

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 457**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2014 PCT/EP2014/073597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063306**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2014 E 14805189 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3066196**

54 Título: **Variantes de superóxido dismutasa de manganeso y usos de las mismas**

30 Prioridad:

04.11.2013 IT RM20130608
25.07.2014 EP 14178505

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2020

73 Titular/es:

MANCINI, ALDO (100.0%)
Via F. Verrotti, 4
80128 Napoli, IT

72 Inventor/es:

MANCINI, ALDO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 763 457 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de superóxido dismutasa de manganeso y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a las variantes de proteínas de superóxido dismutasa de manganeso y los usos de las mismas. En particular, las proteínas de la invención tienen aplicaciones médicas y de diagnóstico. En particular, para el tratamiento y/o la prevención de tumores, de enfermedades caracterizadas por un exceso de radicales libres, y de enfermedades inflamatorias nuevas.

Antecedentes de la técnica

10 Recientemente se descubrió y aisló una nueva isoforma de MnSOD de la línea celular de liposarcoma humano (LSA). La MnSOD de tipo LSA difiere de la MnSOD humana de tipo salvaje en una única sustitución de treonina con isoleucina en el aminoácido 82, y su MW (peso molecular) (alrededor de 30 kDa) es significativamente mayor que el de la MnSOD convencional (24 kDa). Además, a diferencia de la MnSOD de tipo salvaje, que normalmente permanece confinada a la matriz mitocondrial (Hunter et al., 1997), la MnSOD de tipo LSA se libera de los adipocitos en el medio (Mancini et al., 2006). Como lo demuestran Mancini et al. (Mancini et al., 2008), la MnSOD recombinante de tipo LSA (rMnSOD) 15 tiene una capacidad distintiva para penetrar y matar las células cancerosas que expresan receptores de estrógenos, sin tener efectos citotóxicos en las células normales. La actividad oncotóxica de rMnSOD se debe a un aumento en el nivel de oxidantes tanto en las células tumorales como en las leucémicas, que contienen bajos niveles de catalasa (Pica et al., 2010).

20 La leucemia es la neoplasia maligna infantil más común en todo el mundo. Una amplia evidencia ha demostrado que las alteraciones del metabolismo del estrés oxidativo son una característica común de las células tumorales transformadas (Skarstein et al., 2000). Tanto las alteraciones de los antioxidantes como los aumentos en la producción de especies reactivas al oxígeno juegan un papel en varias etapas de la carcinogénesis (Malyszczak et al., 2005). El daño del ADN mediado por radicales como resultado de los incidentes de "daño oxidativo" conduce a la detención o inducción de las vías de transducción de señales de transcripción, errores de replicación e inestabilidad genómica y 25 representa el primer paso relacionado con mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Cooke et al., 2003; Valko et al., 2006).

30 Las células leucémicas producen mayores cantidades de ROS (por la versión en inglés de especies reactivas de oxígeno) que las células no leucémicas, ya que están bajo un estado repetido de bloqueo oxidativo (Al-Gayyar et al., 2007; Battisti et al., 2008). Además, el estrés oxidativo puede inhibir o promover la apoptosis, dependiendo de la intensidad de los estímulos oxidantes. De hecho, la apoptosis es inducida por estímulos de oxidación moderada y necrosis por un intenso efecto oxidante (Valko et al., 2006). Existe evidencia de que la activación constitutiva de las vías MAPK y PI3K ocurre con frecuencia en el cáncer humano, posiblemente debido a la alteración de genes que codifican componentes clave de estas vías o la activación anterior de los receptores de la superficie celular como resultado de mutaciones o amplificación (Schubbert et al., 2007; Courtney et al., 2010). La señalización desregulada 35 debido a la activación constitutiva de estas vías podría conducir al crecimiento y supervivencia celular descontrolados, lo que da como resultado la transformación y progresión oncogénicas (De Luca et al., 2012).

40 La superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa se encuentran entre los antioxidantes enzimáticos más eficaces. Tres tipos de SOD se encuentran presentes en los tejidos humanos: Cu/Zn-SOD citoplasmático, Cu/ZnSOD extracelular (ecSOD) y MnSOD mitocondrial (Wann et al., 1994). La MnSOD se sintetiza en el citoplasma y luego se conduce a la matriz mitocondrial, donde posteriormente se divide en su forma madura y enzimáticamente activa. Los datos informados sobre enzimas antioxidantes en diferentes tipos de cáncer humano son controvertidos. Además, los niveles alterados de enzimas antioxidantes (SOD, CAT) y antioxidantes no enzimáticos son evidentes en muchas células cancerosas humanas (Mc Eligot et al., 2005). Se ha demostrado que las actividades de SOD y CAT disminuyen en la leucemia linfoblástica aguda (ALL, por su versión en inglés) y la leucemia linfocítica crónica (Oltra et al., 2001). Por 45 ejemplo, la actividad de CAT se reduce en pacientes recién diagnosticados de ALL, en pacientes de inducción de remisión y mantenimiento de remisión en comparación con sujetos sanos (Battisti et al., 2008). Los niveles de expresión SOD entre los diversos tipos de cáncer y etapas exhiben heterogeneidad que puede relacionarse tanto a los diferentes niveles óptimos de estrés oxidativo entre los diversos tipos de cáncer como al uso de vías alternativas en respuesta al estrés oxidativo.

50 Recientemente, las alteraciones mitocondriales en las células cancerosas se han reconocido como un objetivo para la terapia del cáncer (Barbosa et al., 2012). A pesar del progreso reciente en la terapia, aproximadamente el 25% de los niños y el 50% al 70% de los adultos con T-ALL desarrollan una enfermedad resistente al tratamiento (Goldenberg et al., 2003), lo que conlleva un mal pronóstico (Bassan et al., 2004). En la presente invención, el inventor evaluó la función biológica de rMnSOD (forma larga y corta) para determinar su efecto oncotóxico sobre las células T-ALL y 55 Jurkat de alto riesgo pediátrico y su influencia en la apoptosis y la proliferación celular mediada por la vía MAPK y AKT.

Los usos médicos y de diagnóstico de la MnSOD humana están indicados en EPO284105, Mancini et al., 2006, WO 03/072768, Ruggiero et al., 2013, WO 2008/063802, Kanwar et al., 2007). Sin embargo, todavía existe la necesidad de agentes terapéuticos y de diagnóstico basados en MnSOD.

Descripción de la invención

- 5 El autor secuenció el ADNc completo de rMnSOD y observó que la secuencia génica que codifica la porción C-terminal de rMnSOD en el extremo 3', difiere en longitud y secuencia de la de la molécula nativa (MnSOD tipo salvaje o tipo s) depositada en la base de datos mundial (UniProtKB/Swiss-Prot: P04179.1), como se muestra a continuación.

Secuencia de aminoácidos y expresión génica de MnSOD tipo s. (UniProtKB/Swiss-Prot: P04179.1, SEQ ID NO: 5)

MLSRVAVCGTSRQLAPALGYLGSRQKHSLPDLPYDYGALEPHINAQIMQLHHSKHHAA
 YVNNLNVTEEKYQEALAKGDVTAQIALQPALKFNNGGHINHSIFWTNLSPNGGGEPKG
 ELLEAIKRDFGSFDKFKELTAASVGVQGSWGWLGFNKERGHQLIAACPNQDPLQG
 TTGLIPLLGIDVWEHAYYLQYKNVRPDYKAIWNVINWENVTERYMACKK

- 10 Secuencia de nucleótidos del MnSOD tipo s (superóxido dismutasa 2 de homo sapiens, (SOD2) mitocondrial, gen nuclear que codifica la proteína mitocondrial, variante de transcripción 1, ARNm

Secuencia de referencia NCBI: NM_000636.2 (SEQ ID NO: 6)

GCGGTGCCCTTGCGGCGCAGCTGGGGTCGCGGCCCTGCTCCCCGCGCTTTCTTAAG
 GCCCGCGGGCGGCGCAGGAGCGGCACTCGTGGCTGTGGTGGCTTCGGCAGCGGCT
 TCAGCAGATCGGCGGCATCAGCGGTAGCACCAGCACTAGCAGCATGTTGAGCCGG
 GCAGTGTGCGGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGTTTTGGGGTATCTGGGCTCCAG
 GCAGAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTACGGCGCCCTGGAACCTCACA
 TCAACGCGCAGATCATGCAGCTGCACCACAGCAAGCACCACGCGGCCTACGTGAA
 CAACCTGAACGTCACCGAGGAGAAGTACCAGGAGGCGTTGGCCAAGGGAGATGTT
 ACAGCCCAGATAGCTCTTCAGCCTGCACTGAAGTTCAATGGTGGTGGTCATATCAA
 TCATAGCATTTTCTGGACAAACCTCAGCCCTAACGGTGGTGGAGAACCCAAAGGGG
 AGTTGCTGGAAGCCATCAAACGTGACTTTGGTTCCTTTGACAAGTTTAAGGAGAAG
 CTGACGGCTGCATCTGTTGGTGTCCAAGGCTCAGGTTGGGGTTGGCTTGGTTTCAAT
 AAGGAACGGGGACACTTACAAATTGCTGCTTGCCAAATCAGGATCCACTGCAAG
 GAACAACAGGCCTTATTCCACTGCTGGGGATTGATGTGTGGGAGCACGCTTACTAC
 CTTCAGTATAAAAATGTCAGGCCTGATTATCTAAAAGCTATTTGGAATGTAATCAA
 CTGGGAGAATGTAAGTAAAGATAACATGGCTTGCAAAAAGTAAACCACGATCGTT
 ATGCTGAGTATGTTAAGCTCTTTATGACTGTTTTTGTAGTGGTATAGAGTACTGCAG
 AATACAGTAAGCTGCTCTATTGTAGCATTTCTTGATGTTGCTTAGTCACTTATTTCA
 TAAACAACCTAATGTTCTGAATAATTTCTTACTAAACATTTTGTATTGGGCAAGTG
 ATTGAAAATAGTAAATGCTTTGTGTGATTGAATCTGATTGGACATTTTCTTCAGAGA

GCTAAATTACAATTGTCATTTATAAAACCATCAAAAATATTCCATCCATATACTTTG
 GGGACTTGTAGGGATGCCTTTCTAGTCCTATTCTATTGCAGTTATAGAAAATCTAGT
 CTTTTGCCCCAGTTACTTAAAAATAAAATATTAACACTTTCCCAAGGGAAACACTC
 GGCTTTCTATAGAAAATTGCACTTTTTGTGCGAGTAATCCTCTGCAGTGATACTTCTG
 GTAGATGTCACCCAGTGGTTTTTTGTTAGGTCAAATGTTCCCTGTATAGTTTTTTGCAAA
 TAGAGCTGTATACTGTTTAAATGTAGCAGGTGAACTGAACTGGGGTTTTGCTCACCT
 GCACAGTAAAGGCAAACCTTCAACAGCAAACTGCAAAAAGGTGGTTTTTTGCAGTA
 GGAGAAAGGAGGATGTTTATTTGCAGCCAAGCAAGGAGAATTGGGCAGCTCATGC
 TTGAGACCCAATCTCCATGATGACCTACAAGCTAGAGTATTTAAAGGCAGTGGTAA
 ATTCAGGAAAGCAGAAGTT

En la presente invención, se produjeron dos genes sintéticos, uno identificado con el acrónimo sp24-MnSOD_Sint o forma larga de rMnSOD (SEQ ID NO: 1) y la proteína recombinante correspondiente SP24-MnSOD_SINT o rMnSOD de forma larga (SEQ ID NO: 2) y otro identificado con el acrónimo rMnSOD corta (SEQ ID NO: 3) y la correspondiente proteína recombinante SP6-MnSOD o forma corta de rMnSOD (SEQ ID NO: 4) de la siguiente manera:

5

Secuencia de nucleótidos de forma larga de rMnSOD (SEQ ID NO: 1)

GAATTCATGTTGAGCCGGGCAGTGTGCGGCACCAGCAGGCAGCTGGCTCCGGCTTT
GGGGTATCTGGGCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTACG
 GCGCCCTGGAACCTCACATCAACGCGCAGATCATGCAGCTGCACCACAGCAAGCA
 CCACGCGGCCTACGTGAACAACCTGAACGTCACCGAGGAGAAGTACCAGGAGGCG
 TTGGCCAAGGGAGATGTTACAGCCCAGATAGCTCTTCAGCCTGCACTGAAGTTCAA
 TGGTGGTGGTCATATCAATCATAGCATTTTCTGGACAAACCTCAGCCCTAACGGTG
 GTGGAGAACCCAAAGGGGAGTTGCTGGAAGCCATCAAACGTGACTTTGGTTCCTTT
 GACAAGTTTAAGGAGAAGCTGACGGCTGCATCTGTTGGTGTCCAAGGCTCAGGTTG
 GGGTTGGCTTGGTTTCAATAAGGAACGGGGACACTTACAAATTGCTGCTTGCCAA
 ATCAGGATCCACTGCAAGGAACAACAGGCCTTATTCCACTGCTGGGGATTGATGTG
 TGGGAGCACGCTTACTACCTTACAGTATAAAAATGTCAGGCCTGATTATCTAAAAGC
 TATTTGGAATGTAATCAACTGGGAGAATGTAAGTAAAGATAACATGGCTTGCAAAA
 ATAAGAACTCATGTTGAAAGCTT

Secuencia de aminoácidos de la forma larga de rMnSOD (SEQ ID NO: 2)

MLSRAVCGTSRQLAPALGYLGSRQKHSLPDLPYDYGALEPHINAQIMQLHHSKHAA
YVNNLNVTEEKYQEALAKGDVTAQIALQPALKFNNGGHINHSIFWTNLSPNGGGEPKG
 ELLEAIKRDFGSFDKFKELTAASVGVQGSWGWLGFNKERGHQLIAACPNQDPLQG
 TTGLIPLLIDVWEHAYYLQYKNVRPDYKAIWNVINWENVTERYMACKVKNSC

10

subrayado: la secuencia del péptido líder; *cursiva*: secuencia de la proteína mutada en C-terminal

Secuencia de nucleótidos de rMnSOD corto (SEQ ID NO: 3)

GAATTCGCAGTGTGCGGCACCGGGAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTA
 CGGCGCCCTGGAACCTCACATCAACGCGCAGATCATGCAGCTGCACCACAGCAAG
 CACCACGCGGCCTACGTGAACAACCTGAACGTCACCGAGGAGAAGTACCAGGAGG
 CGTTGGCCAAGGGAGATGTTACAGCCCAGATAGCTCTTCAGCCTGCACTGAAGTTC
 AATGGTGGTGGTCATATCAATCATAGCATTTTCTGGACAAACCTCAGCCCTAACGG
 TGGTGGAGAACCCAAAGGGGAGTTGCTGGAAGCCATCAAACGTGACTTTGGTTCCT
 TTGACAAGTTTAAGGAGAAGCTGACGGCTGCATCTGTTGGTGTCCAAGGCTCAGGT
 TGGGGTTGGCTTGGTTTCAATAAGGAACGGGGACACTTACAAATTGCTGCTTGCC
 AAATCAGGATCCACTGCAAGGAACAACAGGCCTTATCCACTGCTGGGGATTGATG
 TGTGGGAGCACGCTTACTACCTTCAGTATAAAAAATGTCAGGCCTGATTATCTAAAA
 GCTATTTGGAATGTAATCAACTGGGAGAATGTAAGTAAAGATACATGGCTTGCAA
 AAATAAGAACTCATGTTGAAAGCTT

Secuencia de aminoácidos de la forma corta de rMnSOD de la proteína (SEQ ID NO: 4)

AVCGTGKHSLPDLPYDYGALEPHINAQIMQLHHSKHHAAYVNNLNVTEEKYQEALAK
 GDVTAQIALQPALKFNNGGHINHSIFWTNLSPNGGGEPKGELLEAIKRDFGSFDKFKEK
 LTAASVGVQGSWGWLGFNKERGHQLQIAACPNQDPLQGTTGLIPLLIDVWEHAYYL
 QYKNVRPDYLKAIWNVINWENVTERYMACK/KNSC

- 5 Referencias: **GAATTC**: sitio de restricción EcoRI; **AAGCTT**: sitio de restricción *Hind*III; **ATG**: inicio de la cola larga de la proteína

Se examinó la actividad enzimática, el efecto citotóxico en las células tumorales, la capacidad de internalizarse en células normales y tumorales y la dosis cuantitativa de manganeso de las nuevas proteínas en comparación con la MnSOD comparativa.

- 10 SP24-MnSOD_Sint (forma larga de rMnSOD) y SP6-MSOD_SINT (forma corta de rMnSOD) se caracterizan por:
1. Mayor solubilidad en la mayoría de los tampones en los que se disuelve en comparación con la proteína de tipo salvaje.
 2. Estabilidad mejorada y mayor rendimiento de purificación después de la expresión en *Escherichia coli*.
 3. Mayor capacidad de penetrar las células en comparación con otras proteínas similares (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8).

15 En la presente invención, el inventor también probó la efectividad de la rMnSOD (formas largas y cortas) en células leucémicas T, células Jurkat y linfocitos normales. Los resultados confirman que las células leucémicas T pueden internalizar rMnSOD (formas largas y cortas) y que la rMnSOD (formas largas y cortas) causa apoptosis del 99% de las células leucémicas sin mostrar efectos tóxicos en las células sanas. Usando microscopía de luz y electrónica, el inventor determinó que una concentración de forma larga de rMnSOD de 0,067 μ M es más eficaz en la inducción de apoptosis. El análisis de transferencia Western mostró que el tratamiento con 0,067 μ M de forma larga de rMnSOD dio como resultado una alta expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y una baja expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en células leucémicas. Con respecto a la vía de transducción de señales, no se observó influencia después del tratamiento, excepto para las células Jurkat que mostraron una expresión ligeramente disminuida de fosforilación de ERK. El autor obtuvo resultados similares también con la forma corta. Estos resultados sugieren que la forma larga o corta de rMnSOD puede ser una opción de tratamiento eficaz para la leucemia de células T, aunque no es tóxica para las células sanas.

20 En el presente documento se describe una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 1, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de las mismas. Preferiblemente, la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma se pueden obtener por un procedimiento que comprende introducir en un organismo huésped, preferiblemente bacterias, más preferiblemente *E.coli*, la secuencia

de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 1. La proteína puede comprender una secuencia de aminoácidos comprendida en el siguiente grupo: SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, variantes funcionales, derivados y fragmentos de la misma. En particular, la proteína, las variantes funcionales, los derivados y los fragmentos de la misma de la invención pueden comprender una secuencia TAG. Las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de las proteínas que comprenden o consisten en la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 mantienen las propiedades biológicas y el efecto terapéutico de las proteínas. En la presente invención, los términos "mutación" o "derivado" o "variante", tal como se usan en el contexto de la presente invención, pueden entenderse como sustitución, delección y/o adición de un solo aminoácido en la secuencia diana. Preferiblemente, la mutación de la secuencia diana es una sustitución. El reemplazo se puede hacer con un aminoácido codificado genéticamente o un aminoácido no codificado genéticamente. Los ejemplos de aminoácidos no codificados genéticamente son homocisteína, hidroxiprolina, omitina, hidroxilisina, citrulina, carnitina, etc.

Las proteínas de la invención tienen una fuerte acción antioxidante y antiinflamatoria y se aplican con éxito en cualquier circunstancia de desequilibrio oxidativo que produce radicales libres excesivos. La descripción se refiere a la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma como se definió anteriormente para uso médico y/o diagnóstico, preferiblemente para uso en el tratamiento y/o la prevención y/o el diagnóstico de una enfermedad caracterizada por un exceso de radicales libres, como, por ejemplo, enfermedad vascular, que incluye enfermedad cardíaca, coronaria o vascular periférica, miocardiopatía dilatada, aneurisma, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, demencia y trastornos neurodegenerativos, envejecimiento, diabetes, trastornos autoinmunes con artritis reumatoide, enfermedad ocular, en particular una enfermedad de la retina o del cristalino, catarata, cirrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

Las proteínas de la invención pueden preservar los órganos de trasplante durante más de 15 horas en condiciones de isquemia fría.

Las proteínas de la invención permiten recuperar la filtración glomerular en organismos que se han tratado con ciclosporina-A.

Las proteínas de la invención reducen en un 90% el valor de la hipertensión portal en la cirrosis hepática. Las proteínas de la invención ejercen una protección de los ojos expuestos a altas dosis de rayos UV, evitando así las cataratas y protegiendo a los organismos expuestos a dosis subletales de rayos de protón. La proteína protege contra el daño causado por una presencia excesiva de radicales libres, en particular en la retina o en la miocardiopatía dilatada.

