Armadillo/beta catenina.

En base a este descubrimiento se reivindica el uso de la proteína SoxF (Sox15) de *Drosophila melanogaster* en:

- 1) La preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 2) Bloquear la señal Wnt relacionada con la progresión del cáncer
- 3) La preparación de un medicamento para bloquear la proliferación de células cancerígenas.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan el uso de la proteína SoxF de *Drosophila* para los usos que se reivindican, por lo que las reivindicaciones 1-3 serían nuevas, según se menciona en el art. 6 de la LP .

D01, como documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, describe el papel que juegan algunos miembros de la familia de las proteínas SOX en la regulación de la proliferación celular. En concreto se muestra el papel que tiene la sobreexpresión de Sox 15 sobre la inhibición del crecimiento en células NT2/D1 extraídas de células de carcinoma testicular humano. La diferencia entre D01 y el objeto de la invención reflejado en las reivindicaciones 1-3 sería la procedencia de SoxF. El efecto técnico sería la generación de un modelo para el estudio de la formación de tumores en *Drosophila*. Por tanto, el problema que plantea la presente invención sería la provisión de un modelo para el estudio de tumores basado en la familia de proteínas SOX. La reivindicación 2 ofrece una solución al problema planteado ya que muestra la utilidad de SoxF de *Drosophila* en el bloqueo de la proliferación celular mediado por la vía Wnt/beta-catenin. Esa solución no se deriva de manera obvia del estado de la técnica, pues aunque D02 muestra la relación de Sox7 en la proliferación celular mediada por la vía Wnt y beta-catenina, no da ninguna indicación de la cómo funciona ese mecanismo en *Drosophila*. Así pues, la reivindicación 2 tendría actividad inventiva, según lo mencionado en el art. 8 de la LP.

Sin embargo las reivindicaciones 1, 3 no resuelve el problema fruto de la diferencia entre D01 y el objeto de la solicitud. Tales reivindicaciones se refieren a la mera expresión de un propósito, que no encuentra base clara en la descripción, como es el de, una vez descubierto un mecanismo de acción de una proteína basada en el crecimiento celular, expresar el deseo de que se pueda utilizar la misma en la preparación de un medicamento contra el cáncer. Es obvio para el experto en la materia que el estudio de modelos de inhibición de proliferación celular, pueda encontrar como propósito final la posible aplicación de la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Así pues, tales reivindicaciones carecerían de actividad inventiva.