

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 018 016**

(21) Número de solicitud: 202330927

(51) Int. Cl.:

A61K 36/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

13.11.2023

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

14.05.2025

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (44.00%)
Avda. del Hospicio, s/n
18071 Granada (Granada) ES;
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (30.50%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (25.50%)

(72) Inventor/es:

ESCUDERO FELIU, Julia;
LEÓN LÓPEZ, Josefa;
JIMÉNEZ LÓPEZ, José C.;
NÚÑEZ TORRES, María Isabel;
CARAZO GALLEGOS, Ángel;
LIMA CABELO, María Elena;
PUENTES PARDO, José David y
MORENO SAN JUAN, Sara

(74) Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

(54) Título: **Uso de proteínas conglutinas β como agentes radiosensibilizadores**

(57) Resumen:

Proteínas conglutinas β de la semilla del altramuz azul (*Lupinus angustifolius L.*), preferiblemente las isoformas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$, para su uso como adyuvante y radiosensibilizador en el tratamiento con radioterapia con radiación ionizante de cáncer, preferentemente cáncer de mama y más preferentemente, cáncer de mama triple negativo.

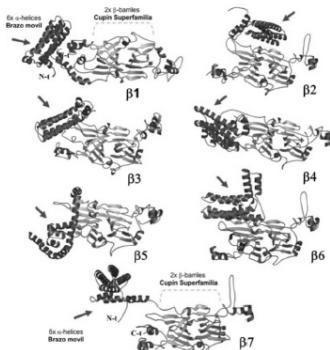


FIG.1

DESCRIPCIÓN

Uso de proteínas conglutinas β como agentes radiosensibilizadores

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se enmarca en el campo de la Medicina, en concreto dentro de las terapias para el tratamiento del cáncer y tiene como objetivo la identificación de nuevos agentes radiosensibilizadores que permitan aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la radioterapia.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El cáncer de mama (CM) es el tumor más prevalente entre las mujeres, el segundo más frecuente en todo el mundo y el quinto en términos de mortalidad. Desde el punto de vista clínico, el CM es una enfermedad heterogénea con grandes diferencias en su pronóstico, tratamiento y perspectivas de éxito. A nivel molecular, el CM se clasifica en base a la presencia o ausencia de receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), categorizándose en tipo Luminal A (ER+ y PR+, HER2-), mejor pronóstico, una lenta tasa de crecimiento y menor potencial agresivo; tipo Luminal B (ER+ y PR+, HER2+) con un peor pronóstico y una tasa de crecimiento más rápida, o tipo Triple negativo (ER-, PR- y HER2-) que se encuentra en mujeres que presentan mutaciones en el gen BRCA1 y que corresponde a tumores ductales infiltrantes con altas tasas de metástasis.

En la actualidad los principales tratamientos para el CM incluyen cirugía, terapia hormonal, quimioterapia, radioterapia (RT) e inmunoterapia. Las terapias pueden tener una eficacia limitada dependiendo del tipo molecular, lo que hace que el CM sea extremadamente difícil de tratar.

La radiación ionizante (RI) en RT se está utilizando en el tratamiento de la mayoría de los tumores, ya que la RI daña las células. La RI activa la respuesta inmunitaria antitumoral, activando vías señalización que son habitualmente suprimidas por el tumor, como la muerte celular o las células inmunitarias supresoras.

La RT es un tratamiento altamente selectivo y eficaz en un gran número de tumores. Su éxito en la erradicación del tumor depende principalmente de la dosis total de radiación administrada, que a su vez está limitada por la tolerancia del tejido normal que rodea al

tumor. En concreto en CM el régimen radioterapéutico más comúnmente aplicado es la RT convencional (fracciones diarias de 2 Gy), alcanzando una dosis total de 45-50 Gy. Sin embargo, en las últimas décadas es más frecuente el tratamiento con RT hipofraccionada que implica dosis de radiación más altas (fracciones >2 Gy) en tiempos de tratamiento más cortos. La RT hipofraccionada aplica dosis de entre 2,66 Gy hasta más de 6 Gy por sesión lo que permite reducir los tiempos de tratamiento, manteniendo e incluso aumentando la eficacia de la RT convencional. .