Alternativamente, la proteína, las variantes funcionales, los derivados y los fragmentos definidos anteriormente son para uso como agente antiinflamatorio y/o antioxidante, así como para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neuroinflamatoria, es decir, enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente seleccionada del grupo formado por: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, depresión, enfermedades de los ganglios basales, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, traumatismo, trastornos por abuso de sustancias, esclerosis lateral amiotrófica, encefalopatías mitocondriales.

Las proteínas de la invención ejercen una actividad citotóxica específica y selectiva sobre las células cancerosas, en particular leucemia, neuroblastoma, melanoma y cáncer de mama, ovario, páncreas, hígado, y próstata. Las proteínas de la invención, por las mismas razones, también pueden aplicarse clínicamente como potenciadores de otras terapias tumorales.

Entonces la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma como se definió anteriormente son para uso en el tratamiento y/o la prevención y/o el diagnóstico de una patología tumoral, en donde preferiblemente la patología tumoral es una leucemia, más preferiblemente leucemia linfoblástica aguda. Alternativamente, la patología tumoral es un neuroblastoma.

La patología tumoral puede afectar a un sujeto adulto o pediátrico.

En particular, la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma como se definieron anteriormente son para uso en el tratamiento y/o prevención de cataratas.

En particular, la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma como se definió anteriormente son para uso en una terapia radioprotectora o de prevención de daños, preferiblemente inducidos por una dosis subletal de irradiación de protones.

Se describe aquí una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína como se definió anteriormente, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma; un vector capaz de expresar eficazmente la proteína como se definió anteriormente, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma, que comprenden dicha secuencia de nucleótidos. También se describe en el presente documento una célula huésped modificada con dicho vector.

Además, en la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma como se definió anteriormente, y los excipientes y/o diluyentes

y/o vehículos adecuados. En un aspecto particular, la composición es para administración ocular. La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

5 El médico de cabecera puede elegir la formulación exacta, el modo de administración y la dosificación según la condición del paciente. La administración puede hacerse en una dosis única o en dosis repetidas a intervalos. La dosis y los intervalos se pueden ajustar individualmente para proporcionar el efecto terapéutico y/o diagnóstico, lo que disminuye los síntomas o prolonga la sobrevida del paciente.

10 La cantidad real de composición administrada será, por supuesto, según el paciente a tratar y/o diagnosticar, según su peso, la gravedad de la enfermedad, las formas de administración y la opinión del médico que prescribe. Una dosis diaria adecuada será de 0,001 a 10 mg/kg, en particular de 0,1 a 5 mg/kg. La administración puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos, por ejemplo mediante inyección, en particular inyección intravenosa, intramuscular, transmucosa, subcutánea o intraperitoneal y/o aplicación oral, tópica, nasal, inhalación, aerosol y/o vía rectal, etc. La administración puede ser local o sistémica. Además, la proteína de la invención, la variante, el derivado o fragmento biológicamente activo de la misma puede inmovilizarse de forma reversible y/o adsorberse en la superficie y/o dentro de dispositivos médicos o sistemas de liberación y vehículos de drogas (microesferas). Los dispositivos médicos y las microesferas se pueden cargar reversiblemente con la proteína de la invención, variante, derivado o un fragmento biológicamente activo de la misma, a través de su unión, impregnación y/o adsorción en la superficie del dispositivo médico o de la microesfera o en un nivel que cubra la superficie. Cuando el dispositivo médico o las microesferas están en contacto con fluidos biológicos, se libera la proteína de la invención, la variante, el derivado o un fragmento biológicamente activo de la misma, reversiblemente inmovilizados. Por lo tanto, el dispositivo médico y las microesferas actúan como herramientas que eluyen la molécula, la esencia de la presente invención, de tal manera que se puede controlar su cinética de liberación se puede controlar, asegurando la liberación controlada o sostenida, como es requerido por el tratamiento de liberación farmacológica. Los expertos en estas tecnologías conocen bien los métodos para recubrir/impregnar los dispositivos médicos y cargar las microesferas.

15 También se describe en esta memoria un homólogo, un derivado, un equivalente y un fragmento de la proteína de la invención.

20 Como se utiliza en el presente documento, el término "equivalente" significa una proteína que tiene al menos una de las actividades de la proteína de la invención. "Homólogo" significará una proteína que ejerce algunos cambios en comparación con la proteína de la invención. Estos cambios pueden ser una delección, un truncamiento, una extensión, una fusión quimérica y/o una mutación. Entre los péptidos equivalentes, se prefieren aquellos que muestran más del 80% de homología.

25 "Derivados" se refiere a cualquier péptido, posiblemente mutado, truncado y/o extendido, que se ha modificado químicamente o que contiene aminoácidos inusuales. El péptido de la invención, si se requiere, puede modificarse in vitro y/o in vivo, por ejemplo mediante glicosilación, miristoilación, amidación, carboxilación o fosforilación, y puede obtenerse, por ejemplo, mediante técnicas sintéticas o recombinantes conocidas en este campo.

30 Tal como se utiliza aquí, el término "variantes" se refiere a todos los tipos de variantes (alélicas, mutaciones etc.) y también incluye proteínas en diferentes especies de las proteínas codificadas por la SEQ ID NO: 1 o 3 en el Homo sapiens. Como un ejemplo de estos ortólogos, se pueden citar las proteínas correspondientes en Mus musculus, Rattus norvegicus, Gallus gallus, Xenopus laevis y Danio rerio.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "derivado" se refiere a proteínas que tienen un porcentaje de identidad de al menos 75% con la SEQ ID NO: 1 o con la SEQ ID NO: 2, preferiblemente al menos 85%, por ejemplo al menos 90%, y más preferiblemente, al menos 95%.

40 Como se emplea en el presente documento, los "fragmentos" se refieren a proteínas que tienen una longitud de al menos 10 aminoácidos, preferiblemente al menos 15 aminoácidos, como un ejemplo de al menos 20 aminoácidos. En la presente descripción, todos los fragmentos y derivados tienen las mismas propiedades terapéuticas de la proteína principal.

45 Los términos excipientes "farmacéuticamente aceptables" o "aceptables" se refieren a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen una reacción alérgica, como malestar gástrico, mareos y demás, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora. El término "excipiente" se refiere a un diluyente, adyuvante o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas de agua o una solución acuosa y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferiblemente como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de EW Martin.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "nucleótido" se refiere a ARN o ADN, preferiblemente a ADN. Dicho ADN puede ser bicatenario o monocatenario.

Preferiblemente, el nucleótido incluye una secuencia que codifica la secuencia de la proteína de la invención.

El nucleótido de la invención también podría incluir la secuencia codificante del péptido previamente definido, y una secuencia codificante adicional tal como una secuencia líder o una secuencia de proproteína, y/o secuencias no codificantes adicionales, tales como las secuencias UTR y TAG. Tal como se utiliza aquí, el término "vector" se refiere a un vector de expresión y puede ser por ejemplo en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Tales vectores pueden incluir plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral, tales como virus vaccinia, adenovirus, viruela aviar, seudorrabia. Una gran cantidad de vectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (QIAGEN), PBS, pDIO, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH1 [beta]a, pNH18A, pNH46A (STRATAGEN), ptrc99a, pKK223-3, pKK233 -3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, PSG (STRATAGEN), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el huésped. La secuencia de polinucleótidos, preferiblemente la secuencia de ADN en el vector está operativamente vinculada a una secuencia de control de expresión apropiada (promotor) para la síntesis directa de ARNm. Como ejemplos de tales promotores, el inventor podría mencionar un promotor procarionota o eucariota como el CMV inmediato temprano, la timidina quinasa HSV, SV40 temprano y tardío, el retrovirus LTR. El vector de expresión también contiene sitio de unión a ribosoma para el vector de traducción y transcripción inicial. Este último también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Además, los vectores contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tal como resistencia a dihidro folato reductasa o la resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucariotas, o la resistencia a la tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula huésped modificada genéticamente" se refiere a células huésped que se han transducido, transformado o transfectado con el nucleótido o con el vector descrito anteriormente.

Como ejemplos prácticos de células huésped apropiadas, el inventor podría mencionar células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas como la levadura, células de insectos como como Sf9, células animales como CHO o COS, células vegetales, etc.; los expertos consideran la selección de un huésped adecuado en el campo de aplicación.

Preferiblemente, la célula huésped antes mencionada es una célula animal, y más preferiblemente una célula humana. La introducción de nucleótidos o del vector previamente descrito en la célula huésped puede lograrse por un método conocido por un experto en la técnica, tal como la transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación.

La composición de la invención puede incluir uno o más aditivos (por ejemplo, estabilizadores, conservantes).

Según la presente invención, una "cantidad efectiva" de una composición o del péptido de la invención es una cantidad que es suficiente para lograr el efecto biológico deseado, es decir, para penetrar en las células y liberar en ellas lo se haya combinado químicamente. Se entiende que la dosis eficaz dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del paciente, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis efectivas que se proporcionan a continuación no pretenden limitar la invención y sugerir intervalos de dosis. Sin embargo, la dosificación preferida se puede adaptar al sujeto individual, según lo entendido y determinable por un experto en la técnica, sin experimentación indebida. El péptido, el nucleótido, el vector y la célula huésped son como se describieron anteriormente.

También se describe aquí un kit para el diagnóstico de una enfermedad tumoral que comprende la proteína, las variantes funcionales, los derivados y fragmentos de la misma como se definió anteriormente.

Descripción de las figuras

La presente invención se ilustrará con ejemplos no limitativos en referencia a las siguientes figuras:

Fig. 1 y Fig. 2: El examen microperimétrico de oct destacó en la retina un punto que evalúa la sensibilidad retiniana al estímulo de luz por zona del rojo 0 al verde 16, lo que indica una buena respuesta del área retiniana. Para este paciente, antes del tratamiento solo había una zona verde (Fig. 1) y la mayoría eran zonas rojas. Después de un año de tratamiento consistente en la administración de 2 gotas oftálmicas que contenían forma larga de rMnSOD (100 µg/10 ml) dos veces al día las áreas verdes fueron cinco (Fig. 2). El área de interés es la misma que la imagen que muestra la condición del paciente antes del tratamiento. Al superponer las fotos, es posible observar que son perfectamente compatibles. Esto demuestra que es la misma área retiniana que se fotografió después de un lapso de tiempo y también demuestra la ejecución adecuada del examen y su confiabilidad.

Fig. 3: (A) Ojos de conejos expuestos a radiación ultravioleta durante 60 minutos, tratados con forma larga de MnSOD: los cristalinos están estructuralmente intactos. (B) Ojos de conejos expuestos a radiación ultravioleta durante 60 minutos, tratada con MnSOD comparativo tipo s: se destruyen las lentes.

Fig. 4: Ensayo de proliferación e inhibición del crecimiento. Supervivencia de células T-ALL, células Jurkat y linfocitos, mediante el análisis de MTT, después de 72 horas de crecimiento y después del tratamiento con de 0,067 μM de forma larga de rMnSOD durante 5 horas.

5 (A) Viabilidad celular por ensayo de exclusión de azul de tripano. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

(B) Curva de proliferación espontánea de la línea de células Jurkat, T-ALL y linfocitos después de 96 horas de crecimiento.

10 Fig. 5: Efecto de la forma larga de rMnSOD sobre la inducción de apoptosis. (A) Análisis FACS después de la marcación doble de células Jurkat con PI y anexina V después del tratamiento con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD, en comparación con el control. (B) Distribución de células Jurkat en las diferentes fases del ciclo celular después del tratamiento con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD.

Fig. 6: (A) Porcentaje de células marcadas en microscopía óptica. (B) Porcentaje de células marcadas en el ensayo de azul de tripano después de los tratamientos con las diferentes concentraciones de forma larga de rMnSOD por 5 horas. Los controles no mostraron marcación.

15 Fig. 7: (A-F) Células Jurkat tratadas con concentraciones crecientes de forma larga de rMnSOD. Todas las células del panel muestran una intensa inmunoreacción citoplásmica y nuclear marrón a anti-rMnSOD, revelada por la reacción de diaminobencidina: A) 0,0067 μM de forma larga de rMnSOD produce solo cambios preapoptóticos leves, tales como fragmentaciones nucleares y citoplasmáticas iniciales, mientras que 0,067 μM de forma larga (B, C, D, E) conduce a una clara y avanzada fragmentación apoptótica tanto a nivel nuclear como citoplasmático, y finalmente 0,67 μM de la forma larga de rMnSOD (F) es una concentración que, muy probablemente, excede la capacidad de redox celular, que conduce a rupturas de la membrana plasmática. (G-J) Linfocitos tratados con concentraciones crecientes de forma larga de rMnSOD. Todas las células exhiben una intensa inmunoreacción citoplasmática y nuclear marrón a anti-rMnSOD, revelada por reacción de diaminobencidina: G) célula de control; H) e I) células tratadas respectivamente con 0,0067 y 0,067 μM de forma larga de rMnSOD, que muestra una condición de bienestar sin signos de apoptosis; 20 J) célula tratada con 0,67 μM de rMnSOD de forma larga que exhibe ruptura de membrana plasmática. Muy probablemente, esta es una concentración que excede la capacidad de redox celular.

Fig. 8: Índice apoptótico. Porcentajes de células Jurkat apoptóticas después de los tratamientos de forma larga de rMnSOD

30 Fig. 9: (A-F) Células Jurkat por TEM después de la inmunoreacción con anti-rMnSOD de forma larga revelada por partículas de oro coloidal de 15 nm: A-B) Células tratadas con 0,0067 μM de forma larga de rMnSOD que muestran una incisión nuclear preapoptótica inicial y una ligera fragmentación citoplasmática; C) y D) Células tratadas con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD que conducen a claras fragmentaciones apoptóticas nucleares y citoplasmáticas; EF) Célula tratada con 0,67 μM de rMnSOD, que muestra la ruptura de la membrana; (G-L) Linfocitos tratados con mayores concentraciones de forma larga de rMnSOD, respectivamente, seguido de inmuno-revelación con forma larga de anti-rMnSOD y partículas de oro coloidal de 15 nm. G) y H) Células de control; I) y J) Linfocitos tratados con 0,067 de forma larga de μM rMnSOD que muestran una condición de bienestar, mientras que en K) y L) los linfocitos tratados con 0,67 μM de forma larga de rMnSOD muestran daño celular.

40 Fig. 10: Ensayo de transferencia Western y análisis de software de expresión de proteínas: células T-ALL (A), la línea celular Jurkat (B) y los linfocitos (C) se procesaron para la determinación de Bcl-2, Bax, la fosforilación de ERK y AKT después del tratamiento con forma larga de rMnSOD a una concentración final en el intervalo de 0,0067 a 0,67 μM . Los experimentos se realizaron al menos tres veces diferentes y los resultados siempre fueron similares. UC: células no tratadas. El escaneo de las bandas asociadas con la expresión de Bcl-2, Bax, pERK y pAKT en T-ALL (D), Jurkat (E) y linfocitos (F) normalizados con la proteína de mantenimiento, se realizó con software específico y las intensidades de las bandas se expresaron como unidades arbitrarias (% , media de tres experimentos diferentes).

45 Fig. 11: Análisis espectrofluorimétrico de especies reactivas de oxígeno. (A) Control de células Jurkat tratadas con o sin NAC. (B) Células Jurkat pre-incubadas con o sin NAC y luego con forma larga de rMnSOD. Los resultados son las medias de tres experimentos.

50 Fig. 12: El efecto de la forma larga de rMnSOD se investigó mediante un modelo in vitro de cultivo celular (línea celular de neuroblastoma SK-N-BE). La proteína recombinante se internalizó rápidamente por células similares a neuronas con signos de toxicidad después de 5-6 h en cultivo. Las imágenes muestran una morfología celular alterada después del tratamiento con la forma larga de rMnSOD. A) Células no tratadas; B) Las células a las que se les administró la forma larga de rMnSOD, después de 1 h, muestran formas redondas debido a la retracción del citoplasma en comparación con los cultivos de control (A); C) Las células expuestas a la forma larga de rMnSOD muestran características de muerte celular continua después de 6 h de tratamiento; magnificación de 40X por microscopía en contraste de fase.

55 Fig. 13: La forma larga de rMnSOD se internaliza por SK-N-BE indiferenciado y diferenciado después de 1 hora de tratamiento. Las imágenes muestran la localización intracelular de la proteína recombinante inmunomarcada con

anticuerpo policlonal de forma larga de anti-rMnSOD. La forma larga de rMnSOD está en verde, los núcleos son azules. A) y B) Células indiferenciadas; C) y D) Células diferenciadas; microcopia en contraste de fase (A,C); microscopía fluorescente (B,D); magnificación de 40X.

5 Fig. 14: La administración de forma larga de rMnSOD modula la expresión de citocinas en la corteza cerebral. A) La
 10 detección simultánea de múltiples citoquinas por la matriz de anticuerpos de membrana Abcam proporciona una
 herramienta importante para detectar factores inflamatorios que revelan el rol de los factores individuales en procesos
 fisiológicos o patológicos. Las membranas fueron sondeadas con homogeneizados de corteza cerebral disecados de
 ratones de control y tratados con forma larga de rMnSOD. B) El gráfico representa la comparación del porcentaje de
 15 expresión de 40 factores inflamatorios detectados en el ensayo contra las muestras no tratadas (n= 8). La imagen
 muestra una amplia reducción de las proteínas inflamatorias en ratones tratados con forma larga de rMnSOD con
 disminución significativa de 4 citocinas (barras rojas) indicadas en la tabla (C). Además, 4 proteínas mostraron una
 20 tendencia del límite de disminución de expresión para alcanzar cualquier significación estadística (barra verde): solo
 una proteína muestra una tendencia leve, no estadísticamente significativa, a aumentar después del tratamiento con
 forma larga de rMnSOD (C). (D) Tabla con resumen de los resultados.

15 Fig. 15: Liberación de LDH en el sobrenadante del cultivo, expresado como porcentaje de LDH total (de la lisis celular
 inducida por el tratamiento con detergente). Se encontró aproximadamente 3% de LDH en el medio de los cultivos no
 tratados. Las rMnSOD se sometieron a ensayo por sus efectos citostáticos y citolíticos en otras líneas celulares
 20 epiteliales mamarias humanas de origen normal (M CF-10) o tumoral (MCF-7) y en una variedad de células no
 mamarias transformadas (OVCAR-3, MiaPaCa, A-375). La forma larga de rMnSOD de Mancini indujo el cultivo de
 células MCF-7 para liberar el 97% de su contenido de LDH en el medio (en comparación con la liberación artificial de
 LDH inducida por el tratamiento con detergente), mientras que pudo detectarse un aumento muy menor en actividad
 25 de LDH en los sobrenadantes de cultivo celular MCF-10 tras la aplicación de esta proteína recombinante contra el
 12,20% de rMnSOD (Abcam) comparativo y 7,30 % de rMnSOD (Sigma) comparativo. Todas las células PaCa-2,
 OVCAR-3, A375 derivadas de tumor mostraron una notable sensibilidad a la muerte inducida por la forma larga de
 rMnSOD de Mancini.

Ejemplo 1: Producción de Sp24-MnSoD_Sint (forma larga de rMnSOD) y Sp6-MnSOD_Sint (forma corta de rMnSOD)

Se prepararon dos proteínas sintéticas recombinantes. La primera lleva el péptido líder de 24aa, y la segunda lleva el
 péptido líder compuesto de 6 aa. Ambas proteínas ejercen igual función/efecto.

30 Protocolo de producción y purificación de proteína recombinante rMnSOD corta (secuencia codificante de 639 pb) y
 rMnSOD larga (secuencia codificante de 693 pb).

35 Dos secuencias de nucleótidos diferentes que codifican la rMnSOD, diferente en la longitud del extremo N-terminal de
 la proteína, respectivamente rMnSOD corta (639 pb) y rMnSOD larga (693 pb) se clonaron en el vector de expresión
 pET21a + (Novagen) usando los sitios de restricción *EcoRI* para 5 '*HindIII* y 3'. Específicamente, las dos secuencias
 de genes sintetizadas son SEQ ID NO: 1 para la secuencia de nucleótidos de rMnSOD larga (la secuencia de
 aminoácidos de rMnSOD larga es SEQ ID NO: 2) y la SEQ ID NO: 3 para la secuencia de nucleótidos de la rMnSOD
 corta (la secuencia de aminoácidos de rMnSOD corta es SEQ ID NO: 4).

Las construcciones recombinantes resultantes (pET21a+ rMnSOD corta y pET21a + rMnSOD larga) se transformaron
 en células BL21 (Novagen) según el protocolo proporcionado por el fabricante.

40 Las células transformadas con cada una de las construcciones se inocularon en medio LB (Luria-Bertani)
 suplementado con ampicilina (100 mg l ml) en matraces incubados a 37°C bajo agitación hasta alcanzar una densidad
 óptica de entre 0,4-0,8 OD/ml.

