

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	76326
FECHA DE PRESENTACION	26.12.78

A1

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
864.724	27.12.77	EE.UU.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K;G01N	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA DETERMINAR BIOSINTESIS ANORMALES EN UN MEDIO BIOLOGICO"		
71 SOLICITANTE (S)		
MARIO GOSALVEZ GOSALVEZ		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Caleruega 21, 7º A, Pinar de Chamartin, Madrid		
72 INVENTOR (ES)		
el mismo solicitante		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. ALFONSO DIEZ DE RIVERA		(P.- 70.549)

Las enfermedades cancerosas, incluyendo tanto la leucemia como las neoplasias malignas, ocupan el tercer lugar en las causas de muerte de los seres humanos. La progresión de las neoplasias en su invasión del tejido sano depende principalmente de la tasa de crecimiento celular de las células neoplásicas. Aunque otros factores tales como la localización del tumor, el estado general de salud del paciente y la resistencia inmunológica del cuerpo son significativos, la malignidad de un tumor o de una leucemia está afectada principalmente por la tasa de crecimiento de sus células y es directamente proporcional a dicha tasa de crecimiento. Hasta ahora, el único método generalmente aceptado de detectar la malignidad de células tumorales ha sido por la observación de su morfología. La morfología celular indiferenciada y el aparato nuclear anormal son comunes a células que, análogamente a las células embrionarias indiferenciadas, presentan una elevada tasa de crecimiento o de multiplicación. El método "histológico" o morfológico cuantitativo hasta ahora utilizado para la diagnosis de la malignidad de un tumor no es completamente satisfactorio, debido a que su fiabilidad reside en la percepción visual por parte del patólogo de signos morfológicos mal definidos y al hecho de que, comúnmente, se toman decisiones quirúrgicas, de pronóstico y de otro tipo en base a la inspección de unos pocos cientos de micras de material sospechoso. Los exámenes histológicos pueden ser suplementados, por ejemplo por igualación o apareamiento inmunológico entre tumor y huésped, aunque este suplemento corroborativo, tanto si va acompañado o no por la atención a los signos clínicos, puede demostrar mu-

5 chas veces ser insuficiente o incluso claramente engañoso. Cuando se reconoce que muchas decisiones terapéuticas, económicas y sociales, en el caso de pacientes que sufren cáncer, están basadas enteramente en la diagnosis de la malignidad de un cáncer y el pronóstico resultante, se apreciará que haya surgido la necesidad de un verdadero método preciso y cuantitativo para determinar los grados relativos de malignidad o benignidad, basado en la determinación de la tasa de crecimiento celular. Esta necesidad es especialmente significativa en el caso de tumores, tales como los pólipos intestinales y los tumores de ovario y mamas, que frecuentemente exhiben una gran tasa de crecimiento celular, aunque parezcan ser morfológicamente benignos. En tales casos, la evaluación morfológica sola puede conducir a retrasos fatales cuando deben tomarse decisiones quirúrgicas.

15 La glicolisis aerobia (la producción de ácido láctico a partir de glucosa en presencia de oxígeno) parece ser una característica metabólica única de las células cancerosas y embrionarias. Los bioquímicos generalmente están de acuerdo en que una elevada glicolisis aerobia está asociada con altos grados de indiferenciación bioquímica, y se ha aceptado generalmente que la tasa de glicolisis aerobia en células tumorales está expresamente correlacionada con la tasa de crecimiento celular.

20 Yo he descubierto que la glicolisis aerobia en células cancerosas es atribuible al fallo del adenosintrifosfato (ATP) en inhibir la enzima glicolítica piruvato-kinasa. En las células normales, en presencia de oxígeno, el ATP generado por las mitocondrias inhibe esencialmente de un modo completo y alostérico dos enzimas en la ruta

metabólica de la glucosa al ácido láctico, es decir, la fosfofructokinasa y la piruvato-kinasa. Por consiguiente, en tejido normal no ocurre glicolisis en presencia de oxígeno. Sin embargo, ahora parece que en las células tumorales el ATP inhibe sólo parcialmente a la fosfofructoquinosa y que a la piruvato-kinasa la inhibe parcialmente o no la inhibe en absoluto. Pueden aplicarse métodos conocidos a la determinación del grado en el que las enzimas en esta ruta metabólica son inhibidas por el ATP. Yo he descubierto un elevado grado de correlación entre, por ejemplo, el grado de inhibición por el ATP del piruvato-kinasa en células cancerosas y el efecto de Crabtree y Pasteur exhibido por estas células. Además, cuando el porcentaje de inhibición por el ATP de la piruvato-kinasa en muestras de células sometidas a ensayos se compara con la malignidad o benignidad de los cánceres en los pacientes de los que se tomaron las células, según se determina por el estudio morfológico, biológico y clínico de la evolución de la enfermedad, se deduce un elevado grado de correlación. La Tabla I, entre otras cosas, compara la malignidad relativa de los cánceres en pacientes de varias especies con el porcentaje de inhibición por ATP de la piruvato-kinasa en homogeneizados de células cancerosas procedentes de dichos pacientes.