Otra limitación de la RT está relacionada con la radioresistencia intrínseca del tumor, debida a la presencia de células madre cancerosas (CSCs) que pueden sobrevivir a los regímenes convencionales de RT y repoblar el tumor, contribuyendo a la recurrencia del tumor y a la metástasis. Se ha demostrado que bajas dosis de radiación potencian el enriquecimiento de la fracción celular con mayor capacidad de autorrenovación que expresa marcadores de CSCs, por lo que una de las mayores limitaciones de la RT es la inducción colateral de metástasis, del fenotipo de CSCs y de metabolismo oncogénico [1].

Las CSCs tienen ciertas características de las células madre/progenitoras normales pero un mayor potencial tumorigénico. Además, tienen una alta capacidad para reparar el daño en el ADN, capacidad ilimitada de autorrenovación, proliferación y diferenciación a otras líneas celulares, y una alta supervivencia en el torrente sanguíneo. Por todo ello, las CSCs juegan un papel importante en los procesos de resistencia a tratamientos oncológicos y recurrencia o recaída, por lo que las terapias dirigidas a las CSCs son claves para la erradicación completa del tumor.

Estas razones explican la aparición de nuevos radiosensibilizadores como adyuvantes para potenciar los efectos de la RT que permitan un control sistémico de la enfermedad y mejorar los resultados oncológicos [2]. Algunos compuestos nutracéuticos de origen vegetal han mostrado resultados prometedores en este sentido.

Las proteínas de semillas de leguminosas han demostrado beneficios para la salud como alimentos funcionales. En particular, las semillas de *Lupinus angustifolius* L., altramuz azul o altramuz de hoja estrecha, han mostrado su potencial para la mejora en enfermedades de base inflamatoria como la diabetes tipo 2. Estudios recientes [3–6] han demostrado que uno de los principales compuestos de estas semillas, las proteínas conglutinas β , median en la mejora de los efectos de las enfermedades relacionadas con la inflamación a nivel molecular, debido a su multifuncionalidad [3].

Las proteínas conglutinas β pertenecen a la familia de proteínas denominadas vicilinas o globulinas 7S, y en ellas se identifican 7 genes funcionales (β_1 a β_7) [7], de los cuales algunos proporcionan su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antidiabética [3].

A continuación, se facilitan las secuencias aminoacídicas de las proteínas conglutinas β_1 - β_7 aisladas de semilla de altramuz azul y el número de acceso a la secuencia nucleotídica de ARNm codificador en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>) de cada una de ellas.

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β_1 aislada de semilla de altramuz azul; SEQ ID NO: 1, con número de acceso F5B8V9 dentro de la base de datos de proteínas 10 denominada Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), es la siguiente:

```
MAKMRVRLPMLLLLLGVVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREEREHEPRQQPRPRQQEEQE  
REHRREEKHDGEPSRGRSQSEESQEEEHERRREHHREREQEQQPRPQRRQEEEEEEEEE  
WQPRRQRPQSRREEREREQEQGSSSGSQRSGDERRQHRERRVHREEREQEQDSRS  
DSRRQRNPYHFSSNRFQTYYRNNGQIRVLERFNQRTNRLENLQNYRIIEFQSKPNTLILPK  
15 HSDADFLVVLNGRATITIVNPDKRQVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPI  
NNPGKLYDFYPSTTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDELQENEKQRRGQE  
QSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSESGPFNLSNKPIYSNKFGNFYEITPDI  
NPQFQDLNISLTFTINEGALLPHYNNSKAIFIVVDEGEGENYELVGIRDQQRQQDEQEEEYE  
QGEEEVRRYSDKLSKGDVFIIPAGHPLSINASSNLRLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQL  
20 DREVKELTTFPGSIEDVERLIKNNQQSYFANAQPQQQQREKEGRRGRRGPISSILNALY
```

De igual forma, proteína conglutina β_1 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de ARNm codificador; con número de acceso HQ670409 en GenBank, SEQ ID NO: 8 (**Figura 2**).