La expresión de cada una de las proteínas recombinantes se indujo mediante la adición de IPTG de 0,1 mM (Isopropil-
 β-D-1-tiogalactopiranosido) incubando el cultivo a 25°C bajo agitación.

45 Después de 4 horas de crecimiento, el cultivo se detiene y las células se separan del medio de cultivo mediante
 centrifugación.

Los sedimentos celulares se resuspenden en tampón de unión/lavado T7 • Tag Bind/Wash Buffer (proporcionado por
 el kit T7 • Tag @ Affinity Purification Kit, Novagen) y se someten a sonicación.

El lisado celular se cargó en una columna T7 • Tag Antibody Agarose (proporcionado por el kit T7 • Tag @ Affinity
 Purification Kit, Novagen) y se purificó según las especificaciones del fabricante.

50 La solución que contiene la proteína purificada se esteriliza por filtración en filtros de esterilidad con recorte de 0,22
 μm. La proteína bovina SOD de tipo salvaje se adquirió de SIGMA (código S969715KU).

Ejemplo 2: Efecto citotóxico de sp24-MnSOD sintética sobre células tumorales humanas en cultivo continuo, según lo
 evaluado por la liberación de LDH de las células tumorales después de la incubación con la proteína de la presente
 invención.

Materiales y métodos

Células

Las células utilizadas para la evaluación de la actividad citotóxica de la proteína recombinante derivada del gen sintético son los siguientes y se han obtenido de las fuentes indicadas a continuación.

- 5 Células MCF-7 (carcinoma de mama humano) de ATCC HTB-22™, A-2780 (células de carcinoma ovárico humano) de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido), Huh7 (células de hepatoma humano de JCRB043 NIBIO JCRB Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation), DU145 (células de cáncer de próstata humano) de ATCC HTB 81 y finalmente A375 (células de melanoma humano) de ATCC CRL 1619™, MiaPaCa-2 (ATCC CRL-1420™, OVCAR-3 (ATCC-HTB-161), MCF-10 (ATCC-CRL-10317).
- 10 Todas las células se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco y suplementado por suero de ternera fetal al 10% y mantenido en incubadora a 37°C en una atmósfera humidificada.

Ensayo de citotoxicidad

- 15 La lisis celular inducida por la proteína recombinante sp24-MnSOD se midió a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La proteína se añadió a las células MCF-7, A-2780, HUH-7, DU-145, A375 en crecimiento exponencial a una concentración en el intervalo de 0,06 a 1 µM. La liberación de LDH en el medio de cultivo sobrenadante se cuantificó en diferentes momentos (24 h), utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo Cytotox 96 de Promega, según las instrucciones proporcionadas por Promega. Los experimentos se realizaron por triplicado, utilizando diferentes preparaciones.

Resultados

- 20 Tabla I: Efecto citotóxico de sp24-MnSOD (forma larga de rMnSOD) en células cancerosas humanas

Células	Liberación de LDH (SP24-MnSOD-sintética)	Liberación de LDH SOD tipo s (SIGMA)
MCF-7 Ca. mamario	90%	7%
A2780 Ca. ovárico	95%	3%
HUH-7 HCC	77%	4%
A375 Melanoma	78%	5%
DU145 Ca. Prostático	76%	4%

- 25 Después de 24 horas de incubación de sp24-MnSOD a una concentración de 1,5 µM, la liberación de enzima lactato deshidrogenasa de las células indica una citotoxicidad y, por lo tanto, una mortalidad que varía, dependiendo de las células. Se destaca que la proteína de tipo salvaje ejerce una actividad citotóxica muy débil en comparación con la de la proteína sp24-MnSOD.

El mismo efecto se observó con sp6-MnSOD (forma corta de rMnSOD).

Ejemplo 3: Evaluación del manganeso presente en sp24-MnSOD-Sintética (o forma larga de rMnSOD) en comparación con la cantidad expresada por la MnSOD de tipo salvaje, por espectrofotometría de absorción atómica.

Materiales y métodos

- 30 El superóxido de manganeso (hMnSOD) es una enzima metálica mitocondrial y consta de 4 unidades monoméricas idénticas compuestas de 22kDa. Cada monómero contiene, en el centro de la molécula, un ion manganeso (II) / (III) que está rodeado por una pirámide trigonal unida a tres residuos de histidina, un residuo de aspartato y una molécula de disolvente (Jan-Ling Hsu, et al., 1996, Karupiah Chockalingam, et al. 2006).

- 35 El manganeso se cuantifica comúnmente mediante un examen de espectrometría de absorción atómica. La medición se realiza utilizando un horno de grafito equipado con una corrección de fondo con efecto Zeeman. Una tubería pirolítica recubierta con grafito THGA (Perkin-Elmer) colocada sobre una plataforma integrada, 'tipo Lvov', se utilizó

para cuantificar el metal. Una solución normal de Mg en 2,5% de HNO₃ (Spectrascan) se utilizó como solución madre para la construcción de la curva de calibración en 3 puntos. Cada medición se realizó por triplicado. Se añadió una matriz modificadora (0,015 mg de Pd y 0,01 mg de Mg (NO₃)₂). La concentración de proteína de las muestras de SOD, antes del análisis cuantitativo de Mn, se evaluó utilizando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Lowry).

5 Resultados

La evaluación de la cantidad de manganeso contenido en la forma larga de rMnSOD se informa en la Tabla II.

Tabla II: Examen cuantitativo de manganeso presente en la molécula sp-24-MnSOD

Manganeso presente en sp24-MnSOD-sintética
0,01 átomos/monómero
Manganeso presente en MnSOD tipo s (SIGMA)
0,6-0,7 átomos/monómero

10 El análisis de absorción atómica de la forma larga de rMnSOD ha demostrado que en cada monómero hay un número de átomos de manganeso igual a 0,014. Estos datos sugieren que el manganeso no es el metal primario en rMnSOD. El examen de MnSOD tipo salvaje ha demostrado, sin embargo, la presencia de 0,6-0,7 átomos de manganeso para cada monómero.

Se observó un resultado similar con sp6-MnSOD (forma corta de rMnSOD).

15 Ejemplo 4: Actividades de protección y restauración de sp24-MnSOD sintética (forma larga de rMnSOD) en la retina humana

Materiales y métodos

Examen OCT-microperimétrico con el instrumento OCT espectral/SLO Otofotómico de America Technologies Inc. Canadá (Spaide RF et al., 2008, Fenolland JR et al. 2011).

Preparación de gotas oftálmicas (loción oftálmica)

20 La solución de gotas oftálmicas se preparó disolviendo 10 µg de sp24-MnSOD en 100 ml de solución salina al 0,9%. Luego se añadieron 10 mg de cloruro de benzalconio a la solución. El pH de la solución se ajustó a 7,00.

Se administraron dos gotas de preparación ocular, dos veces al día, a tres pacientes con retinopatía miópica por doce meses.

Resultados

25 Del ensayo "OCT-microperimétrico", se observó un punto en la retina. El punto evalúa cuantitativamente la sensibilidad de la retina para detectar y transmitir estímulos de luz, para cada área, en el intervalo de cero (rojo) a dieciséis (verde). Esto último indica una función retiniana óptima. El examen inicial realizado en el paciente, como se indicó anteriormente, mostró una sola área verde, mientras que la mayoría de las áreas eran rojas (Fig. 1). Después del uso de la preparación de gotas oftálmicas con sp24-MnSOD, administrada al paciente durante doce meses, todos los días, 30 el examen del área retiniana mostró la presencia de cinco áreas verdes (Fig. 2). Este resultado sugiere que las células de la retina del área afectada se han duplicado y pueden detectar y transmitir la señal de luz. Estos resultados demuestran la eficacia reparadora de las gotas oftálmicas a base de la forma larga de rMnSOD, y la fiabilidad del ensayo.

El mismo efecto se observó con sp6-MnSOD (forma corta de rMnSOD).

35 Ejemplo 5: Inhibición de la cataractogénesis mediante el uso de gotas oftálmicas que contienen p24-MnSOD-sintética después de la exposición a los rayos UV.

40 El estrés oxidativo causado por la exposición de las estructuras oculares a la radiación ultravioleta ejerce un papel clave en la cataractogénesis. En la presente invención, el inventor quiso evaluar si la sp24-MnSOD-sintética podía proporcionar protección a la lente cristalina de los ojos de conejo expuestos a altas dosis de radiaciones ultravioletas (UV) emitidas por una lámpara de cuarzo Jeloprotect-doble irradiación de 220 vw 30-2540 amperios (McCourt EA, et al. 2010, Fujiwara T, et al. 2009).

Material y métodos

Los conejos NZW normales (código Charles River 052) fueron expuestos a la radiación ultravioleta en presencia o ausencia de un colirio de 10 ml, que contenía 100 µg de sp24-MnSOD-sintética disuelta en 0,9% de NaCl + 10 mg de

cloruro de benalconio, administrando 2 gotas/ ojo/día por 15 días. Al final de los experimentos, se sacrificaron los conejos y se analizaron los ojos histológicamente para estudiar modificaciones estructurales. Del mismo modo, y como control negativo, se utilizó una gota oftálmica que contenía MnSOD tipo salvaje comparativa en la misma concentración y con la misma composición.

5 Resultados

El tratamiento de los ojos expuestos a rayos UV con las gotas que contienen la sp24-MnSOD sintética ha demostrado que la proteína ejerce un papel protector significativo en el cristalino de conejos. La protección se evidencia por el mantenimiento de la integridad de la lente cristalina que mostró una transparencia normal (Fig. 3A). Este resultado sugiere que la sp24-MnSOD-sintética reduce el estrés oxidativo causado por las radiaciones UV (lámpara 220-vw - 2540 30 amperios), evitando que las mismas dañen las estructuras oculares y en particular los cristalinos. El tratamiento de ojos de conejo con gotas oftálmicas similares que contienen MnSOD tipo s comparativa dio resultados completamente negativos que muestran que, en este caso, las lentes fueron completamente destruidas (Fig. 3B). En conclusión, la administración de gotas oftálmicas que contienen sp24-MnSOD sintética, en los ojos de conejo expuestos a la radiación ultravioleta proporciona una protección significativa contra el proceso de cataractogénesis.

15 El mismo efecto se observó con sp6-MnSOD (forma corta de rMnSOD).

Por lo tanto, las proteínas de la invención pueden utilizarse para la prevención y/o tratamiento de cataratas.

Ejemplo 6: efecto de las proteínas de la invención sobre las células leucémicas

Materiales y métodos

Células de cultivo

20 Células de leucemia linfoblástica de un paciente diagnosticado y tratado por leucémica linfoblástica aguda de células T (T-ALL) en la Unidad de Oncología Pediátrica de la Segunda Universidad de Nápoles, se recogieron y se purificaron por médula ósea utilizando centrifugación de gradiente de densidad Ficoll Hystopaque. Las características clínicas del paciente en el momento del diagnóstico fueron: edad 3 años, recuento de glóbulos blancos de 197000/ μ L, clasificación FAB L2, buena respuesta a prednisona e inmunofenotipo T temprano.

25 Los linfoblastos leucémicos, las células Jurkat y los linfocitos de donantes sanos (como control) se cultivaron a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI suplementado con Penstrep al 1% y FBS al 10% en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

Ensayo de viabilidad celular

30 La viabilidad celular se analizó por ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro]. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a la densidad de 1×10^3 células/pocillo en un volumen final de 100 μ L. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada para permitir un crecimiento exponencial. Después de 72 horas de crecimiento, las células se trataron con forma larga de rMnSOD a una concentración final en el intervalo de 0,0067 μ M a 0,67 μ M, durante 5 horas. A las 5 horas del tratamiento, las células se expusieron a MTT al 10% durante 3 horas a 37°C para formar cristales de formazán mediante reacción con células metabólicamente activas. Los cristales de formazán se solubilizaron en una solución de 1N isopropanol/HCL al 10% a 37°C durante 30 minutos. Se determinó entonces la absorbancia a 595 nm. La viabilidad celular se determinó mediante la fórmula: Viabilidad celular (%) (absorbancia de los pocillos tratados - absorbancia de los pocillos de control en blanco)/(absorbancia de pocillos de control negativo - absorbancia de los pocillos de control en blanco) x 100%. Las células de control (linfoblastos leucémicos, células Jurkat y linfocitos) se cultivaron bajo condiciones idénticas pero en ausencia de forma larga o corta de rMnSOD. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis del ciclo celular

45 Las células Jurkat se sembraron a una densidad de 1×10^6 y luego se incubaron 24 horas en un ambiente humidificado a 37°C. Al día siguiente, las células se trataron con 0,067 μ M de una forma larga de rMnSOD durante 5 horas en atmósfera humidificada a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS 1X, se peletizaron, y se marcaron con solución de yoduro de propidio (PI) (50 mg de PI en citrato de sodio al 0,1%, 0,1% de NP40, pH 7,4) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Para evaluar el ciclo celular, el software ModFIT recogió la fluorescencia PI como FL2 (escala lineal) (Becton Dickinson). La evaluación del contenido de ADN intracelular se realizó analizando 20000 eventos por cada punto por triplicado. Cada experimento dio S.D. inferior al 5%.

50 Evaluación de la apoptosis por citometría de flujo de ADN

La muerte celular apoptótica se analizó mediante marcación con Anexina-V-FITC. Se une Anexina-V-FITC a los residuos de fosfatidilserina, que se translocan de la cara interna a la externa de la membrana plasmática durante las primeras etapas de la apoptosis. La marcación de células apoptóticas se realizó con un kit Annexin-V (MedSystems Diagnostics, Wien, Austria). Las células Jurkat se sembraron a la densidad 1×10^6 y luego se incubaron 24 horas en

atmósfera humidificada a 37°C. Posteriormente, las células se trataron con 0,067 μ M de una forma larga de rMnSOD y se incubaron a 37°C por 5 horas. Después de la incubación, las células se recogieron y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. El sedimento se lavó en PBS 1X, se incubó con Anexina-V-FITC en un tampón de unión (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM) por 30 minutos a 4°C. El análisis de las células apoptóticas se realizó por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson). Se adquirieron 10x10⁴ eventos para cada muestra. El análisis se llevó a cabo por triplicado.

Inmunocitoquímica en microscopía óptica

Se incubaron células de leucemia linfoblástica, células Jurkat y linfocitos durante cinco horas en la presencia o ausencia de forma larga de rMnSOD en concentraciones finales en el intervalo de 0,0067 a 0,67 μ M. Posteriormente, se usó una citocentrífuga para extender las células en portaobjetos. Los extendidos se fijaron en solución de Zamboni (paraformaldehído al 4%, ácido pícrico al 15%) durante 60 minutos y luego se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante cinco minutos con peróxido de hidrógeno al 3% para detener la actividad de la peroxidasa endógena. La inmunomarcación se realizó con el kit DAKO LSA + System HRP. La anti-rMnSOD-Lp de conejo (1:200) se incubó en portaobjetos durante 30 minutos seguido de incubación con el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos y estreptavidina marcada con peroxidasa durante 30 minutos. Para completar la reacción, se utilizó una solución de sustrato cromógeno. Los extendidos se contramarcaron con hematoxilina.

Determinación del índice apoptótico

Se contaron las células y cuerpos apoptóticos de varias áreas de cada muestra. El índice apoptótico (AI) se calculó como el número de células y/o cuerpos apoptóticos por 1000 células tumorales, expresado en porcentajes.

Método Immunogold en microscopía electrónica de transmisión.

Tanto las células leucémicas como los linfocitos se incubaron durante seis horas en presencia o ausencia de forma larga de rMnSOD a una concentración final entre 0,0067 y 0,67 μ M. Las células se fijaron luego usando glutaraldehído al 1% y paraformaldehído al 4% en 0,1 M de tampón de cacodilato de sodio durante 60 minutos a temperatura ambiente y lavado dos veces en 0,1 M de tampón de cacodilato de sodio. Las muestras después se trataron con OsO₄ al 1% durante 10 minutos, se deshidrataron, se incrustaron en Epon 812 y se polimerizaron a 60°C durante 24 horas. Las secciones ultrafinas se prepararon con un ultramicrotomo Leica Ultracut UCT y se montaron en rejillas de níquel. Las secciones se sometieron posteriormente a desenmascaramiento de antígeno en tampón de citrato, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 10% durante 10 minutos, se lavaron 3 veces en PBS al 0,9% durante 5 minutos, y se incubaron en BSA al 1% y glicina al 0,15% en PBS durante 30 minutos. Las muestras se incubaron con anti-rMnSOD-Lp de conejo policlonal (1:20) en 0,05 mol/L de Tris-HCl con BSA al 1% durante la noche a 4°C, se lavaron tres veces en PBS al 0,9% durante 10 minutos, y se incubaron con un anticuerpo secundario de anti-conejo de burro conjugado a 15 nm de oro coloidal diluido (1:10) en BSA al 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron en PBS (pH 7,4) y agua destilada antes de la contramarcación con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se examinaron las secciones ultrafinas utilizando un microscopio electrónico de transmisión LEO 912AB Zeiss

Extracción de proteína y análisis de transferencia Western

La extracción de proteínas se realizó en hielo durante 30 minutos usando tampón de lisis (Tris-HCl 1M, pH 8, NaCl 5M, NaF 0,5 M, NP40 100%) con inhibidores de proteasa (4 μ L/ml de PMSF, 2 μ L/ml de aprotinina y pepstatina, 1 μ L/mL Na Ortovanadato). Los lisados celulares se centrifugaron a 20000 g durante 2 minutos a 4°C, y las proteínas se extrajeron del sobrenadante. La concentración de proteína total se determinó usando el ensayo de Bradford (Bio-Rad). Para el análisis de transferencia Western, 30 μ g de la proteína colocaron en gel de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membrana de PVDF (Millipore, Marlborough, MA). La membrana se bloqueó en leche descremada en polvo al 5% disuelta en tampón TBS (Tris 2 mM, NaCl 13,7 mM, Tween-20 al 0,1%, pH 7,6) durante toda la noche. Todos los lavados se realizaron en tampón TBS. La inmunotransferencia se realizó utilizando anticuerpos primarios contra Bcl-2 (100), Bax (N20), AKT (H-136), pAKT (Ser473), ERK (G-12) y pERK (E-4) (Santacruz Biotechnology, INC) (1:500) incubados durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios (Santacruz Biotechnology 1: 5000) se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las bandas se visualizaron utilizando un sistema quimioluminiscente (ECL-Amersham). La intensidad de cada banda se obtuvo con una cámara CCD y se analizó con el software de análisis de Quantity One 1-D (Biorad Laboratories). Los resultados se normalizaron frente al nivel de expresión de α -actina en cada muestra.

Detección de especies reactivas de oxígeno

Las muestras celulares se pretrataron con o sin NAC 10mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE. UU.) a 37°C durante 20 minutos, y se incubaron con 0,067 μ M de forma larga de rMnSOD durante 5 horas, luego las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 10 μ M de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA-Cayman, Baverno, Italia) a 37°C durante 20 minutos. La DCFH-DA difundida en las células se desacetila por esterasas celulares en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) no fluorescente, que se oxida rápidamente en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) fluorescente por ROS. La intensidad de fluorescencia fue proporcional a los niveles de ROS dentro del citosol celular. Se evaluó la intensidad de fluorescencia utilizando un espectrofluorímetro de doble haz Hitachi (modelo U-2000) con

excitación a 484 nm y emisión a 530 nm. La fluorescencia de fondo (conversión de DCFH-DA en ausencia de homogeneizado) se corrigió mediante la inclusión de espacios en blanco paralelos.

Resultados

- 5 Efectos de la forma larga de rMnSOD sobre la inhibición del crecimiento en células T-ALL humanas, células Jurkat y linfocitos. Las células fueron cultivadas y monitoreadas durante 3 días para evaluar la concentración y proliferación celular usando el ensayo de exclusión de azul de tripano y ensayos de MTT (Tabla III).

Tabla III. Viabilidad celular de cultivo de 3 días

MN: morfología normal; ND: densidad normal; ID: densidad aumentada			
A			
Células leucémicas T	Concentración celular	Azul de tripano	Morfología
T0	1000000/mL	78%	NM.ND. Aglutinación ausente
T1	400000/mL	87%	NM.ND. Aglutinación ausente
T2	400000/mL	65%	NM.ID. Aglutinación presente
B			
Células Jurkat	Concentración celular	Azul de tripano	Morfología
	800000/mL	100%	NM.ID. Aglutinación presente
C			
Linfocitos normales	Concentración celular	Azul de tripano	Morfología
T0	1200000/mL	100%	NM.ND. Aglutinación ausente
T1	800000/mL	90%	NM.ND. Aglutinación ausente
T2	800000/mL	70%	NM.ID. Aglutinación presente

- 10 Para realizar los experimentos con la dosis óptima de forma larga de rMnSOD, el inventor inicialmente determinó la tasa de supervivencia dependiente de la dosis de Jurkat y T-ALL en el tratamiento con forma larga de rMnSOD. El inventor observó, en base al ensayo de exclusión de azul de tripano y los ensayos de MTT, una muerte celular inferior al 5% después de 5 horas de tratamiento con forma larga de 0,003 μM de rMnSOD, mientras que se indujo una reducción significativa en la viabilidad celular (en $\sim 30\%$, datos no mostrados) por un tratamiento de 5 horas con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD. Por lo tanto, se seleccionó 0,067 μM de forma larga de rMnSOD para los experimentos
- 15 posteriores para minimizar la alteración en la expresión de proteínas inducida por apoptosis.