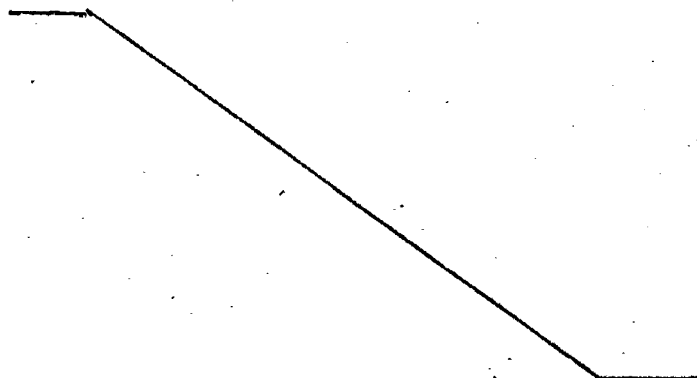


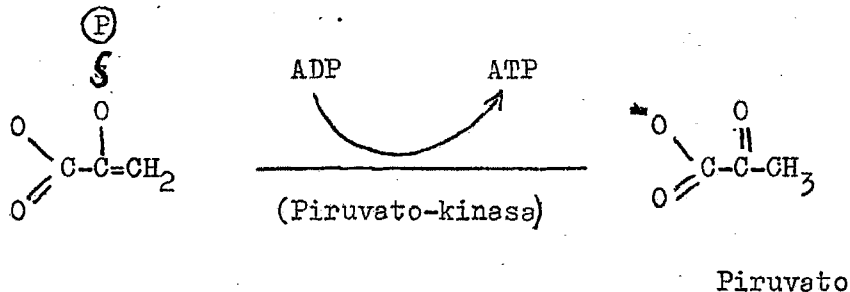
TABLA I

TEJIDO	ESPECIE	% DE INHIBICION	
		MAXIMA DE LA PIRU VATO-KINASA POR ATP	MALIGNIDAD
Tejido normal	Rata	99%	Ningún crecimiento celular
Hígado normal	Humana	99%	Ningún crecimiento celular
Fibroadenoma mamaria	Rata	49%	Muy benigno
Ependonoma cerebral	Humana	40%	Benigno
Tumor ascites de Erhlich (cepa Rome)	Ratón	39%	Baja tasa de crecimiento.
Leucemia linfoblástica aguda	Humana	32%	Moderadamente maligno
Leucemia P-P388	Ratón	25%	Maligno
Carcisarcoma de Walter	Rata	22%	Maligno
Carcinoma mamarario	Humana	17%	Maligno
Leucemia 1210	Ratón	16%	Muy maligno
Glioma	Humana	15%	Maligno
Carcinoma ovario	Humana	10%	Maligno
Glioma multiforme	Humana	4%	Muy maligno
Ascites de Erhlich (cepa de París)	Ratón	4%	Tasa de crecimiento muy elevada.

La evidencia experimental adicional para el pronunciado efecto de la inhibición por ATP de la piruvato-kinasa extraída de células cancerosas está descrita por M. Gosálvez, y otros en la publicación Cancer Research 38, 142-148, (1978).

#### DESCRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

La degradación escalonada de la glucosa a ácido pirúvico transcurre de acuerdo con la ruta bien conocida de Embden-Myerhof, e incluye la reacción:



20 Fosfoenolpiruvato

en donde ADP y ATP son respectivamente adenosin-difosfato y adenosin-trifosfato. En las células sanas esta reacción está suprimida mediante la inhibición por el ATP de la enzima piruvato-kinasa. Yo he descubierto, como he indicado anteriormente, que en las células cancerosas la reacción transcurre en un grado mayor o menor, correlacionado con el grado de malignidad, en proporción a la extensión mediante la cual el ATP deja de inhibir la actividad de la pirubato-kinasa. Así, un ensayo preferido implique la de-