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β_2 aislada de semilla de altramuz azul; 25 SEQ ID NO: 2, con número de acceso F5B8W0 en Uniprot, es la siguiente

```
MANMRVKFPTLVLLGIVFLMAVSIGIAYGEKNAIKNHERPQEREQEERDPRQQPRPRHQEE  
QEREHGEEERNREPSRGRSESEESREEEREQRREPSRGREQQPQHGRREEEEEEWQ  
PRRQRPQSRREEREREQEQGSSSSGRQSGYERREQREEREQQQEQDSRSSESRRQRNPYY  
FSYERFQTLYKNRNGQIRVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSKPNTLILPKHSDADYILVVL  
30 NGRATITIVNPDKRQAYNLEHGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVVKLAIPINNPGNFYDFY  
PSSTKDQQSYFNGFSRNTLEATFNTRYEEIQRIILGNEDGQEDEEQSRGQESEQHQDQGVIV  
RVSKEQIQELRKHAQSSSGKGKPSESGPFNLSDEPIYSNKFGNFYEITPDRNPQAQDLDIS
```

LTFIEINEGGLLLPHYNSKAIFVVVVDEGEGNYELVGIRDQERQQDEQEVEVRRYNAKLSE
GDIFVIPAGHPISINASSNLRLGFGINADENQRNFLAGSEDNVIRQLDKEVKQLTFPGSVED
VERLIKNNQQQSYFANAQPQQQQREKEGRRGRRGLSFPRSLFTKLLSTIM

De igual forma, proteína conglutina β 2 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de 5 ARNm codificador; con número de acceso HQ670410 en GenBank, SEQ ID NO: 9 (**Figura 2**).

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β 3 aislada de semilla de altramuz azul; SEQ ID NO: 3, con número de acceso F5B8W1 en Uniprot, es la siguiente:

MAKMRVRFP TLVLLGIVFLMAVSIGIAYGEKNVLKNHERPQEREQEE RDPRQQPRPHHQE
10 EQEREHRRESEESQEEEREQRREREQEQQQPQHGRREEEEWQPRRQRPQS RREE
REQEQGSSSSRRQSGYERREQREEREQEQEQGSRS DSRRQRNPYYFSSERFQTLYRN
RNGQIRVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSKPNTLILPKHSDADYILVVLNGSATITIVNPDK
RQSYNLENGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVVKLAIPINNPGNFYDFYPSSKDQQSYFS
GFSKNTLEATFNTRYEEIQSILLGNEDEQEDDEQWHGQE QSHQDEGVIVRVSKEQVQELRK
15 YAQSSSRKGKP YESGP FNLSNKPIYSNKFGNFYEITPD RNPQAQDLDISLT FIEINEGALLP
HYNSKAIFVVVVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEVEVRRYSARLSEG DIFVIPAGHPISINAS
SNLRLGFGINADENQRNFLAGSEDNVIRQLDREVKG LIFPGSAEDVERLIKNNQQQSYFANA
QPQQQQQREREGRHGRGHISI LSTLY

De igual forma, proteína conglutina β 3 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de 20 ARNm codificador; con número de acceso HQ670411 en GenBank, SEQ ID NO: 10 (**Figura 2**).