- En particular, después de 72 horas de crecimiento, las células se trataron con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD durante 5 horas en cultivo. El inventor observó, con el ensayo de MTT, una tasa de proliferación del 1% de células T-ALL, 40% de Jurkat y 70% de linfocitos (Fig. 4A). Además, con el ensayo de exclusión de azul de tripano, realizado en las mismas condiciones, el inventor observó una inhibición del crecimiento del 99% de células T-ALL, 60% de Jurkat y 30% de linfocitos (Fig. 4B). Las curvas de proliferación espontánea de las líneas de células Jurkat, T-ALL y linfocitos se utilizaron como controles normalizados. Estas curvas mostraron un aumento del crecimiento de las células Jurkat, una disminución del crecimiento de linfocitos después de 48 h y una ligera disminución seguida de estabilización del crecimiento de las células T-ALL después de 48h a 96h (Fig. 4C).
- 20

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

- 25 Efecto de la forma larga de rMnSOD sobre la inducción de apoptosis

- Después del tratamiento con 0,067 μM de rMnSOD, el inventor evaluó la inducción de apoptosis en células Jurkat por análisis FACS, después de marcar con Anexina-V-FITC y PI, como se describió anteriormente. Como se muestra en la Fig. 5 y la Tabla IV, se ha detectado un aumento significativo de células apoptóticas en comparación con las células de control. En particular, el inventor descubrió que los tratamientos con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD durante
- 30 5 horas indujeron apoptosis en 23,7% de células Jurkat, en comparación con 5% de células no tratadas.

Tabla IV. Análisis del ciclo celular

Recuadros, % de células positivas. UL = Superior izquierda (necrosis); UR = Superior derecha (apoptosis tardía); LL = inferior izquierda (viable); LR = Inferior derecha (apoptosis temprana). Células no tratadas, CTR.				
	UL Necrosis	UR Apoptosis tardía	LL Células vivas	LR Apoptosis temprana
CTR	3,8	5	90,8	0,4
rMnSOD	2,5	23,7	67,1	6,6

5 La Figura 5 (B) muestra el análisis del ciclo celular FACS después de la incorporación de yoduro de propidio (PI) en células Jurkat. El inventor observó que 0,067 μM de la forma larga de rMnSOD no inducía cambios en la distribución del ciclo celular en comparación con las células no tratadas.

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Microscopía de luz

10 Los tratamientos realizados respectivamente con 0,0067, 0,067 y 0,67 μM de forma larga de rMnSOD durante 5 horas en las tres poblaciones celulares dieron los siguientes porcentajes de células marcadas: 40%, 60% y 76% de células leucémicas T cultivadas; 60%, 73% y 100% de las células Jurkat y 60%, 70% y 75% de linfocitos, mientras que los controles no mostraron marcación (Fig. 6A). En general, estos resultados indican que la mayoría de las células internalizaron rMnSOD, ya que exhibieron tanto principalmente inmunoreactividad citoplasmática como menos inmunoreactividad nuclear (Fig. 7 A-F; H-J). Los porcentajes de viabilidad como resultado de las tres concentraciones de forma larga de rMnSOD sometida a ensayo se informan en la Figura 6B.

15 Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD

Células leucémicas T y células Jurkat

Las células leucémicas T y las células Jurkat, tratadas con 0,67 μM de forma larga de rMnSOD, exhiben positividad citoplasmática y nuclear, así como la ruptura de la membrana plasmática (Figs. 7F; 9E-F).

20 Por el contrario, ambas células tratadas con 0,0067 y 0,067 μM de forma larga de rMnSOD mostraron positividad citoplasmática, así como los cambios preapoptóticos de la fragmentación nuclear y citoplasmática temprana y completa (Figs. 7A-E; 9A-D).

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Linfocitos

25 Los linfocitos tratados con 0,67 μM de forma larga de rMnSOD mostraron positividad citoplasmática y leve positividad nuclear, así como ruptura de la membrana plasmática. (Figs. 7J; 9K-L), mientras que las células tratadas con 0,0067 o 0,067 μM de forma larga de rMnSOD no mostraron alteraciones morfológicas (Figs. 7H-J; 9I-L). Los linfocitos (no tratados con rMnSOD) no exhibieron positividad (Figs. 7G; 9G-H). Juntos, estos hallazgos indican que 0,0067 y 0,067 μM de la forma larga de rMnSOD causan apoptosis solo de células leucémicas, en cambio 0,67 μM de forma larga de rMnSOD es una concentración tóxica.

30 Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Determinación del índice apoptótico

35 El número de células que muestran fragmentación apoptótica nuclear y citoplasmática se informa en la Figura 8. Se contaron las células y cuerpos apoptóticos de varias áreas de cada muestra. El índice apoptótico (AI) se estimó como el número de células y/o cuerpos apoptóticos por 1000 células tumorales, expresadas en porcentajes. El tratamiento de la forma larga de rMnSOD induce apoptosis tanto en células de pacientes con ALL cultivadas como en la línea celular Jurkat, sin efectos adversos en los linfocitos. De hecho, se muestra que 0,067 μM de la forma larga de rMnSOD causa apoptosis de células leucémicas T y de las células Jurkat in vitro y se observa (por ensayo de MTT) una tasa de supervivencia del 1% de células T-ALL, 40% de Jurkat y 70% de linfocitos después del tratamiento con la forma larga de rMnSOD.

40 Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Microscopio de transmisión por electrones

El inventor utilizó la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para confirmar la internalización de la forma larga de rMnSOD por células leucémicas T, células Jurkat y linfocitos tratados con 0,0067, 0,067 y 0,67 μM de rMnSOD. Los resultados de TEM muestran partículas de oro coloidales (10 nm) dispersas principalmente en el citoplasma y, a veces, cerca de la envoltura mitocondrial (Figs. 9A-F; I-L), confirmando que la forma larga de rMnSOD ingresa a las células. La internalización de la forma larga de rMnSOD también fue evidente en fragmentos apoptóticos nucleares y citoplasmáticos (Figs. 9C-D) y en células dañadas (Figs. 9E-F). La forma larga de rMnSOD también ingresa a los linfocitos, como lo indica la presencia de las partículas de oro de 10 nm distribuidas en el citoplasma (Figs. 9I-L) después de 5 horas de tratamiento. No se observó marcación en células no tratadas (Figs. 9G-H).

5

10 Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Tratamiento de forma larga de rMnSOD en la vía de supervivencia

Para determinar con más detalles el mecanismo de inhibición del crecimiento por la forma larga de rMnSOD, el inventor analizó el perfil apoptótico después del tratamiento con rMnSOD. En particular el inventor evaluó la expresión de Bcl-2 y Bax en células leucémicas T, células Jurkat y linfocitos a una concentración final que varió de 0,0067 a 0,67 μM de rMnSOD.

15

El tratamiento de las células leucémicas T con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD indujo la expresión de Bax proapoptótico y suprime la expresión de Bcl-2 en comparación con las células no tratadas (Fig. 10A-D). Las células Jurkat tratadas con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD también mostraron un aumento de la expresión de Bax y la disminución de la expresión de Bcl-2 (Fig. 10B-E). Por el contrario, el tratamiento de linfocitos con 0,067 μM de forma larga de rMnSOD no afectó la expresión de Bcl-2 o Bax en comparación con las contrapartes no tratadas (Fig. 10C-F).

20

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Tratamiento de forma larga de rMnSOD en la vía de proliferación

Para analizar si la forma larga de rMnSOD también actúa sobre los reguladores clave de las vías de proliferación, el inventor evaluó la fosforilación de AKT y ERK con respecto a los niveles basales. El inventor encontró que el tratamiento con la forma larga de rMnSOD no afectó la fosforilación de AKT en todas las muestras analizadas. Los cambios en la expresión de ERK fosforilada, después del tratamiento con forma larga de rMnSOD, dio como resultado células T-ALL y linfocitos (Fig. 10A, C), mientras que se detectó una expresión ligeramente disminuida de ERK fosforilada en células Jurkat (Fig. 10B), lo que indica que el aumento de la inhibición después del tratamiento con forma larga de rMnSOD no podría verse influenciado por vía de las quinasas MAP/ERK sino por vía apoptótica, a excepción de las células Jurkat que son un modelo con múltiples vías múltiples.

25

30

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Detección de especies reactivas de oxígeno

La N-acetilcisteína (NAC) dio como resultado el bloqueo de la generación de ROS inducida por rMnSOD, como se muestra en la Figura 11. De hecho, 10 mM de NAC indujo una disminución de DCF, después de la incubación con 0,067 μM de rMnSOD, mientras que el tratamiento sin NAC mostró fluorescencia comparable al control. Estos datos sugieren que 0,067 μM de la forma larga de rMnSOD induce la producción de ROS en cantidades mucho más altas que en los controles, como se esperaba.

35

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Se sabe bien que las células leucémicas producen altos niveles de especies reactivas de oxígeno y tienen una alteración en la función protectora de la enzima contra los radicales libres. Esta variabilidad de la maquinaria antioxidante de las células y la producción de ROS, según el tipo de cáncer, se puede explicar por el nivel de defensa antioxidante que conduce a una producción de ROS eficaz para generar la transformación celular neoplásica, pero no lo suficiente como para desencadenar la apoptosis. Evidencia creciente demuestra el papel clave de ROS en la regulación de la vida y la muerte celular. El potencial tóxico de ROS es capaz de activar la respuesta inmune.

40

Por lo tanto, el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas debe abordar la dualidad de ROS tanto en la acción citotóxica protectora contra lo "no propio" como en la acción perjudicial de su excesiva acumulación capaz de inducir carcinogénesis (Manda et al., 2009). Del mismo modo, la forma larga de rMnSOD muestra también una dualidad de acción, pudiendo desencadenar la muerte apoptótica de las células cancerosas mientras oxigena las células sanas o, si excede la capacidad de la catalasa para transformar el peróxido en oxígeno y agua, puede inducir necrosis tanto en células tumorales como en células sanas (Mancini et al., 2006). Por lo tanto, el equilibrio redox parece ser el principal mecanismo de control de la carcinogénesis (Manda et al., 2009; Barbosa et al., 2012). En este estudio, el inventor demostró que el tratamiento con forma larga de rMnSOD induce la apoptosis tanto en células de pacientes con ALL cultivadas como en la línea celular Jurkat, sin efectos adversos sobre los linfocitos. De hecho, el inventor demostró que 0,067 μM de la forma larga de rMnSOD causa apoptosis de las células leucémicas T y de las células Jurkat in

45

50

vitro, y el inventor observó (por ensayo de MTT) una tasa de supervivencia del 1% de células T-ALL, 40% de células Jurkat y 70% de linfocitos después del tratamiento con rMnSOD. Además, el inventor demostró que 0,067 μM de la forma larga de rMnSOD aumenta la proteína pro-apoptótica Bax e inhibe la proteína antiapoptótica Bcl-2 en células leucémicas T. Estos datos coinciden con Mancini et al. (Mancini et al., 2006) sobre células de cáncer de mama, quienes confirman un fuerte aumento de la expresión génica de Bax pro-apoptótica en presencia de rMnSOD, lo que sugiere que este tratamiento podría inducir la cascada apoptótica. Se sugirió la posible participación de un mecanismo apoptótico por la fuerte inhibición de la expresión génica de Bcl-2 anti-apoptótica detectada en las células tumorales en presencia de rMnSOD (Mancini et al., 2008). Además, el análisis FACS de células tratadas con 0,067 μM de una forma larga de rMnSOD mostró un aumento evidente de células apoptóticas en 23,7% de las células Jurkat, en comparación con las células de control.

De modo interesante, las células leucémicas internalizan la forma larga de rMnSOD exógena que convierte a los radicales libre presentes en H_2O_2 . En particular, la catalasa desintoxica el H_2O_2 en oxígeno molecular y se encuentra generalmente en menor cantidad en las células leucémicas que en las células sanas. (Battisti et al., 2008). Así, el tratamiento con la forma larga de rMnSOD puede conducir a la acumulación de H_2O_2 y la muerte posterior de células leucémicas. Por el contrario, los linfocitos no muestran esta reducción en la actividad de catalasa y pueden tolerar altos niveles de producción endógena de H_2O_2 . Sin embargo, una concentración de 0,67 μM de la forma larga de rMnSOD es tóxica para las células leucémicas y los linfocitos; de hecho en esta concentración la forma larga de rMnSOD induce necrosis debido a un desequilibrio estequiométrico que se crea entre las enzimas MnSOD y la catalasa. Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

En conclusión, los hallazgos actuales sugieren que las formas largas y cortas de rMnSOD podrían considerarse como un tratamiento adicional asociado para la leucemia, particularmente porque las concentraciones bajas de la forma larga o corta de rMnSOD parecen específicamente tóxicas para las células cancerosas mientras tienen un efecto protector sobre las células sanas. Según el conocimiento actual sobre el rol terapéutico objetivo del equilibrio redox (Barbosa et al., 2012; Manda et al., 2009), estos resultados sugieren una acción para las formas largas y cortas de rMnSOD que lograrían una buena eficacia terapéutica sin efectos secundarios.

Ejemplo 7: Efecto de la forma larga de rMnSOD sobre el neuroblastoma

El efecto de las nuevas isoformas de la superóxido dismutasa de manganeso humana recombinante (rMnSOD) con péptido líder largo y corto se investigaron en un modelo in vitro de cultivo celular (cultivos de células del neuroblastoma SK-N-BE). Varias líneas de evidencia sugeridas indicaron que la nueva molécula actúa como un agente anticancerígeno.

Para evaluar esta hipótesis, el inventor trató nuestros cultivos de células similares a las neuronas con dos diferentes rMnSOD de forma larga con secuencia líder larga y corta.

Las células que crecieron en su medio específico se incubaron en presencia de rMnSOD (rMnSOD larga y corta) añadida al medio de cultivo. Para determinar la citotoxicidad de ambas proteínas, las células se examinaron en el microscopio óptico para la inducción de cambios citopáticos como se ejemplifica en la Fig. 12 (a-b-c) con la forma larga.

Ambas proteínas recombinantes fueron internalizadas rápidamente por células similares a las neuronas y mostraron actividad tumorigénica en las células, con signos de toxicidad después de 5-6 h en cultivo.

Métodos

Se sembraron 20000 células de neuroblastoma SK-N-BE en 24 pocillos múltiples (FALCON) con medio suplementado MEM con 10% de FCS (GIBCO). 24 horas más tarde, se añadió la rMnSOD larga y corta (1,25 μM) en cada pocillo. Después de 24 y 48 horas, las células se lavaron dos veces con PBS.

Luego, se evaluó la actividad citotóxica de ambas proteínas rMnSOD utilizando las pruebas de LDH según el método descrito en (Int. J. of Cancer-123, 2684-2695, 2008).

Resultados

Los resultados muestran que el efecto citotóxico de la forma larga de rMnSOD sobre las células de neuroblastoma SK-N-BE generan su efecto destructor (Fig. 12 a-c).

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

En conclusión, estos datos sugieren que las dos isoformas recombinantes (con secuencia líder corta y larga) MnSOD son citotóxicas para las células de neuroblastoma SK-N-BE, lo que sugiere su uso en el tratamiento del neuroblastoma.

Ejemplo 8: Efecto de la forma larga de rMnSOD sobre la inflamación cerebral

Se investigó el efecto de la forma larga de rMnSOD mediante un modelo animal in vivo de ratones de mediana edad. Varias líneas de evidencia sugirieron que la forma larga de rMnSOD es capaz de mitigar significativamente el estrés oxidativo y la inflamación de los tejidos. Estos procesos biológicos parecen ser componentes críticos que participan en el envejecimiento fisiológico y la neurodegeneración patológica, lo que sugiere por lo tanto que la actividad de la forma larga de rMnSOD podría modular parcialmente estos dos procesos y potencialmente reducir algunos de sus efectos adversos.

Para evaluar esta hipótesis, el inventor trató ratones Balb-C de mediana edad (18 meses de edad) con forma larga de rMnSOD por administración intranasal crónica (2 µg de proteína en 50 µl/día). Los hallazgos actuales muestran que, aunque no se observaron diferencias de comportamiento en el aprendizaje y tareas de memoria, el análisis bioquímico de las cortezas cerebrales de ratones tratados en comparación con los controles mostró un patrón de reducción significativa de la expresión de 5 proteínas que participan en las vías inflamatorias (BLC, CD30L, Ligando Fas, Kc, TNFR2), en forma simultánea con una tendencia de expresión de proteínas menor observada para IL-1Beta e I-Tac. (Fig. 14)

Se observó el mismo efecto con la forma corta de rMnSOD.

Material y métodos

Detección simultánea de los niveles de citocinas en tejidos corticales de ratones.

Se realizó la detección simultánea de múltiples citocinas de ratón con membrana de matriz de anticuerpos de citocina de ratón (Abcam, Cambridge, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. En la membrana se detectaron anticuerpos contra 97 citocinas de ratón, controles positivos (proteína IgG conjugada con biotina) y negativos (tampón utilizado para diluir anticuerpos impresos en la matriz). Rápidamente, los tejidos corticales de los ratones tratados con forma larga de rMnSOD y solución salina se lisaron con tampón de lisis que contenía inhibidores de proteasa, se homogeneizaron y se clarificaron mediante centrifugación. La membrana se incubó con tampón de bloqueo durante 30 mm a temperatura ambiente, después con 500 µg de proteínas totales en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con tampón de lavado I y 3 lavados con tampón de lavado II, la membrana se incubó con anti-citocinas conjugadas con biotina durante toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados con tampón de lavado I y 3 lavados con tampón de lavado II, la membrana se incubó con estreptavidina conjugada con HRP durante toda la noche a 4°C. Las señales quimioluminiscentes se revelaron con tampón de detección. La membrana se transfirió al sistema de imágenes y se expuso durante 2 minutos. Los datos de la densitometría en bruto se restaron del fondo (sondas de control negativo) y se normalizaron en señales de sonda positivas para la comparación de los resultados en múltiples matrices.

En conclusión, estos datos sugieren que las isoformas recombinantes del superóxido dismutasa de manganeso de la invención como formas largas o cortas pueden entrar dentro de las células neuronales y modificar la expresión de las proteínas cerebrales. Esto sugiere efectos sobre el sistema nervioso central y particularmente en enfermedades neurodegenerativas como posible herramienta farmacológica para desarrollar terapias innovadoras.

Ejemplo 9: Comparación entre las formas larga y corta de rMnSOD de la invención y MnSOD recombinante diferente

El efecto citotóxico sobre las células tumorales de las proteínas presentes (rMnSOD larga y corta) se examinaron en comparación con otras dos SOD2 recombinantes humanas:

La primera, SEQ ID NO: 7 (llamada SIGMA), es una SOD2 recombinante humana, una proteína etiquetada GST de longitud completa, con el péptido líder de 24 aminoácidos y sin 5 aminoácidos en C-terminal;

La segunda, SEQ ID NO: 8 (llamada Abcam), es una SOD2 recombinante humana, una proteína de longitud completa, sin el péptido líder de 24 aminoácidos, sin etiqueta y sin 5 aminoácidos en C-terminal.

Secuencia de rMnSOD comparativa (denominada SIGMA, SEQ ID NO: 7):

MSPILGYWKI KGLDQPTRLLEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL
 EFPNLPYYID GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL
 DIRYGVSRIA YSKDFETLKV DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH
 PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK KRIEAIQID KYLKSSKYIA
 WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LVPRGSMLSR AVCGTSRQLA TVLGYLGSRQ
 KHSPLDLPYD YGALEPHINA QIMQLHHSKH HAAIVNNLNV TEEKYQEALA
 KGDVTAQIAL QPALKFNGGG HINHPIFWTN LSPNGGGEPK GELLEAIKRD
 FGSFDKFKEK LTAASVGVQG PGWGWLGFNK ERGHLQIAAC PNQDPLQGTT
 GLIPLLIDV WEHAYYLQYK NVRPDYKAI WNVINWENV T ERYMACKK

Secuencia de rMnSOD comparativa (llamada Abcam, SEQ ID NO: 8):

KHSPLDLPYD YGALEPHINA QIMQLH HSKH HAAYVNNLNV TEEKYQEALA
 KGDVTAQIAL QPALKFNGGG HINHSIFWTN LSPNGGGEPK GELLEAIKRD
 FGSFDKFKEK LTAASVGVQG SGWGWLGFNK ERGHLQIAAC PNQDPLQGTT
 5 GLIPLLIDV WEHAYYLQYK NVRPDYKAI WNVINWENV T ERYMACKK

El efecto citotóxico de dos proteínas recombinantes comparativas se ha evaluado a través del ensayo de LDH (Tabla V), a la concentración de 1,5 µM, y se ha comparado con el efecto logrado por las proteínas rMnSOD de la presente invención (rMnSOD larga Mancini y rMnSOD corta Mancini).