30

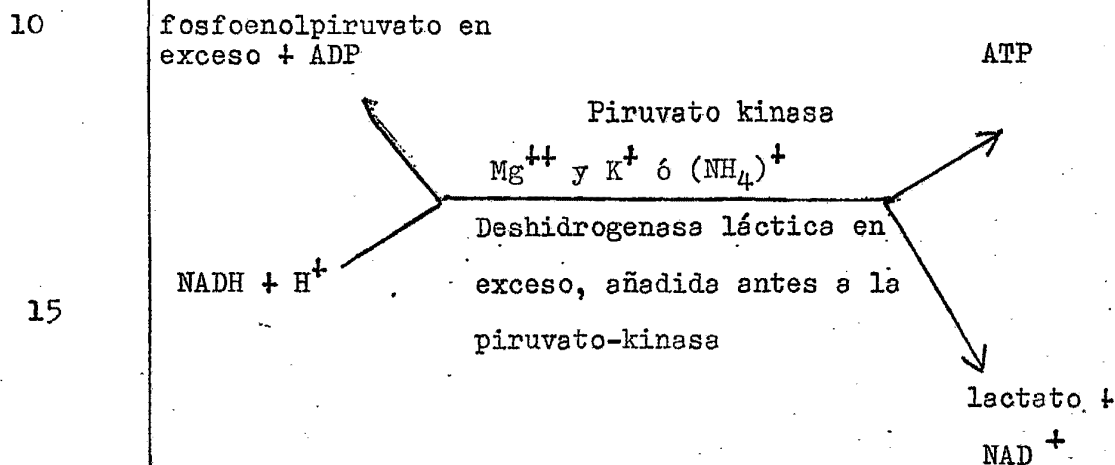
terminación del desarrollo de la reacción anterior en presencia de diversos niveles de ATP, calculados para revelar la extensión, si es que existe, mediante la cual la actividad de la piruvato-kinasa derivada de una muestra está mediatizada por el ATP. La extensión de tal mediatización puede caracterizarse en una escala relativa porcentual para la reacción anterior, tomando el 0% como ninguna inhibición, y el 100% como inhibición total, y la "inhibición porcentual máxima de la actividad de la piruvato-kinasa" como el punto de la escala después del cual la adición de más ATP deja esencialmente de afectar adicionalmente al progreso de la reacción.

El ensayo para la actividad de piruvato-kinasa derivado de una muestra puede comenzarse en cualquier momento antes de la conversión al fosfoenol-piruvato en la ruta de Embden-Meyerhof (como puede verse por ejemplo en J. D. Watson, Molecular Biology of the Gene pp. 34-35, (3rd ed. 1977) W.A. Benjamin, Inc., Publ., Menlo Park, Ca.) siempre que se suministren al medio de ensayo los sustratos, cofactores, enzimas y coenzimas necesarios. (Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "medio de ensayo de piruvato-kinasa" se refiere a una solución que contiene los ingredientes activos necesarios para el ensayo de actividad, distinta de la solución de ATP posteriormente añadida). Sin embargo, preferiblemente, la reacción de fosfoenolpiruvato es controlada directamente suministrando el fosfoenolpiruvato y ADP a la piruvato-kinasa derivada de la muestra, y siguiendo espectrofotométricamente la reacción resultante.

30

Un método especialmente preferido de espectro-

fotometría implica un ensayo óptico compuesto, en el cual se vigila la influencia de la reacción que se estudia sobre una reacción secundaria con un producto final observable. Véase Felu, FEBS Letters 50, 334 (1975) y Bucher, T. y otros., en Methods in Enzymology, Vol. I (S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.) Academic Press, N.Y. p. 435. Así, en la reacción compuesta:



20 la actividad de la piruvato-kinasa puede vigilarse observando la tasa de desaparición de la banda (a 340 m $\mu$ ) del donante de hidrógeno NADH (dinucleótido de nicotinamida-adenina, reducido). Las repeticiones sucesivas del ensayo con cantidades diferentes de ATP añadido, establecerán el

25 punto más allá del cual la adición de ATP deja de influenciar la tasa de desaparición del donante de hidrógeno. Así, por ejemplo, en una comparación gráfica de la disminución de la absorbancia en ausencia del ATP y con varias concentraciones de ATP, el máximo punto de inhibición alostérica ocurrirá en el punto de inflexión de la gráfica bifásica

resultante.

Las muestras para el ensayo pueden obtenerse como un tejido entero (por ejemplo 1-10 mm<sup>3</sup>) en el caso de tumores sospechosos, por intrabiopsia operatoria o por una biopsia con agujas. En el caso de malignidades sanguíneas sospechadas, será suficiente la recogida de leucocitos por centrifugación diferencial. Las muestras se conservan en hielo durante la preparación de los homogeneizados adecuados para el ensayo. La homogeneización libera la piruvatoquinasa contenida en las células para el ensayo e implica la ruptura de células por técnicas convencionales que evitan, en un grado útil, la destrucción de los núcleos, las mitocondrias y otras partículas celulares. Típicamente, la muestra puede ser colocada en un homogeneizador manual que está provisto con el equipo de ensayo, en una solución isotónica tamponada, y homogeneizada con diversos golpes de un mortero. Se emplea preferiblemente desde 0,1 a 1 ml de solución tamponada, dependiendo del tamaño de la muestra. Como uno de los muchos tampones apropiados puede mencionarse una solución que comprende 50 milimoles de tris-HCl, pH 7,0, 0,1 milimoles de EDTA y 0,5 milimoles de ditioeritrita. En la realización preferida el homogeneizado se centrifuga a continuación, como por ejemplo a aproximadamente 5.000 - 10.000 rpm en un tubo centrífugo cónico durante 10 minutos, y el líquido sobrenadante se dializa frente a agua (por ejemplo, 2 horas a aproximadamente 2-4°C), después de lo cual el contenido de la bolsa de diálisis se transfiere a un tubo sumergido en hielo. En el caso de muestras mayores, las etapas de centrifugación y diálisis pueden omitirse como se apreciará por los expertos en la técnica.