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β 4 aislada de semilla de altramuz azul; SEQ ID NO: 4, número de acceso F5B8W2 en Uniprot, es la siguiente:

MIKMRVRFP TLVLLGIVFLMAVSIGIAYGEKNVIKNHERPQEREQEE RDPRQQPRPHHQEE
25 QEREHRREEERDREPSRG RSESEESREEEREQRREREQEQQQPQHGRREEEEWQ
PRRQRPQSRREEREQEQGSSSSRRQSGYERREEREQEQEQGSRS DSRRQRNPYYFSS
ERFQTLYRN RNGQIRVLERFDQRTDRLENLQNYRIVEFQSKPNTLILPKHSDADYILVVLNGS
ATITIVNPDKRQSYNLENGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVVKLAIPINNPGNFYDFYPSS
SKDQQSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQRILLGNEDEQEDDEQRHGQE QSHQDEGVIVRVS
30 KEQVQELRKYAQSSSRKGKPSKSGPFNLSNKPIYSNKFGNFYEITPNRNPQAQDLDISLT F
IEINEGALLPHYNSKAIFVVLVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEVEVRRYSARLSEG DIFVIP

AGHPISINASSNLRLGFGINADENQRNFLAGSEDNVIRQLTEVKGLTFPGSTEDVERLIKN
QQQSYFANAQPQQQQREREGRGGRRGHISILSTLY

De igual forma, proteína conglutina β 4 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de ARNm codificador; con número de acceso HQ670412 en GenBank, SEQ ID NO: 11 (**Figura 5 2).**

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β 5 aislada de semilla de altramuz azul; SEQ ID NO: 5, número de acceso F5B8W3 en Uniprot, es la siguiente:

MAKMRVRFPMLVLLGVVFLLAVSIGIAYGEKDVKNPERPEERQEEERDPRQPPRSRQQE
EQEREHRREKERDREPSRGRSESKQSQEERERRKEHDREREQEQQPQYGRHEEEEK
10 GEEEEEGQARRQRPQRRREEREQEQQSSSESRRQSGDERRHRHEKREQREEREQEQQ
SSSGRQSDYGRQRQRHEGREQREEREQEQQSSSESHLRNPFYFSSERFQTRYKNKNQGI
RVLERFDQRTNRLENLQNYRIVEFQSRPNTLILPKHSDADYILVVLNGRATITIVNPDKRQAY
NLEYGDALRLPAGTTSYILNPDDNQDLRVVKLAIPINNPGKFYDFYPSRTKDQQSYFSGFSK
NTLEATFNTHYEEIQRILLGYEDEQEDEEQRREQEQQSHQDEGVIVRVSKEQIQELRKHAQSS
15 SRKGKPSESGPFNLRNSEPIYSNKFGNFYEITPDRNPQVQDLDISLIFTEISEGALLPHYN SK
AIFVIVVDEGEGNYELVGIRNQQRQQDEQEVEEVRSYNARLSEGDIVIPAGHPLSINASSNL
RLLGFGINADENQRNFLAGSEDNVIRQLDREVKELIFPGSAEDVERLIRNQQSYFANAQPQ
QQQQQREKEGRGGRRGPSSILSALY

De igual forma, proteína conglutina β 5 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de ARNm codificador; con número de acceso HQ670413 en GenBank, SEQ ID NO: 12 (**Figura 2).**

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β 6 aislada de semilla de altramuz azul; SEQ ID NO: 6, número de acceso F5B8W4 en Uniprot, es la siguiente:

MIKMRVRFPTLVLLGIVFLMAVSIGIAYGEKNVIKNERPQEREQEERDPRQPRPHHQEE
25 QEREHRREEERDREPSRGRRESEESREEEREQRREPRREREQEQQPQHGRREEEEWQ
PRRQRPQSRREEREQEQQSSSSRRQSYAYERREQREEREQEQQGSRSDSRRQRNPYY
FSSERFQTLYRNQNGQIRVLERFDKRTDRLENLQNYRIVEFQSKPNTLILPKHSDADYILVVL
NGSATITIVNPDKRQSYNLENGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVVKLAIPINNPGNFYDFY
PSSSKDQQSYFSGFSRNTLEATFNTRYEEIQRILLGNEDEQEDDEQRHGQEQQSHQDEGVIV
30 RVSKEQVQELRKYAQSSSRKGKPSKSGPFNLRSNKPIYSNKFGNFYEITPNRNPQAQLDI
SLTFIEINEGALLPHYN SKAIFVVLVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEVR RYSARLSEGDI

FVIPAGHPISINASSNFRLLGFGINADENQRNFLAGFEDNVIRQLDREVKGTLFPGFAEDVER
LIKNNQQQSYFANAQPQQQREREGRHRRGHIFSILSTLY

De igual forma, proteína conglutina β 6 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de ARNm codificador; con número de acceso HQ670414 en GenBank, SEQ ID NO: 13 (**Figura 5 2**).