Tabla V. Efecto citotóxico de diferentes rMnSOD en varias líneas celulares

	MCF-7	MiaPaCa	OVCAR3	A375	MCF-10
rMnSOD larga Mancini 1,5 µM	97%	86%	94%	68%	13,50%
rMnSOD corta Mancini 1,5 µM	98,10%	85,80%	95%	71%	12%
rMnSOD abcam 1,5 µM	12,20%	2,30%	9,90%	14%	11%
rMnSOD SIGMA 1,5 µM	7,30%	4,15%	8%	15,30%	11,70%
cisPt 25 µM	38,80%	36,90%	20,30%	35%	51%
cisPt 1,5 µM	15,30%	5,80%	2,20%	12%	17,70%
CRTL (tampón de glicerol acuoso)	2,20%	2,20%	2,20%	2%	2%
CTRL (HEPES 20 mM)	6,60%	6,60%	6,60%	6,60%	6,60%

10 Los resultados también se ilustran en la Fig. 15. La lisis celular inducida por cuatro tratamientos de rMnSOD diferentes se midió a través de la liberación de la enzima LDH. Se agregó rMnSOD a los cultivos de crecimiento exponencial a una concentración final de 1,5 µM (a menos que se indique de otro modo), y la liberación de LDH en el sobrenadante del medio se midió en los tiempos indicados después la aplicación, utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad no radioactiva CytoTox 96 de Promega, según las recomendaciones del fabricante. Los experimentos se realizaron por triplicado, usando diferentes preparaciones de rMnSOD (rMnSOD larga Mancini, rMnSOD larga Mancini, rMnSOD SIGMA y rMnSOD Abcam), y la liberación de LDH se expresó como la fracción de LDH total liberada tras el tratamiento con detergente.

15 La liberación de LDH en el sobrenadante del cultivo se expresó como un porcentaje del LDH total (de la lisis celular inducida por tratamiento con detergente). Se encontró aproximadamente 3% de LDH en el medio de cultivos no tratado.

20

Las rMnSOD se sometieron a ensayo por sus efectos citostáticos y citolíticos en otras líneas celulares epiteliales mamarias humanas de origen normal (MCF-10) o tumoral (MCF-7) y en una variedad de células transformadas no mamarias (OVCAR-3, Mia PaCa, A-375). La rMnSOD (larga y corta) Mancini indujo el cultivo de células MCF-7 para liberar 97% - 98,10% de su contenido de LDH en el medio (en comparación con la liberación de LDH artificial inducida por el tratamiento con detergente), mientras se pudo detectar un aumento muy inferior en la actividad de LDH en los sobrenadantes de cultivo celular MCF-10 tras la aplicación de esta proteína recombinante versus 12,20% de rMnSOD Abcam y 7,30% de rMnSOD Sigma. Las células MIA PaCa-2, OVCAR-3, A375 derivadas de tumor, mostraron una sorprendente sensibilidad a la muerte inducida por las rMnSOD Mancini.

Entonces la forma larga y corta de rMnSOD de la presente invención muestran propiedades mejoradas en comparación con otras formas de rMnSOD.

Ejemplo 10: Efecto de la MnSOD recombinante de la presente invención sobre la cirrosis hepática y órganos para injerto.

El alto estrés oxidativo juega un papel importante en el aumento de la resistencia vascular hepática en la cirrosis, al facilitar la fibrosis hepática y aumentar el tono vascular hepático. El estudio del inventor estuvo dirigido a investigar si el uso de rMnSOD podía ser una nueva estrategia terapéutica para reducir el estrés oxidativo y la hipertensión portal en ratas cirróticas. En ratas cirróticas con BDL y CCl₄ tratadas con la forma larga de rMnSOD (15 µg/Kg/día ip) o su vehículo durante 7 días, se midió la presión arterial media (MAP), la presión portal (PP) y el flujo sanguíneo portal (PBF) o el flujo arterial mesentérico pequeño (SMABF). Además, en ratas cirróticas con CCl₄, evaluamos la respuesta vasodilatadora hepática a la acetilcolina, la fibrosis hepática con tinción rojo de Sirius y la activación de células estrelladas hepáticas por una expresión de la proteína α -actina de músculo liso (α -SMA). El tratamiento con rMnSOD larga significativamente redujo la PP en ratas cirróticas con CCl₄ o BDL sin cambios significativos en el flujo sanguíneo esplácnico, lo que sugiere una reducción en resistencia vascular hepática. La MAP se modificó. La reducción en PP se asoció con una reducción significativa en la fibrosis hepática y la expresión de proteínas α -SMA, así como con respuesta mejorada de vasodilatadores a la acetilcolina.

La administración crónica de la forma larga de rMnSOD a ratas cirróticas reduce la presión portal al reducir la resistencia vascular hepática sin efectos nocivos sobre la hemodinámica sistémica, lo que sugiere que la misma podría constituir un nuevo antioxidante a ser considerado como terapia adicional para tratar la hipertensión portal en cirrosis.

La disfunción microcirculatoria hepática debido a daño por conservación en frío y reperfusión cálida (CS + WR) durante el trasplante de hígado está mediada en parte por el estrés oxidativo y puede conducir a la disfunción temprana del injerto. Esto es especialmente relevante cuando se consideran donantes esteatóticos. El inventor tiene el propósito de caracterizar los efectos de rMnSOD en la microcirculación, el daño parenquimatoso y la función endotelial de hígados sometidos a CS + WR.

Se determinó el estrés oxidativo y el óxido nítrico en células endoteliales hepáticas cultivadas primarias almacenadas en frío con forma larga de rMnSOD o su vehículo, y sometidas luego después a reperfusión al calor. Las ratas de control esteatóticas recibieron una dosis única de forma larga de rMnSOD o su vehículo 30 minutos antes de que se procurara el hígado y los injertos se almacenaron en frío por 0h (grupo de control) o 16 h. Después de 1h de reperfusión al calor, se analizó la microcirculación hepática, la función endotelial y el fenotipo, y el daño hepático. Los efectos antioxidantes de agregar forma larga de rMnSOD a una solución de almacenamiento en frío también se evaluaron en hígados de ratas y humanos sometidos a CS + WR.

Después de CS + WR, el endotelio hepático exhibió niveles de superóxido elevado y óxido nítrico disminuido; estos efectos perjudiciales se evitaron por rMnSOD. Los hígados de ratas control y esteatóticas con CS + WR exhibieron una microcirculación notablemente deteriorada y desarrollo de disfunción endotelial aguda, junto con daño hepático, inflamación, estrés oxidativo y bajo nivel de óxido nítrico. La forma larga de rMnSOD mitigó notablemente el estrés oxidativo, lo que se asoció con una mejora global del daño hepático y los trastornos microcirculatorios. La adición de la forma larga de rMnSOD a la solución de almacenamiento en frío mantuvo la capacidad antioxidante protegiendo a los tejidos hepáticos tanto de ratas como humanos.

Se observaron los mismos efectos con la forma corta rMnSOD.

La forma larga y corta de rMnSOD representa una terapia nueva y altamente efectiva para mejorar la obtención de hígado para trasplante.

Ejemplo 11: Efecto de la MnSOD recombinante de la presente invención sobre ROS, en particular en un modelo de miocardiopatía dilatada (CMD)

Material y métodos

Ensayo de medición de ROS

Para medir el nivel de ROS en el riñón, el inventor realizó un ensayo de diacetato de 2'7'-diclorofluorescina como se describe en (Borrelli, et al., 2011). Al final del tratamiento in vivo, las ratas se anestesiaron y luego se sacrificaron por

5 desangrado, y el riñón derecho rápidamente se almacenó a -80°C. Más tarde, los riñones se descongelaron y se pesaron. Los riñones se homogeneizaron en 5 ml de Tris-HCl 40 mM (pH 7,4) con Ultraturrax. La concentración de proteína se evaluó por el ensayo de proteínas Bio-Rad. Se utilizó diacetato de 2'7'-diclorofluorescina 5 µM (Sondas Moleculares) para el ensayo de una solución de 500 µM. Las muestras de tejido se diluyeron en un intervalo de 10000 a 2500 veces. El espectro se analizó de 480 a 525 nm en diferentes momentos (T0, T10, T30) utilizando un espectrofotómetro Jasco FP-777. Los niveles de ROS se expresaron como fluorescencia de intensidad (IF) normalizada para gramos de tejido y microgramos de proteínas.

Resultados

Tabla VI. Cuantificación de ROS en diferentes grupos en estudio

Muestra de suero	IF/mg proteína	nM DCF/mg proteína
A1 control	13700	590
A2 control + forma larga de rMnSOD	6263	270
B1 CMD	6312	270
B2 CMD + forma larga de rMnSOD	2854	120
C1 CMD	9928	430
C2 CMD + forma larga de rMnSOD	7001	300

A1: suero humano normal; A2: suero humano normal tratado en presencia de forma larga de rMnSOD; B1: suero humano de un paciente afectado por CMD en ausencia de forma larga de rMnSOD; B2: suero humano de un paciente afectado por CMD en presencia de forma larga de rMnSOD; DCF: Diacetato de 2'7'-diclorofluorescina; CMD: miopatía cardíaca dilatada; IF: intensidad de fluorescencia.

Los resultados de estos experimentos demostraron que después de solo 5 minutos de incubación con 2 µg de forma larga de rMnSOD y 1 ml de suero derivado de un paciente con CMD, la cantidad de ROS se redujo considerablemente, lo que sugiere que una infusión continua iv de forma larga de rMnSOD podría reducir la CMD en los pacientes.

10

Se observaron los mismos efectos con la forma corta rMnSOD.

Entonces, las formas largas y cortas de rMnSOD son útiles para el tratamiento de la CMD.

Ejemplo 12: Efecto protector de MnSOD recombinante de la presente invención en ratones expuestos a las radiaciones de protones

15 Material y métodos

Usando el modelo de irradiación subletal de cuerpo entero con protones disponibles en Phasotron del Joint Institute for Nuclear Research (Dubna), reconstruimos la forma de médula ósea del síndrome de radiación aguda en ratones para probar el efecto radioprotector de rMnSOD. Se expusieron ratones masculinos F1 SPF (CBAxC57B16) con un peso promedio de 24 g al haz de 171 MeV protones a la dosis de 4 Gy, y luego se trataron subcutáneamente con rMnSOD o solución fisiológica de cloruro de sodio.

20

Resultados

Después de la irradiación, el tratamiento subcutáneo seis veces al día con rMnSOD (larga) proporcionó una aceleración estadísticamente significativa de la recuperación de la masa de timo y bazo y del número de leucocitos en sangre periférica de ratones. En contraste, los ratones irradiados y tratados con la solución fisiológica no demostraron estos efectos positivos al séptimo día después de la exposición. El número de células nucleadas en la médula ósea de ratones irradiados incluso excedió su nivel basal en el grupo control siete días después de la irradiación. El grupo tratado con rMnSOD demostró así una hiperrestauración significativa de su característica normal.

25

Tabla VII: Tratamiento de animales en presencia de rMnSOD (larga)

Tiempo después de irradiación	Grupo	Masa corporal, g	Masa de bazo, mg	Masa de timo, mg	BMC, N106/fe Mur	Número de leucocitos en PB, N109/L	Índice mitótico en células de médula, %	Número de mitosis aberrante en células de médula, %
43 h	Control	26,4±1,5	126,8±30,5	21,4±9,0	49,4±5,6	9,3±2,0	2,5±0,9	2,2±3,2
	Tratado una vez con rMnSOD inmediatamente después de la irradiación	24,8±1,3	29,0±5,1	11,8±1,3	22,9±2,4	0,9±0,3	1,3±0,1	47,6±2,8
	Tratado una vez con SCPS inmediatamente después de la irradiación	24,2±1,5	31,8±1,9	11,5±1,0	22,9±2,4	0,9±0,3	1,3±0,1	45,9±8,1
Día 7	Tratado una vez con rMnSOD inmediatamente después de la irradiación	24,6±1,1	34,8±3,1	14,8±3,4	63,1±1,0	4,5±0,4	1,6±0,3	26,7±3,3
	Tratado una vez con SCPS inmediatamente después de la irradiación	24,8±0,8	33,2±9,5	11,7±1,5	64,7±4,9	6,1±1,9	1,5±0,2	22,7±2,9
	Tratado seis veces diarias con rMnSOD	25,2±1,9	62,2±16,2	39,0±18,1	79,5±1,7	7,4±0,4	1,5±0,3	29,5±4,8
	Tratado seis veces diarias con SCPS	24,6±1,3	32,4±3,4	13,0±6,2	67,9±2,6	5,3±1,2	1,3±0,2	29,4±10,5

Irradiación de diferentes grupos de animales tratados por vía subcutánea con solución de rMnSOD (1 µg por 0,5 ml) o solución fisiológica de cloruro de sodio (SCPS) en un volumen de 0,5 ml.

5 Tres grupos de animales irradiados recibieron rMnSOD. Dos de ellos se trataron solo una vez inmediatamente después de la irradiación y se analizaron después de 43 h y 7 días respectivamente. El tercer grupo recibió seis veces tratamientos diarios con rMnSOD comenzando con una primera inyección justo después de la irradiación y se analizó al séptimo día después de la exposición. Otros tres grupos irradiados que recibieron SCPS se trataron y analizaron en los mismos períodos de tiempo que los de rMnSOD. El grupo control no irradiado no recibió ningún tratamiento.

10 Los resultados sobre el estado de los órganos del sistema inmune y la hemopoyesis indican el efecto terapéutico de rMnSOD en el tratamiento de la enfermedad por radiación aguda inducida por una dosis subletal de irradiación de protones.

Se observaron los mismos efectos con la forma corta de rMnSOD.

Entonces, las formas largas y cortas de rMnSOD son útiles para el tratamiento y/o prevención de daños inducidos por una dosis subletal de irradiación de protones.

Referencias

- 15 Al-Gayyar MM, Eissa LA, Rabie AM, El-Gar AM (2007) Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukemia patients. *J Pharm Pharmacol* 59: 409 – 17
- Barbosa IA, Machado NG, Skildum AJ, Scott PM, Oliveira PJ (2012) Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: Potential for new therapies. *Bioch Biophys Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1826(1): 238 - 254, doi:10.1016/j.bbcan.2012.04.005
- 20 Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado PA, Brule AO, Araujo Mdo C, Schetinger MR, Morsch VM (2008) Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem* 41(7-8): 511 - 8, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.01.027
- Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R (2004) Adult acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 50: 223 – 261
- 25 Borrelli A, Antonietta Schiattarella, Roberto Mancini, Franco Morelli, Clemente Capasso, Viviana De Luca, Enrico Gori and Aldo Mancini *Int. J. Cancer*: 128, 453-459 (2011) The leader peptide of a human rec. Mn SOD as molecular carrier which delivers high amounts of Cisplatin into tumor cells inducing a fast apoptosis in vitro
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17(10): 1195 - 214, doi:10.1096/fj.02-0752rev.
- 30 Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA (2010) The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 28: 1075 - 83, doi:10.1200/JCO.2009.25.3641
- De Luca A, Maiello RM, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N (2012) The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signaling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 16(2): 17 - 27, doi:10.1517/14728222.2011.639361
- 35 Fenolland JR, Giraud JM, May F, Mouinga A, Seek S & Renard JP, Evaluation de l'épaisseur choroïdienne par tomographie cohérence en optique (SD-OCT). Étude préliminaire dans le glaucome ouvert à angle. *Journal Français d'Ophtalmologie* 34: 313-317 (2011)
- Fujiwara T, et al., Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in highly myopic eyes. *Am J Ophthalmol* 148: 445-450 (2009)
- 40 Goldenberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, Cohen HJ, Sallan SE, Asselin BL (2003) Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol* 21:3616 - 3622, doi:10.1200/jco.2003.10.116
- Hunter T, Bannister WH, Hunter GJ (1997) Cloning, expression and characterization of two Manganese Superoxide Dismutase from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 272: 28652 - 28659, doi:10.1074/jbc.272.45.28652
- 45 Jan-Ling Hsu, et al., Silverman Catalytic Properties of Human Manganese Superoxide Dismutase *JBC* vol. 271 :30, July 26, p. 17687-17691, (1996)
- Karuppiah Chockalingam, et al. Engineering and characterization of human manganese superoxide dismutase mutants with high activity and low product inhibition *FEBS Journal* Volume 273, Issue 21, pages 4853-4861, (2006).
- 50 Mainous AG III, Wells BJ, Koopman RJ, Everett CJ, Gill JM (2005) Iron lipids, and risk of cancer in the Framingham Offspring cohort. *Am J Epidemiol* 161 (12): 1115 - 22, doi:10.1093/aje/kwi131

- Malyszczak K, Tomasz W, Mazur G, Lindner K, Pyszel A, Kiejna A, Kuliczkowski K, Andrzejak R (2005) Anxiety and depressive symptoms in patients treated due to haematologic malignancies. *Psychiatr Pol* 39(1): 33 - 40
- 5 Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Fasano S, Occhiello A, Pica A, Sehr P, Tommasino M, Nuesch JP, Rommelaere J (2006) Tumor suppressive activity of variant isoform of manganese superoxide dismutase released by a human liposarcoma cell line. *Int J Cancer* 119:932 - 43
- Mancini A, Borrelli A, Schiattarella A, Aloj L, Aurilio M, Morelli F, Pica A, Occhiello A, Lorizio R, Mancini R, Sica A, Mazzarella L, Sica F, Grieco P, Novellino E, Pagnozzi D, Pucci P, Rommelaere J (2008) Biophysical and biochemical characterization of a liposarcomaderived recombinant MnSOD protein acting as an anticancer agent. *Int J Cancer* 123: 2684 - 2695, doi: 10.1002/ijc.23791
- 10 Manda G, Nechifor MT, Neagu TM (2009) Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies. *Curr Chem Biol* 3: 342 - 366
- Mashiba H, Matsunaga K (1988) Device for intracellular increase of oxygen free radicals and inhibition of MethA tumor cell proliferation: in vitro and in vivo studies. *Int J Tissue React* 10(5): 273 - 80
- 15 McCourt EA, et al., Measurement of sub-foveal choroidal thickness using spectral domain optical coherence tomography. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 41: S28-S33 (2010)
- McEligot AJ, Yang S, Meyskens F (2005) Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr* 25: 261 - 95, doi:10.1146/annurev.nutr.25.050304.092633
- Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Saez GT (2001) Antioxidant enzyme activities and production of MDA and 8-oxo-dg in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 30:1286 - 92
- 20 Pica A, Di Santi A, Basile F, Iacobellis F, Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, Mancini A (2010) Anti-Cancer, anti-Necrotic and Imaging Tumor Marker role of a novel form of Manganese Superoxide Dismutase and its leader peptide. *Int J Biol Biomed Eng* 4: 53 - 60
- Spaide RF, Koizumi H & Pozzoni MC, Enhanced depth imaging spectral-domain optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 146: 496-500 (2008)
- 25 Skarstein J, Aass N, Fossa SD, Skovlund E, Dahl AA (2000) Anxiety and depression in cancer patients: relation between the Hospital anxiety and depression scale and the European organization for Research and treatment of cancer core quality of life questionnaire. *J Psychosom Res* 49(1): 27 - 34
- Schubert S, Shannon K, Bollag G (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 295 - 308, doi:10.1038/nrc2109
- 30 Valko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160 (1): 1- 40, doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK (1994) Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA. Cell Biol* 13: 1127 - 1136, doi: 10.1089/dna.1994.13.1127.