nica. Preferiblemente, sin embargo, una bolsa de diálisis será suministrada con el equipo de ensayo. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "homogeneizado" se refiere a un producto de homogeneización que contiene enzima libre, tanto si va acompañado como no de otros restos celulares.

En la realización más preferida, el equipo de ensayo o diagnóstico, incluye un medio de ensayo de piruvato-kinasa que, cuando se diluye cinco a diez veces con agua destilada, tendrá la composición siguiente: 50 milimoles de imidazol HCl, pH 7,0, 0,1 mol de KCl, 5 milimoles de  $MgCl_2$ , 0,15 milimoles de NADH, 1 milimol de Mg ADP, 2 milimoles de fosfoenolpiruvato y una unidad por mililitro de deshidrogenasa láctica. Una pequeña muestra de homogeneizado se añade, por ejemplo, a 3 ml de medio de ensayo en una cubeta, a la cual también se añade ATP desde una tercera solución para las determinaciones de la absorbancia del NADH a 340 m $\mu$ . En determinaciones sucesivas se obtienen diferentes concentraciones iniciales de ATP en la cubeta, por ejemplo 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 milimoles. Una representación gráfica de la disminución de la absorbancia frente a la concentración de ATP proporcionada, en el caso de una muestra cancerosa, el máximo porcentaje de inhibición del piruvato-kinasa por el ATP. Alternativamente, como los expertos en la técnica apreciarán de la descripción anterior, un resultado "si-no" puede determinarse comparando la inhibición de la piruvato-kinasa a una concentración particular y óptima de ATP con valores previamente determinados a esa concentración con muestras de malignidad conocida, de cada tipo diferente de cáncer que se somete a en-

sayo.

En su aspecto más amplio, mi invento reside en el reconocimiento de que la susceptibilidad de la piruvato-kinasa procedente de células a la inhibición por el ATP, está correlacionada con la tasa de crecimiento celular relativa y el grado de indiferenciación, y por tanto la malignidad, de las células de las que procede la enzima. El invento proporciona por consiguiente un método bioquímico cuantitativo para la diagnosis y pronóstico de enfermedades cancerosas. Se apreciará que el principio anterior encuentra aplicación en diversas realizaciones además de los esquemas preferidos antes descritos. Por consiguiente, el invento no está limitado a dichas realizaciones, sino que solamente lo está por el alcance legal de las reivindicaciones que siguen a continuación.

1

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

5

10

15

20

1ª.- Un método para determinar biosíntesis anormales en un medio biológico, que comprende: a) preparar una muestra homogeneizada de células que contienen piruvato-kinasa; b) añadir una parte de la muestra a un medio de ensayo de piruvato-kinasa que comprende fosfoenolpiruvato, adenosin-difosfato, deshidrogenasa láctica, y un donante de hidrógeno; c) añadir una cantidad especificada de adenosin-trifosfato; d) determinar por métodos analíticos instrumentales el régimen de desaparición del donante de hidrógeno, en la mezcla resultante de la etapa "c"; y e) repetir las operaciones b) a d) variando la cantidad de adenosin-trifosfato añadido, hasta que se determina un punto más allá del cual la adición de más cantidad de adenosin-trifosfato cesa esencialmente en afectar al régimen de desaparición del donante de hidrógeno.

25

2ª.- Método según la reivindicación 1ª, en el que se determina también el régimen de desaparición del donante de hidrógeno en ausencia de cualquier adenosin-trifosfato añadido.

30

3ª.- Método según la reivindicación 1ª, en el que se determina la máxima extensión en la que es inhibida la piruvato-kinasa por adenosin-trifosfato.

4ª.- Método según la reivindicación 1ª, en el que la determinación analítica instrumental se realizar por

espectrofotometría.

5<sup>a</sup>.- Método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en el que la determinación analítica instrumental se realiza por un ensayo óptico.

5 6<sup>a</sup>.- Método según las reivindicaciones precedentes, en el que el donante de hidrógeno, es dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH).

7<sup>a</sup>.- Un método para determinar biosíntesis anormales en un medio biológico.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 26. DIC. 1978

P.A

Alfonso Díez de Rivera  
For For

18128/GM.