La secuencia aminoacídica de la proteína conglutina β 7 aislada de semilla de altramuz azul; SEQ ID NO: 7, con número de acceso F5B8W5 en Uniprot es la siguiente:

MARMRVRFPTLVLLGILFLMAVSIGIAYGEKDVKNHERPGEREHEERDPRQQPRPRKQEE
QEREHRREEEHDRDPSRGRRRESEERQEEERERRREPCREREQEQQPQHGRREEEEEEE
10 EWQPRRLRPQSKKEEREQEQQGSSSSRKQSGYERRQYHERREQRDEKEKEQDSRSDSR
RQRNPYHFSSERFQTRYRNNGQIRVLERFDQRTNRLLENLQNYRIVEFQSNPNTLILPKHS
DADYILVVNLNGRATITIVNPDKRQAYNLEYGDALRVPAGTTSYILNPDDNQNLRVVKLAIPINN
PSNFYDFYPSSTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIQRILLGNEDEQEDEEQRRGQEQS
YQDEGVIVRVSKEQIQELRKHAQSSSRKGKPSEGPFLRSNESIYSNKFGNFYEITPERNP
15 QVQDLDISLTFTINEGALLPHYNNSKAIFIVVDEGEGNYELVGIRDQQQQDEQEEEEEEV
RRYSARLSEGDFVIPAGYPISVNASSNLRLGFGINANENQRNFLAGSEDNVISQLDREVKE
LTFPGSAQDVERLIKNNQQQSYFANAQPQQKQQREKEGRRGRRLISSILSTLY

De igual forma, proteína conglutina β 7 puede identificarse por la secuencia nucleotídica de ARNm codificador; con número de acceso HQ670415 en GenBank, SEQ ID NO: 14 (**Figura 20 2**).

Las características estructurales de las proteínas conglutinas β resultan distintivas respecto a otras proteínas de la familia vicilina de especies de leguminosas, ya que incluyen dos dominios estructurales que caracterizan a la superfamilia de proteínas denominada cupina, que forman una estructura similar al pliegue estructural denominado “Rossmann” frecuente
25 en enzimas que utilizan oxígeno molecular como sustrato [8]. Todas las proteínas conglutinas β presentan dos zonas diferenciadas o dominios: un dominio globular y un brazo móvil. No se ha encontrado un brazo móvil similar en otras proteínas vicilinas de especies de leguminosas [9] por lo que las proteínas conglutinas β de altramuz azul son únicas en cuanto a su estructura, y de ahí su potencial e interés.

30 Las propiedades de las proteínas conglutinas β parecen deberse a este brazo móvil que presentan en el extremo N terminal, un dominio estructural rico en alfa hélices. El brazo móvil es la sección que presenta mayor variabilidad y sin el ninguna de las proteínas

conglutinas β es funcional. El análisis de modelos moleculares ha demostrado que las grandes diferencias estructurales entre las isoformas de conglutina β se encuentran principalmente en este brazo móvil N terminal; por lo tanto, las posibles diferencias funcionales entre las conglutinas β podrían deberse a estas diferencias estructurales [8].

5 La gran homología entre las 7 isoformas de proteínas conglutinas β aisladas de altramuz azul se puede observar en la **Figura 1**.

Las 7 proteínas presentan un % de identidad de secuencia entre un 77.4 y un 97.8% respecto a sus secuencias aminoacídicas, tal y como se puede comprobar en la **Figura 2**, y entre un 72.8% y 98.9 % de similitud en cuanto a sus secuencias nucleotídicas.