Listado de secuencias

- 35 <110> MANCINI, Aldo
- <120> Variantes de superóxido dismutasa de manganeso y usos de las mismas
- <130> PCT124305
- 40 <150> RM2013A000608
- <151> 2013-11-04
- <150> EP14178505.5
- <151> 2013-07-25
- 45 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 693
- <212> ADN

ES 2 763 457 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaattcatgt tgagccgggc agtgtgcggc accagcaggc agctggctcc ggctttgggg      60
tatctgggct ccaggcagaa gcacagcctc cccgacctgc cctacgacta cggcgcctg      120
gaacctcaca tcaacgcgca gatcatgcag ctgcaccaca gcaagcacca cggcgcctac      180
gtgaacaacc tgaacgtcac cgaggagaag taccaggagg cgttggccea gggagatggt      240
acagcccaga tagctcttca gcctgcactg aagttcaatg gtggtggtca tatcaatcat      300
agcattttct ggacaaacct cagccctaac ggtggtggag aaccxaaagg ggagttgctg      360
gaagccatca aacgtgactt tggttccttt gacaagttta aggagaagct gacggctgca      420
tctgttggtg tccaaggctc aggttggggt tggtctggtt tcaataagga acggggacac      480
ttacaaattg ctgcttgctc aatcaggat cactgcaag gaacaacagg ccttattcca      540
ctgctgggga ttgatgtgtg ggagcacgct tactaccttc agtataaaaa tgtcaggcct      600
gattatctaa aagctatttg gaatgtaatc aactgggaga atgtaactga aagatacatg      660
gcttgcaaaa ataagaactc atgttgaaag ctt                                     693

```

5

<210> 2

<211> 226

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 2

```

Met Leu Ser Arg Ala Val Cys Gly Thr Ser Arg Gln Leu Ala Pro Ala
1          5          10          15

Leu Gly Tyr Leu Gly Ser Arg Gln Lys His Ser Leu Pro Asp Leu Pro
          20          25          30

```

ES 2 763 457 T3

Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu Pro His Ile Asn Ala Gln Ile Met Gln
 35 40 45
 Leu His His Ser Lys His His Ala Ala Tyr Val Asn Asn Leu Asn Val
 50 55 60
 Thr Glu Glu Lys Tyr Gln Glu Ala Leu Ala Lys Gly Asp Val Thr Ala
 65 70 75 80
 Gln Ile Ala Leu Gln Pro Ala Leu Lys Phe Asn Gly Gly Gly His Ile
 85 90 95
 Asn His Ser Ile Phe Trp Thr Asn Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gly Glu
 100 105 110
 Pro Lys Gly Glu Leu Leu Glu Ala Ile Lys Arg Asp Phe Gly Ser Phe
 115 120 125
 Asp Lys Phe Lys Glu Lys Leu Thr Ala Ala Ser Val Gly Val Gln Gly
 130 135 140
 Ser Gly Trp Gly Trp Leu Gly Phe Asn Lys Glu Arg Gly His Leu Gln
 145 150 155 160
 Ile Ala Ala Cys Pro Asn Gln Asp Pro Leu Gln Gly Thr Thr Gly Leu
 165 170 175
 Ile Pro Leu Leu Gly Ile Asp Val Trp Glu His Ala Tyr Tyr Leu Gln
 180 185 190
 Tyr Lys Asn Val Arg Pro Asp Tyr Leu Lys Ala Ile Trp Asn Val Ile
 195 200 205
 Asn Trp Glu Asn Val Thr Glu Arg Tyr Met Ala Cys Lys Asn Lys Asn
 210 215 220
 Ser Cys
 225

<210> 3
 <211> 639
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gaattgcag tgtgcggcac cggaagcac agcctccccg acctgcccta cgactacggc 60
 gccctggaac ctcacatcaa cgcgcagatc atgcagctgc accacagcaa gcaccacggc 120

ES 2 763 457 T3

```

gcctacgtga acaacctgaa cgtcaccgag gagaagtacc aggaggcggt ggccaagga      180
gatgttacag cccagatagc tcttcagcct gactgaagt tcaatggtgg tggcatatc      240
aatcatagca ttttctggac aaacctcagc cctaacggtg gtggagaacc caaaggggag      300
ttgtggaag ccatcaaacg tgactttggt tcctttgaca agtttaagga gaagctgacg      360
gctgcatctg ttggtgtcca aggctcaggt tggggttggc ttggtttcaa taaggaacgg      420
ggacacttac aaattgctgc ttgtccaaat caggatccac tgcaaggaac aacaggcctt      480
attccactgc tggggattga tgtgtgggag cacgcttact accttcagta taaaaatgtc      540
aggcctgatt atctaaaagc tatttgaat gtaatcaact gggagaatgt aactgaaaga      600
tacatggcctt gcaaaaataa gaactcatgt tgaagctt      639

```

<210> 4

<211> 208

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Ala Val Cys Gly Thr Gly Lys His Ser Leu Pro Asp Leu Pro Tyr Asp
 1              5              10              15

Tyr Gly Ala Leu Glu Pro His Ile Asn Ala Gln Ile Met Gln Leu His
          20              25              30

His Ser Lys His His Ala Ala Tyr Val Asn Asn Leu Asn Val Thr Glu
          35              40              45

Glu Lys Tyr Gln Glu Ala Leu Ala Lys Gly Asp Val Thr Ala Gln Ile
          50              55              60

Ala Leu Gln Pro Ala Leu Lys Phe Asn Gly Gly Gly His Ile Asn His
65              70              75              80

Ser Ile Phe Trp Thr Asn Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gly Glu Pro Lys
          85              90              95

Gly Glu Leu Leu Glu Ala Ile Lys Arg Asp Phe Gly Ser Phe Asp Lys
          100             105             110

Phe Lys Glu Lys Leu Thr Ala Ala Ser Val Gly Val Gln Gly Ser Gly
          115              120              125

Trp Gly Trp Leu Gly Phe Asn Lys Glu Arg Gly His Leu Gln Ile Ala
130              135              140

Ala Cys Pro Asn Gln Asp Pro Leu Gln Gly Thr Thr Gly Leu Ile Pro

```


ES 2 763 457 T3

165

170

175

Ile Pro Leu Leu Gly Ile Asp Val Trp Glu His Ala Tyr Tyr Leu Gln
 180 185 190

Tyr Lys Asn Val Arg Pro Asp Tyr Leu Lys Ala Ile Trp Asn Val Ile
 195 200 205

Asn Trp Glu Asn Val Thr Glu Arg Tyr Met Ala Cys Lys Lys
 210 215 220

<210> 6
 <211> 1589
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

```

gcggtgccct tgcggcgag ctgggtgct gccctgctc cccgctctt cttaagccc      60
gcgggcggcg caggagcggc actcgtggct gtgggtggct cggcagcggc ttcagcagat    120
cggcggcatc agcggtagca ccagcactag cagcatgttg agccgggcag tgtgcggcac     180
cagcaggcag ctggctccgg ttttgggta tctgggctcc aggcagaagc acagcctccc     240
cgacctgccc tacgactacg ggcacctgga acctcacatc aacgcgcaga tcatgcagct     300
gcaccacagc aagcaccacg cggcctacgt gaacaacctg aacgtcaccg aggagaagta     360
ccaggaggcg ttggccaagg gagatgttac agcccagata gctcttcagc ctgactgaa      420
gttcaatggg ggtggtcata tcaatcatag cattttctgg acaaacctca gccctaacgg     480
tgttgagaaa cccaaggagg agttgctgga agccatcaaa cgtgactttg gttcctttga     540
caagttaaag gagaagctga cggctgcata tgttgggtgc caaggctcag gttgggggtg     600
gcttggtttc aataaggaac ggggacactt acaaatgctt gcttgtccaa atcaggatcc     660
actgcaagga acaacaggcc ttattccact gctggggatt gatgtgtggg agcagcctta     720
ctacctcag tataaaaatg tcaggcctga ttatctaaaa gctatttga atgtaataca     780
ctgggagaat gtaactgaaa gatacatggc ttgcaaaaag taaaccacga tcgttatgct     840
gagtatgta agctctttat gactgttttt gtagtgggat agagtactgc agaatacagt     900
aagctgctct attgtagcat ttcttgatgt tcttagtca cttatttcat aaacaactta     960
atgttctgaa taatttctta ctaaactttt tgttattggg caagtgattg aaaatagtaa    1020
atgctttgtg tgattgaatc tgattggaca tttcttcag agagctaaat tacaattgtc    1080
attataaaa ccatcaaaa tattccatcc atatacttg gggacttga gggatgcctt     1140
tctagtcta ttctattgca gttatagaaa atctagtctt ttgccccagt tacttaaaaa    1200
taaaatatta aactttccc aagggaaca ctcggctttc tatagaaaat tgcactttt     1260
    
```

ES 2 763 457 T3

gtcgagtaat cctctgcagt gatacttctg gtagatgtca cccagtggtt tttgtaggt 1320
 caaatgttcc tgtatagttt ttgcaaatag agctgtatac tgtttaaatg tagcaggtga 1380
 actgaactgg ggtttgctca cctgcacagt aaaggcaaac ttcaacagca aaactgcaaa 1440
 aagtggtttt ttgcagtagg agaaaggagg atgtttatth gcagccaagc aaggagaatt 1500
 gggcagctca tgcttgagac ccaatctcca tgatgaccta caagctagag tatttaaagg 1560
 cagtggtaaa tttcaggaaa gcagaagtt 1589

<210> 7

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met	Ser	Pro	Ile	Leu	Gly	Tyr	Trp	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Asp	Gln	Pro	1	5	10	15
Thr	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Glu	His	Leu	20	25	30	
Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Trp	Arg	Asn	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	35	40	45	
Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Lys	50	55	60	
Leu	Thr	Gln	Ser	Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp	Lys	His	Asn	65	70	75	80
Met	Leu	Gly	Gly	Cys	Pro	Lys	Glu	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	85	90	95	
Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser	100	105	110	
Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu	115	120	125	
Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	130	135	140	
Gly	Asp	His	Val	Thr	His	Pro	Asp	Phe	Met	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	145	150	155	160
Val	Val	Leu	Tyr	Met	Asp	Pro	Met	Cys	Leu	Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Leu	165	170	175	

ES 2 763 457 T3

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
210 215 220

Gly Ser Met Leu Ser Arg Ala Val Cys Gly Thr Ser Arg Gln Leu Ala
225 230 235 240

Thr Val Leu Gly Tyr Leu Gly Ser Arg Gln Lys His Ser Leu Pro Asp
245 250 255

Leu Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu Pro His Ile Asn Ala Gln Ile
260 265 270

Met Gln Leu His His Ser Lys His His Ala Ala Ile Val Asn Asn Leu
275 280 285

Asn Val Thr Glu Glu Lys Tyr Gln Glu Ala Leu Ala Lys Gly Asp Val
290 295 300

Thr Ala Gln Ile Ala Leu Gln Pro Ala Leu Lys Phe Asn Gly Gly Gly
305 310 315 320

His Ile Asn His Pro Ile Phe Trp Thr Asn Leu Ser Pro Asn Gly Gly
325 330 335

Gly Glu Pro Lys Gly Glu Leu Leu Glu Ala Ile Lys Arg Asp Phe Gly
340 345 350

Ser Phe Asp Lys Phe Lys Glu Lys Leu Thr Ala Ala Ser Val Gly Val
355 360 365

Gln Gly Pro Gly Trp Gly Trp Leu Gly Phe Asn Lys Glu Arg Gly His
370 375 380

Leu Gln Ile Ala Ala Cys Pro Asn Gln Asp Pro Leu Gln Gly Thr Thr
385 390 395 400

Gly Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile Asp Val Trp Glu His Ala Tyr Tyr
405 410 415

Leu Gln Tyr Lys Asn Val Arg Pro Asp Tyr Leu Lys Ala Ile Trp Asn
420 425 430

Val Ile Asn Trp Glu Asn Val Thr Glu Arg Tyr Met Ala Cys Lys Lys
435 440 445

5 <210> 8
<211> 198
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

ES 2 763 457 T3

Lys His Ser Leu Pro Asp Leu Pro Tyr Asp Tyr Gly Ala Leu Glu Pro
 1 5 10 15
 His Ile Asn Ala Gln Ile Met Gln Leu His His Ser Lys His His Ala
 20 25 30
 Ala Tyr Val Asn Asn Leu Asn Val Thr Glu Glu Lys Tyr Gln Glu Ala
 35 40 45
 Leu Ala Lys Gly Asp Val Thr Ala Gln Ile Ala Leu Gln Pro Ala Leu
 50 55 60
 Lys Phe Asn Gly Gly Gly His Ile Asn His Ser Ile Phe Trp Thr Asn
 65 70 75 80
 Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gly Glu Pro Lys Gly Glu Leu Leu Glu Ala
 85 90 95
 Ile Lys Arg Asp Phe Gly Ser Phe Asp Lys Phe Lys Glu Lys Leu Thr
 100 105 110
 Ala Ala Ser Val Gly Val Gln Gly Ser Gly Trp Gly Trp Leu Gly Phe
 115 120 125
 Asn Lys Glu Arg Gly His Leu Gln Ile Ala Ala Cys Pro Asn Gln Asp
 130 135 140
 Pro Leu Gln Gly Thr Thr Gly Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile Asp Val
 145 150 155 160
 Trp Glu His Ala Tyr Tyr Leu Gln Tyr Lys Asn Val Arg Pro Asp Tyr
 165 170 175
 Leu Lys Ala Ile Trp Asn Val Ile Asn Trp Glu Asn Val Thr Glu Arg
 180 185 190
 Tyr Met Ala Cys Lys Lys
 195

REIVINDICACIONES

1. Una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 y que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 5 2. La proteína según la reivindicación 1 obtenible mediante la introducción en E. coli de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.
3. Una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
4. Una proteína que comprende la proteína de la reivindicación 3 y una secuencia TAG.
- 10 5. La proteína según las reivindicaciones 1 a 4 para uso como medicamento, preferiblemente para uso en un método para el tratamiento y/o la prevención y/o el diagnóstico de una enfermedad caracterizada por un exceso de radicales libres, en donde dicha enfermedad pertenece al grupo de las enfermedades vasculares, incluyendo la enfermedad vascular cardíaca, arterial coronaria o vascular periférica, cardiomiopatía dilatada, aneurisma, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, demencia y trastornos neurodegenerativos, envejecimiento, diabetes, trastornos autoinmunes con artritis reumatoide, enfermedad ocular, en particular una enfermedad de la retina o del cristalino, cataratas, cirrosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 15 6. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como agente antiinflamatorio y/o antioxidante.
- 20 7. La proteína para uso según la reivindicación 6 para uso en un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad neuroinflamatoria, en donde la enfermedad neuroinflamatoria es preferiblemente una enfermedad neurodegenerativa, y preferiblemente la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, depresión, enfermedades de los ganglios basales, aterosclerosis, accidente cerebrovascular, traumatismo, trastornos por abuso de sustancias, esclerosis lateral amiotrófica, encefalopatías mitocondriales.
- 25 8. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para el tratamiento y/o la prevención y/o el diagnóstico de una patología tumoral, sola o en combinación, como potenciador, con otras terapias, en donde la patología tumoral es preferiblemente una leucemia, preferiblemente leucemia linfoblástica aguda, preferiblemente la patología tumoral es un neuroblastoma, preferiblemente la patología tumoral afecta a un sujeto adulto o pediátrico.
9. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para el tratamiento y/o la prevención de cataratas.
- 30 10. La proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en una terapia radioprotectora o en un método para la prevención de daños inducidos por la irradiación de protones.
11. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína según se define en la reivindicación 3 o 4.
12. Un vector capaz de expresar eficazmente la proteína según se define en la reivindicación 3 o 4, que comprende la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 11.
- 35 13. Una célula huésped modificada con el vector según se define en la reivindicación 12.
14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína según las reivindicaciones 1 a 4 y los excipientes y/o diluyentes y/o vehículos adecuados, en donde preferiblemente la composición es para administración ocular.
15. Un kit para el diagnóstico de una enfermedad tumoral que comprende la proteína según las reivindicaciones 1 a 4.

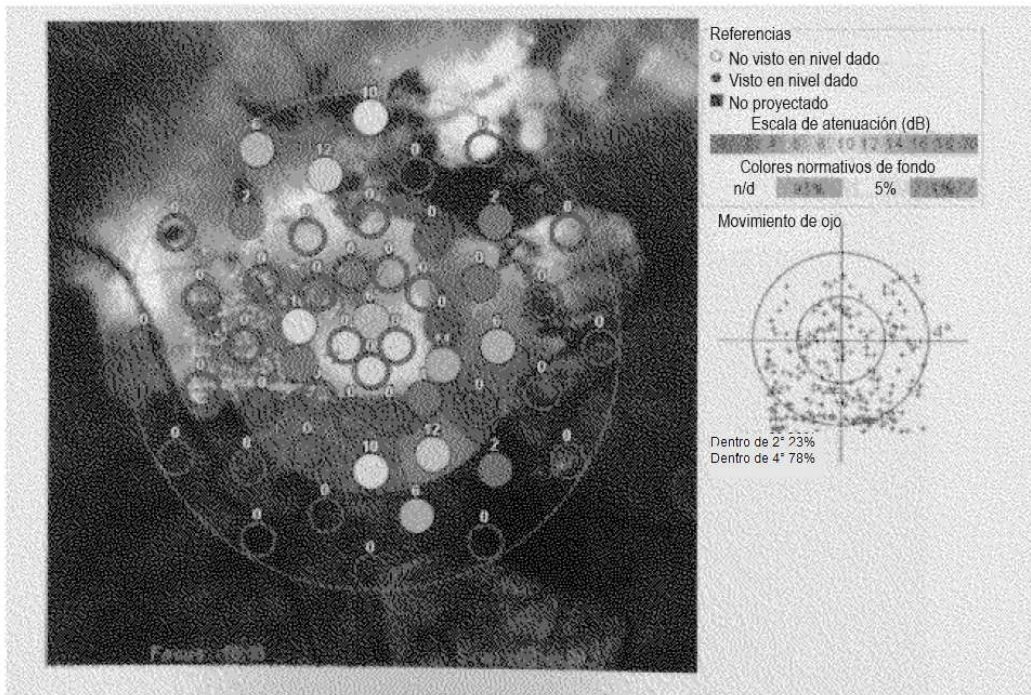


Fig. 1

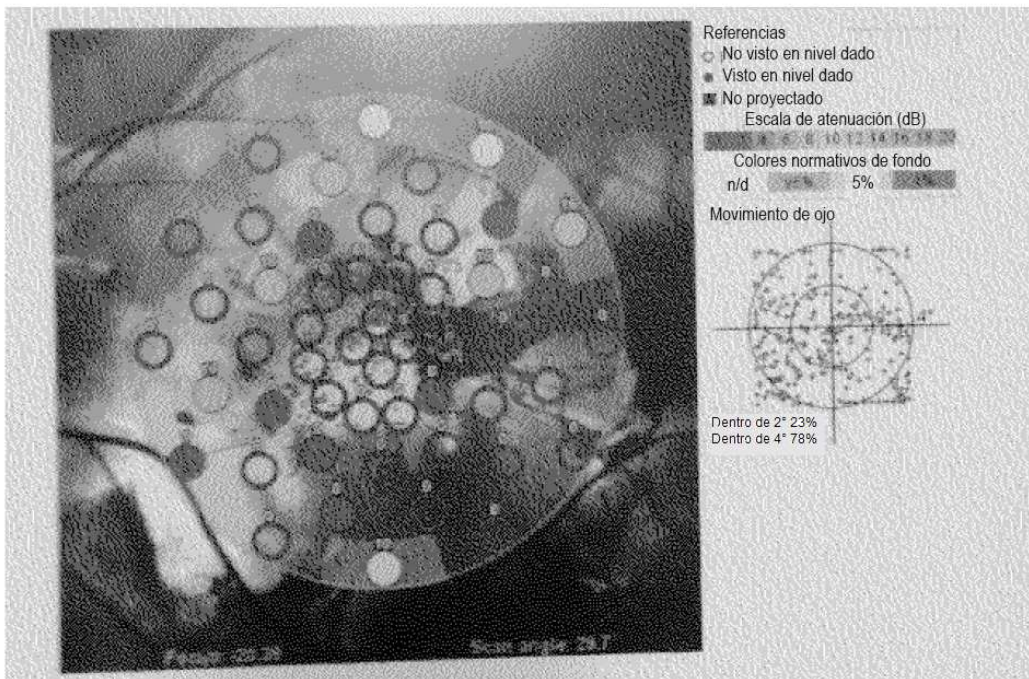
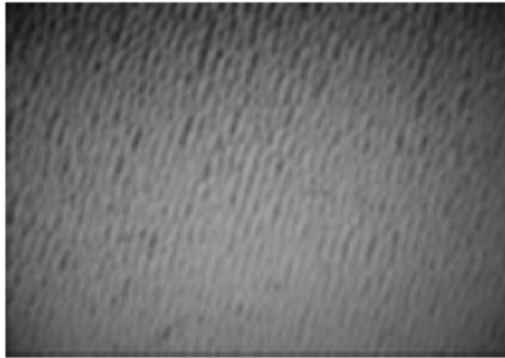


Fig. 2

A



B



Fig. 3

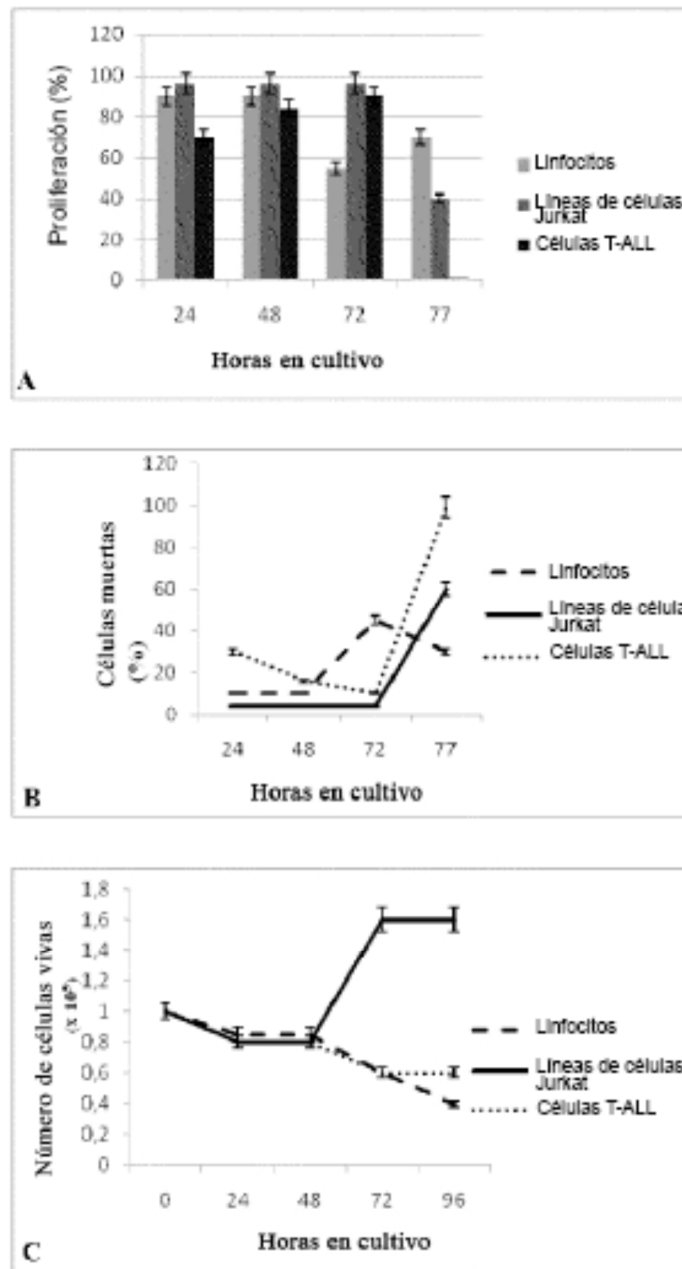
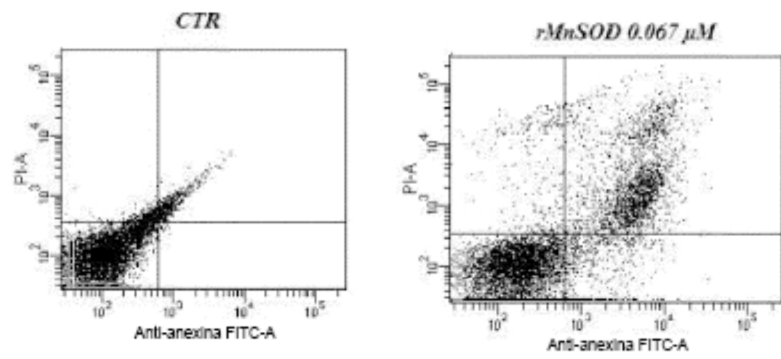


Fig. 4

A



B

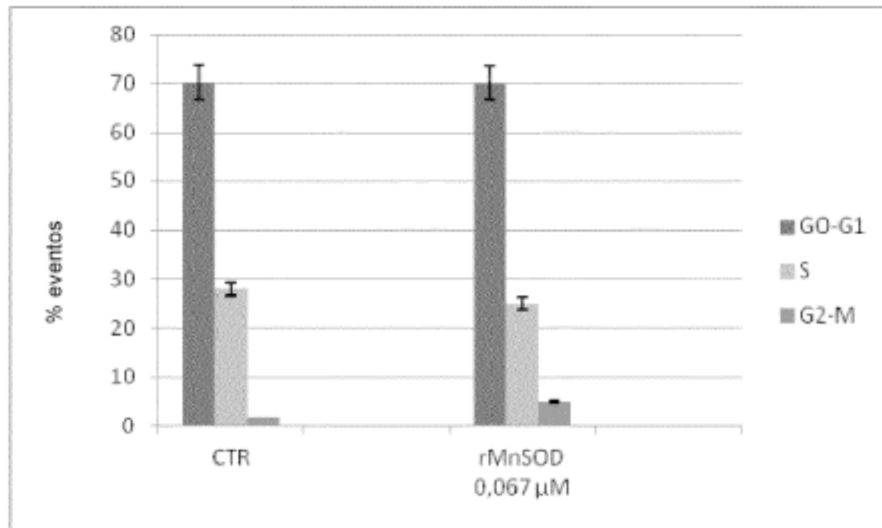


Fig. 5

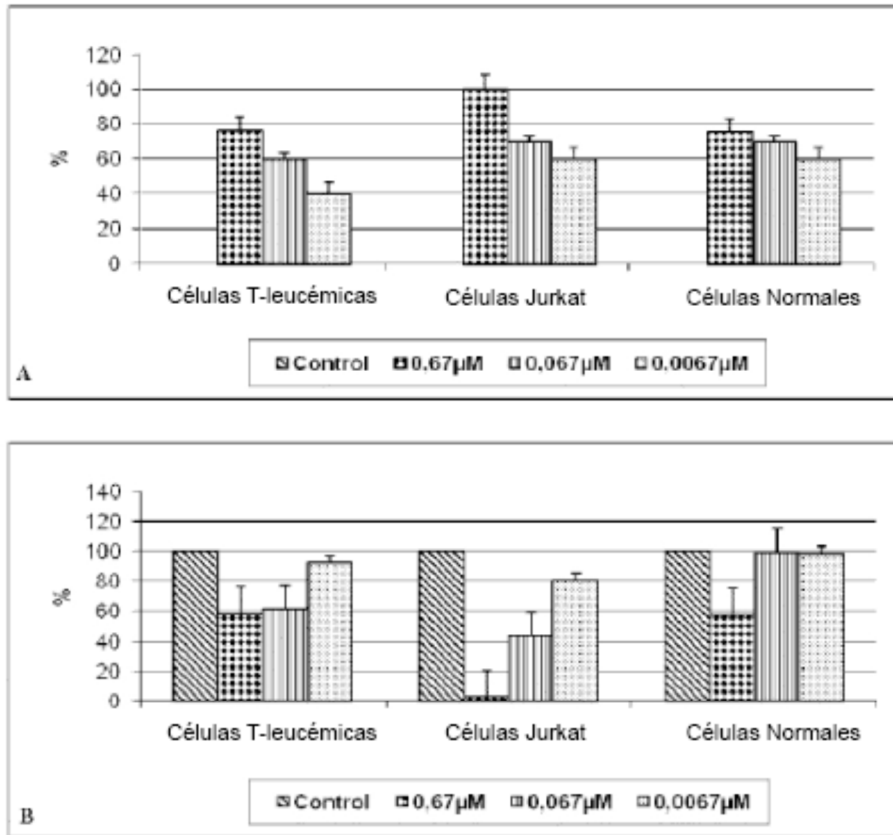


Fig. 6

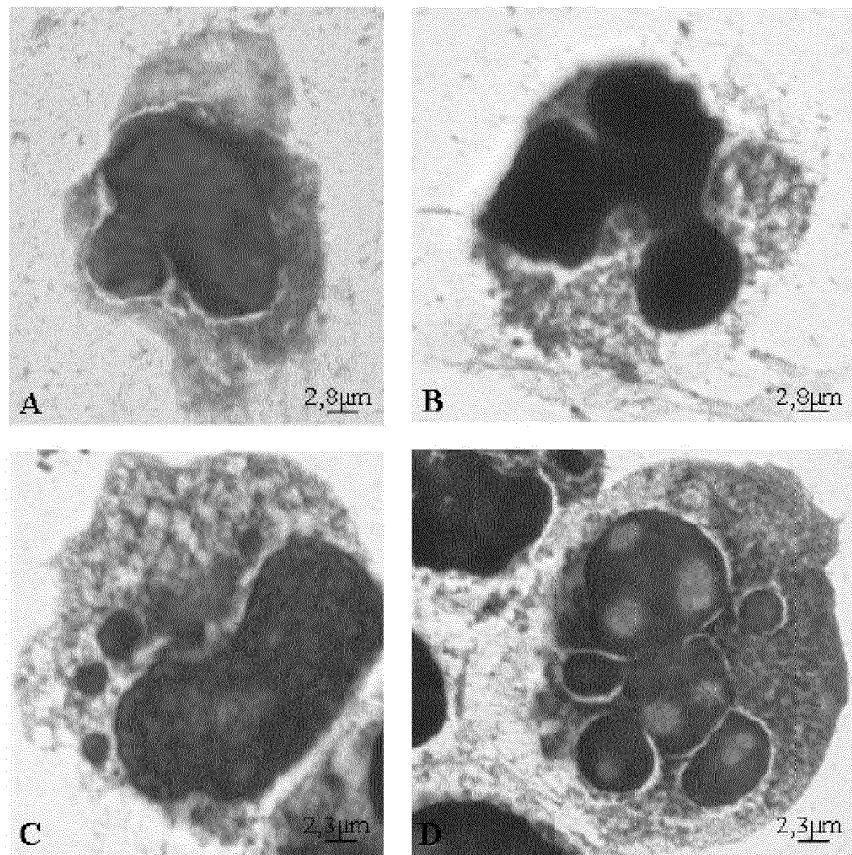


Fig. 7 (1/2)

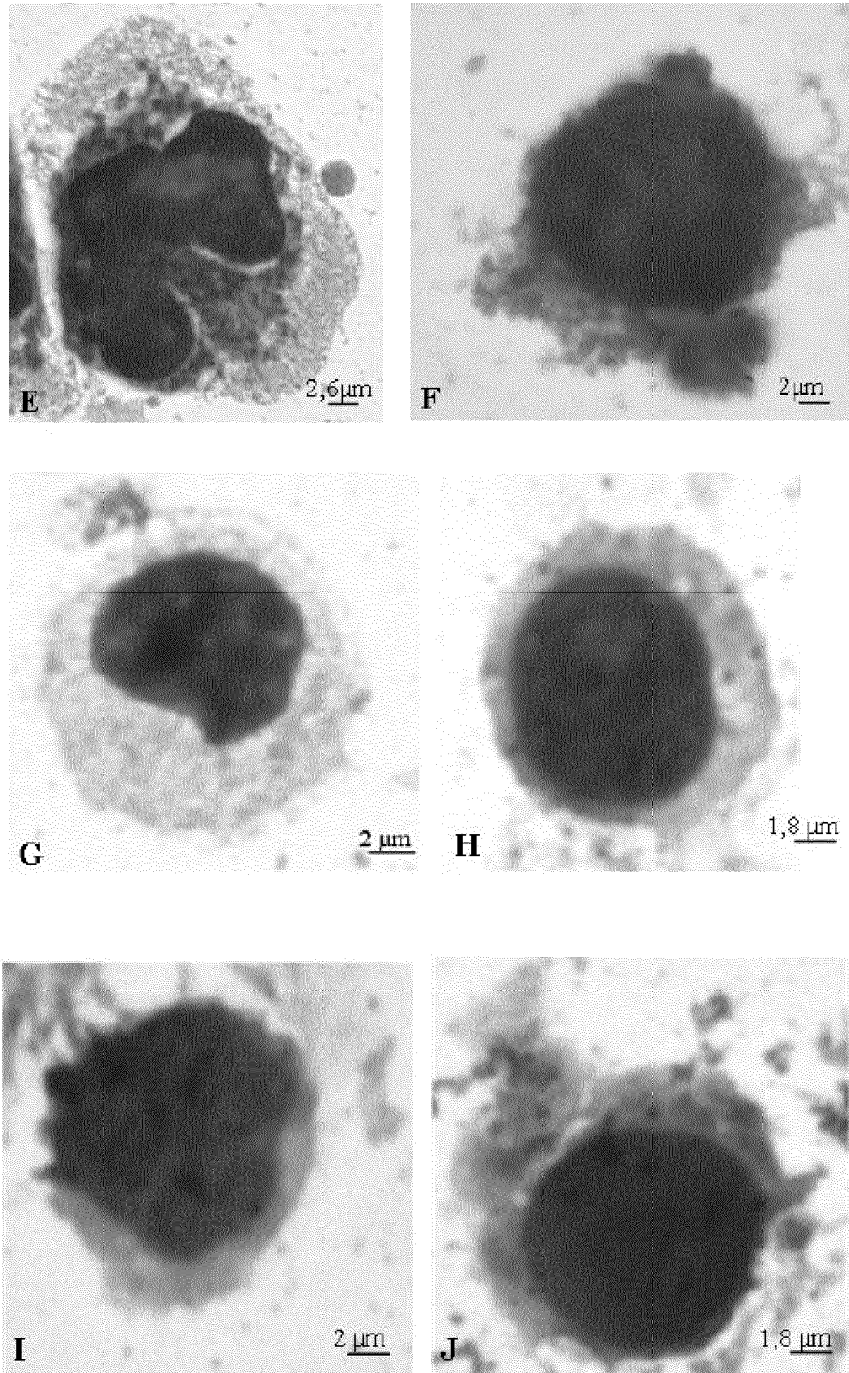


Fig. 7 (2/2)

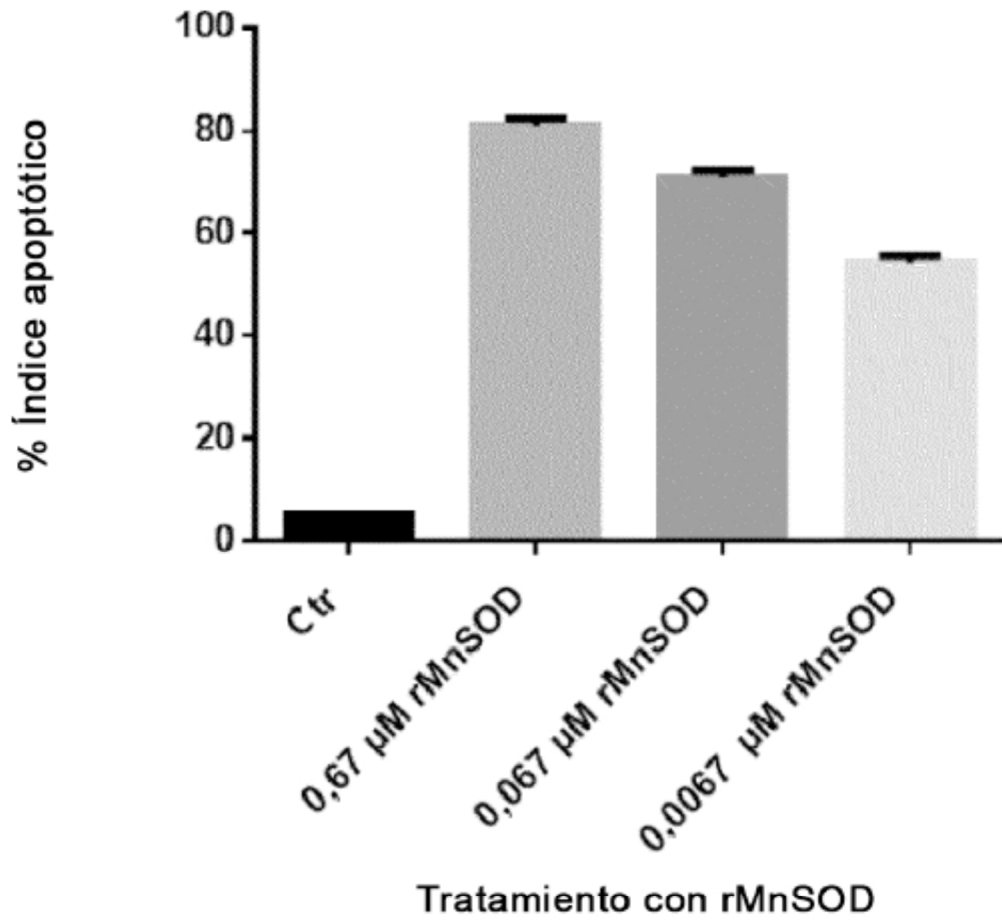


Fig. 8

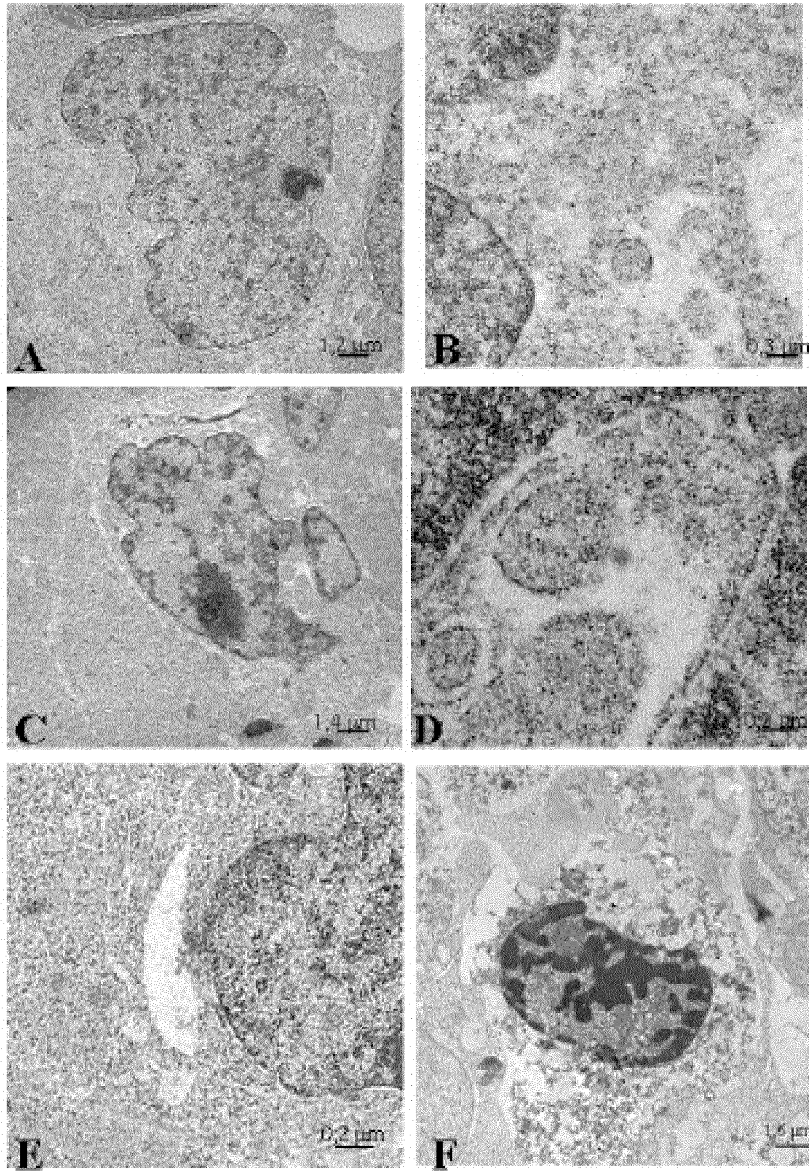


Fig. 9 (1/2)

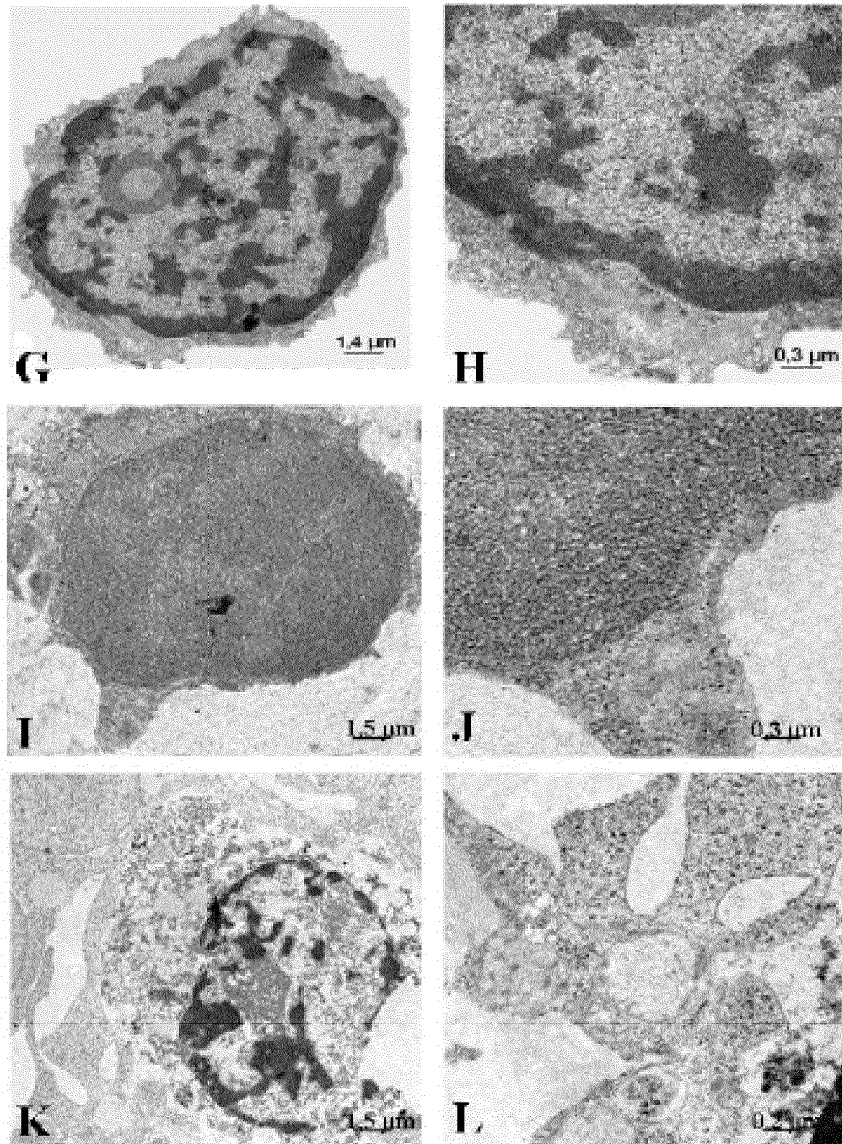


Fig. 9 (2/2)

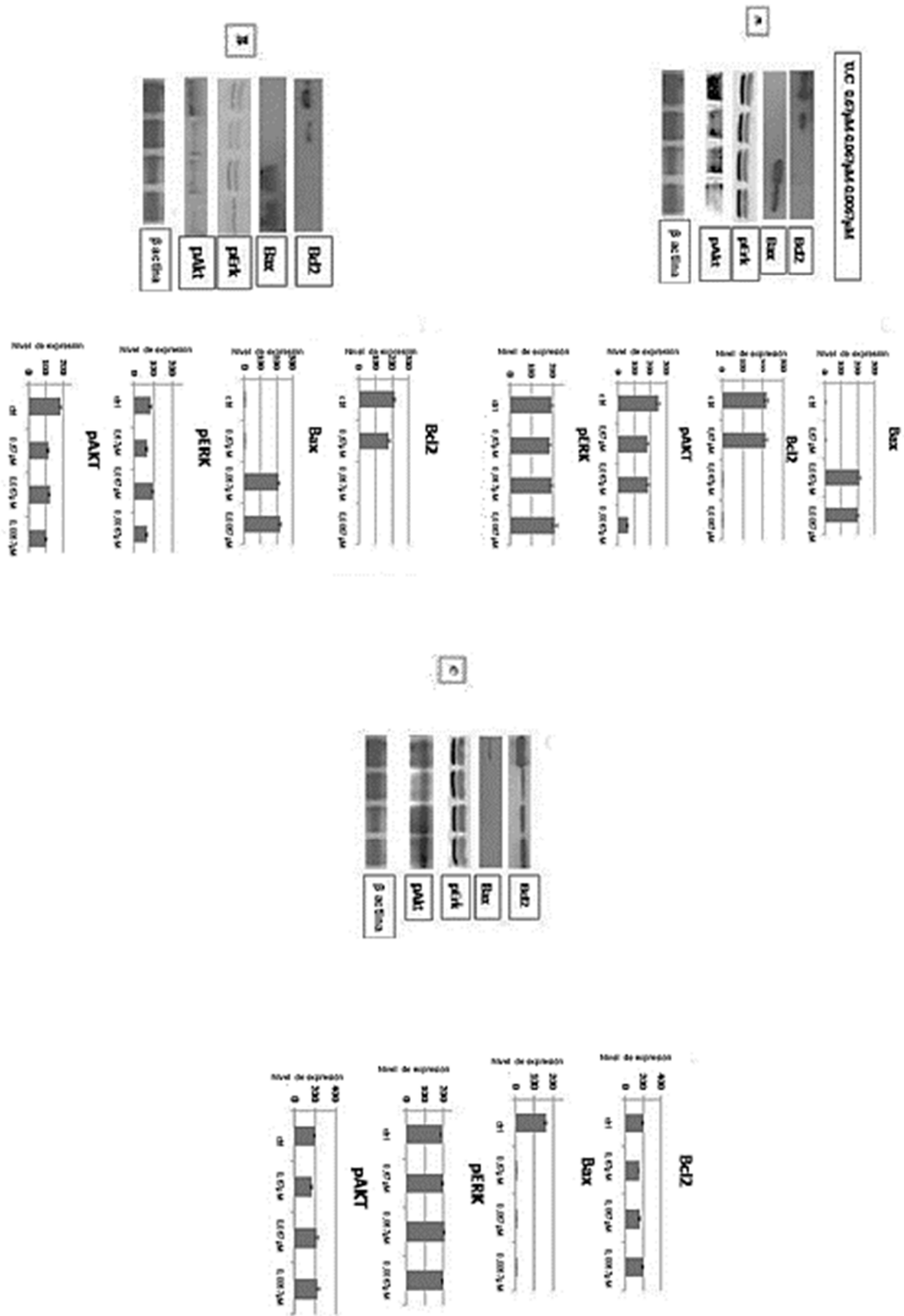
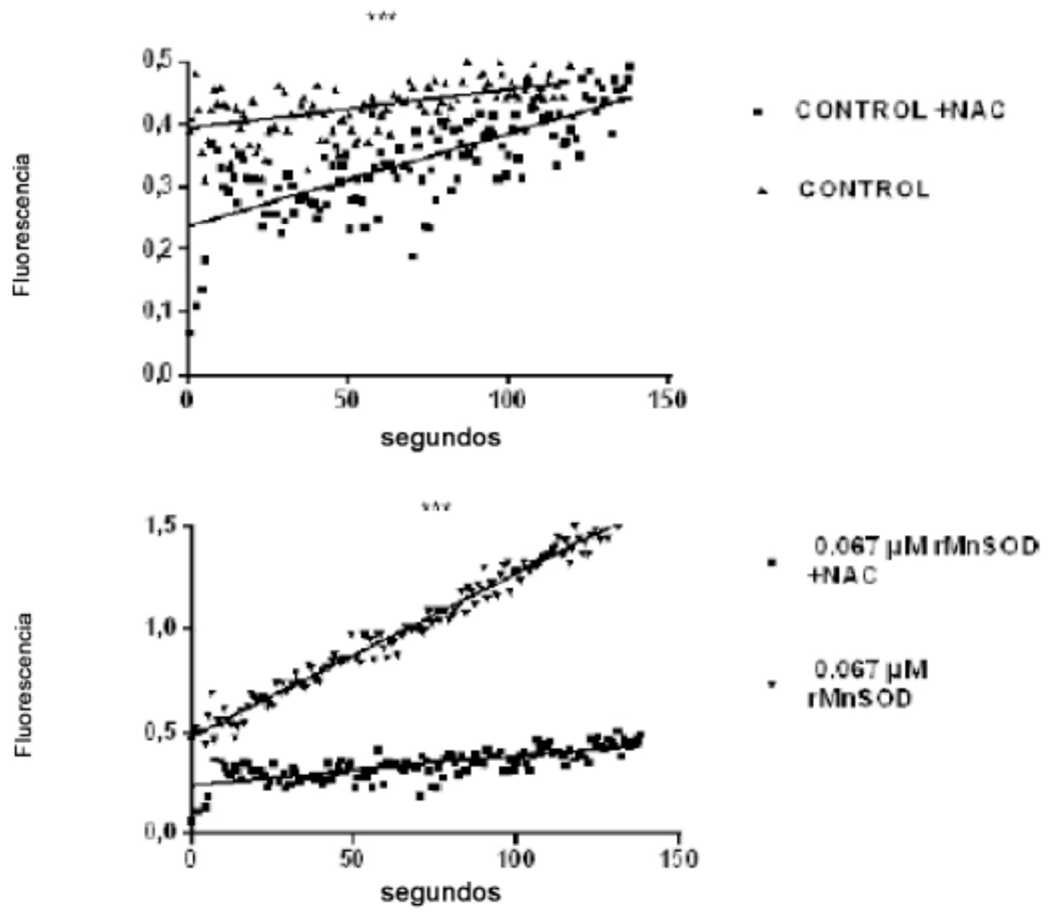


Fig. 10



valor P < 0,001***

Fig. 11

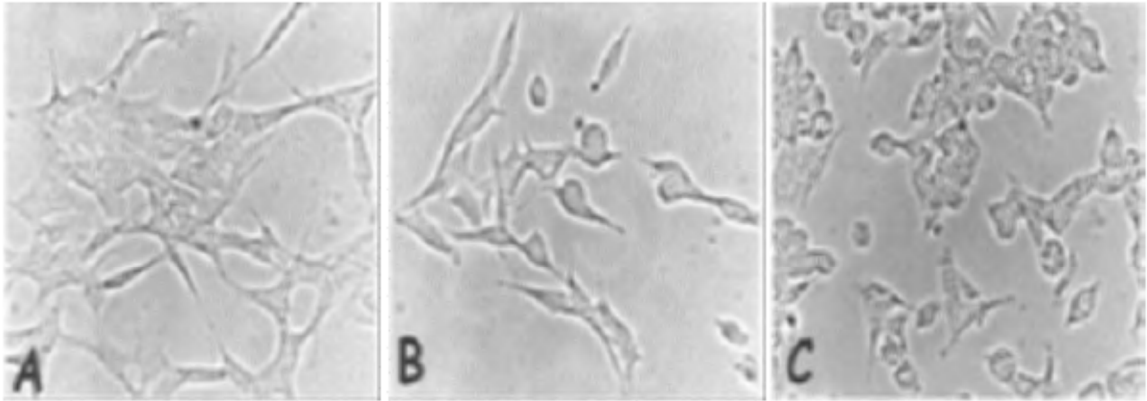


Fig. 12

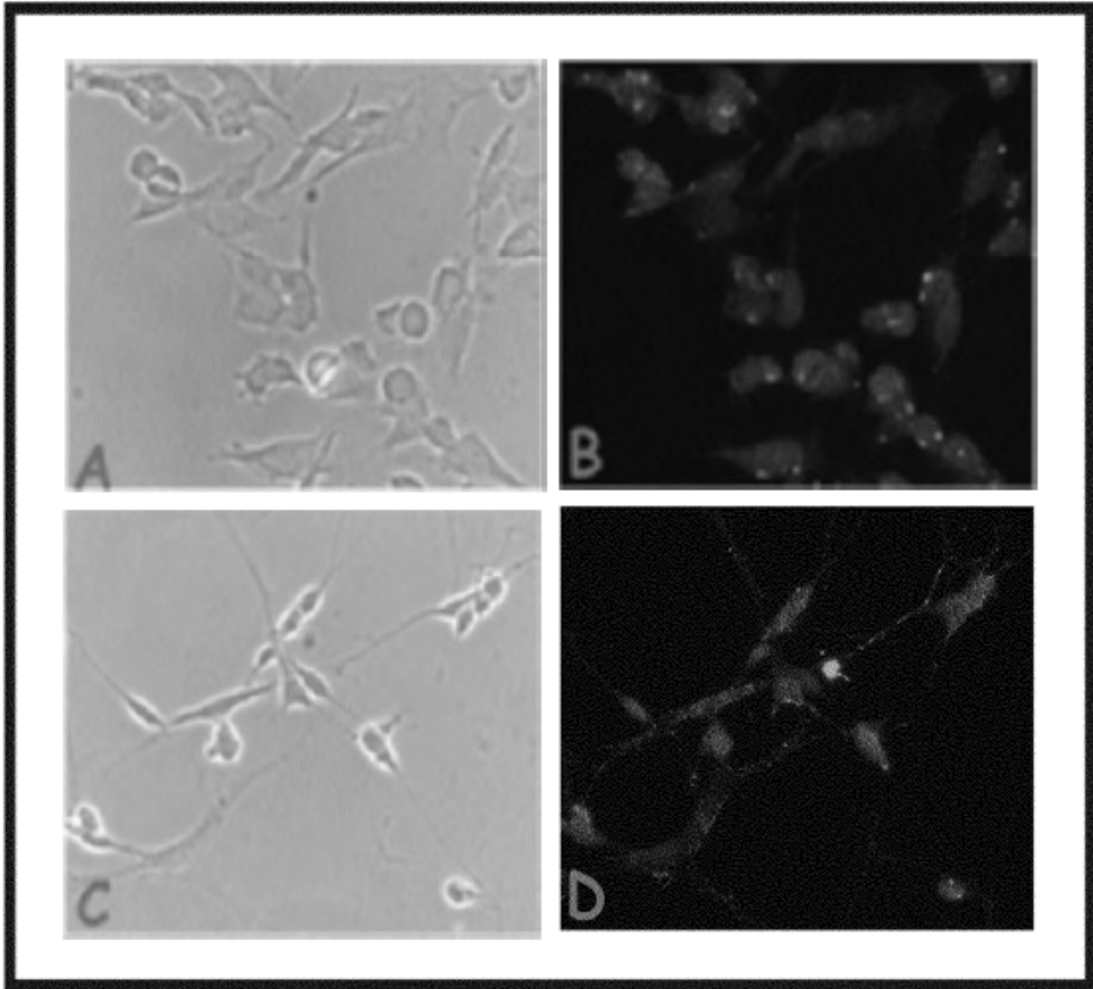


Fig. 13

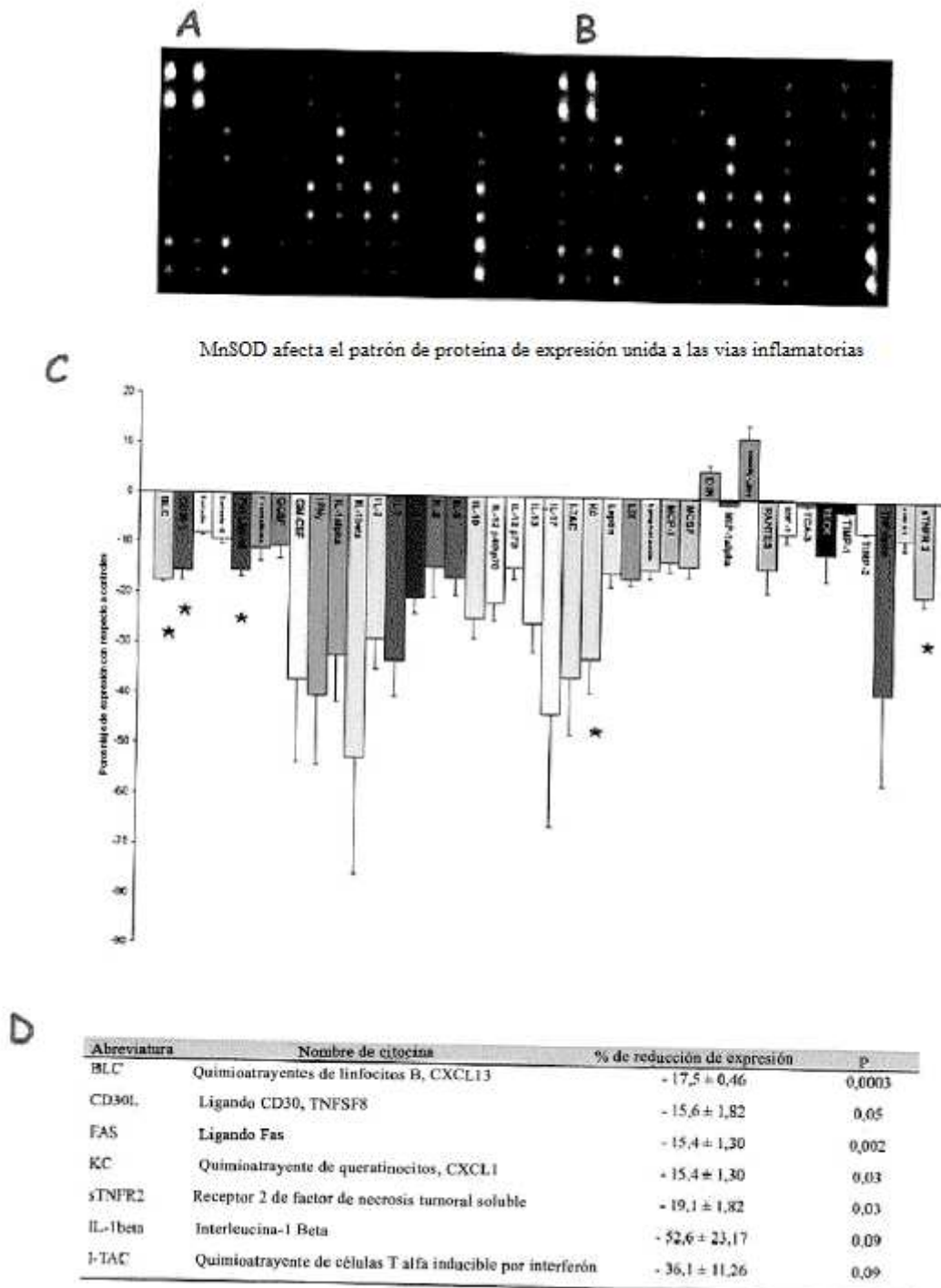


Fig. 14

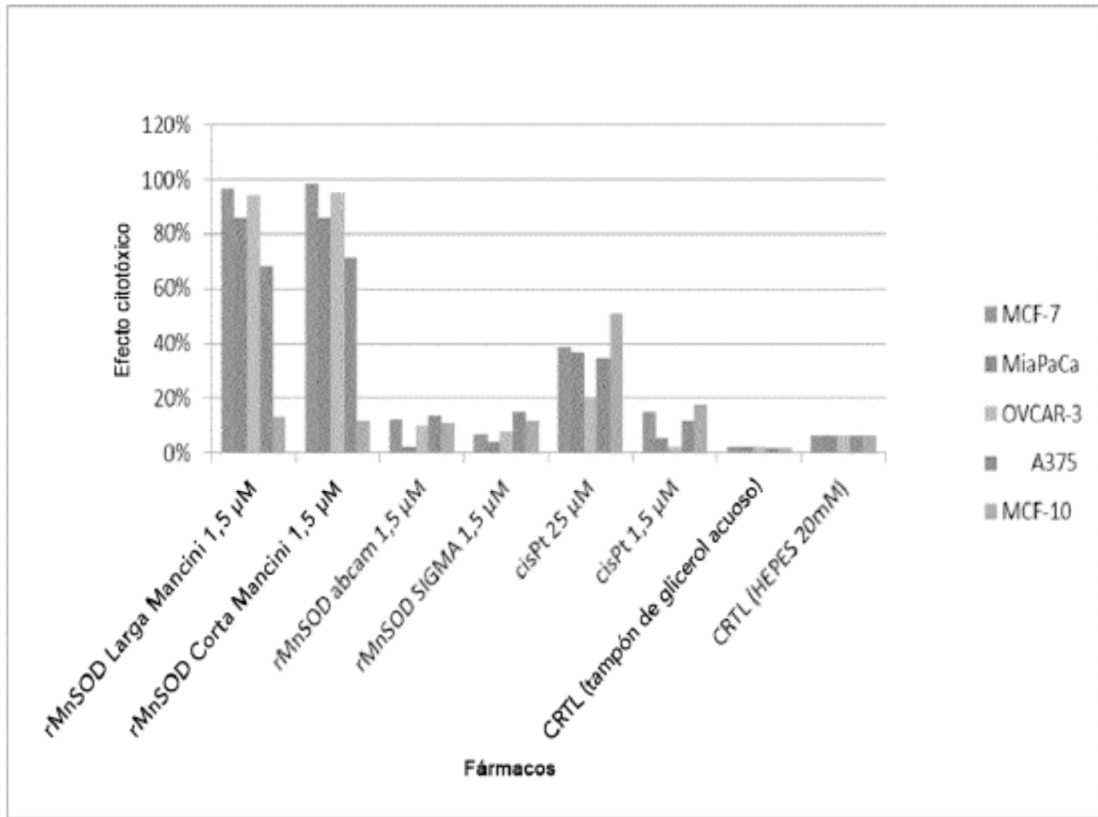


Fig.15