10 Particularmente, se ha probado que las conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$, y $\beta 6$ ejercen una variedad de efectos sobre las células a diferentes niveles [3, 4, 6]: reducen la expresión de ARNm de mediadores proinflamatorios, reducen la capacidad quimiotáctica de las células disminuyendo los niveles de quimiocinas y de factores de adhesión celular; regulan el metabolismo oxidativo celular y revierten la resistencia a la insulina [3, 4, 6]. Debido a estos 15 efectos, las proteínas conglutinas β de semilla de altramuz azul podrían utilizarse en la prevención y el tratamiento de enfermedades con base inflamatoria.

Las propiedades citotóxicas y anti-potenciales de las proteínas conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ han sido probadas en un modelo *in vitro* de CM induciendo una reducción de la viabilidad de las células CM, mayores tasas apoptóticas, reducción de la capacidad de auto-renovación, y del 20 número de CSCs a través de la regulación de la vía p53/SIRT1/FoxO-1, a la vez que se preservan las líneas celulares sanas [10].

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En la presente invención se describe el efecto radiosensibilizador de las proteínas conglutinas β de semilla de altramuz azul para su uso en combinación con radioterapia 25 ionizante (RI) en el tratamiento de CM. En concreto se prueba el efecto radiosensibilizador de las isoformas de proteínas conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$. Este efecto es presumiblemente extensible al resto de isoformas de proteínas conglutinas β debido al gran grado de homología estructural y molecular que presentan entre ellas, tal y como se ha descrito previamente.

30 Las isoformas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ de proteínas conglutinas β de altramuz azul (*Lupinus angustifolius* L.) se purificaron mediante cromatografía de afinidad, y se evaluó su potencial como radiosensibilizadores naturales para células *in vitro* de CM con curvas dosis-respuesta tras

el ensayo de formación de colonias. Se evaluó la fracción de supervivencia, la apoptosis, la respuesta al daño del ADN, la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), y la capacidad de crecimiento y de autorrenovación de las células, así como los mecanismos de acción subyacentes tras el tratamiento combinado con proteínas conglutinadas β y RT en 5 tres líneas celulares de CM en comparación con una línea celular sana.

Las proteínas conglutinas β_1 , β_3 y β_6 , mostraron un notable efecto radiosensibilizador sobre las tres líneas celulares de CM analizadas, dependiente del subtipo molecular, mostrando los mayores efectos sobre la línea celular de fenotipo triple negativo, MDA-MB-231. Las proteínas conglutinas β fueron efectivas a concentraciones extremadamente bajas (2,5-10 10 ng/uL) cuando se combinaron con las dosis estándar de radiación ionizante (4-6 Gy) utilizadas en RT hipofraccionada, lo que pone de relieve su potencial como sensibilizador natural en combinación con RT.

Las células MCF-10A (células epiteliales sanas utilizadas a modo de control) con el pretratamiento con conglutinas β mostraron resistencia a la RI sin cambios significativos con 15 todas las dosis probadas, por lo que la resistencia de las células sanas se preserva. Por tanto, las proteínas conglutinas β purificadas tienen la capacidad de actuar selectivamente contra de las CSCs preservando la viabilidad de las células sanas, lo que resulta crucial para un tratamiento eficaz contra el cáncer.

El mecanismo de acción de las proteínas conglutinas β parece implicar la modulación de 20 genes tumorigénicos relacionados con el crecimiento celular, como SIRT1 y FoxO1, en función del estado de p53 y la dosis de RI.

Estas proteínas con valor nutracéutico mejoran la eficacia de la RT minimizando al mismo tiempo el daño a las células sanas, por lo que constituyen una estrategia de pretratamiento del tratamiento con RT para los pacientes con CM, reduciendo el riesgo de recurrencia.

25 Por lo tanto, **un primer aspecto** de la invención se refiere a la proteína conglutina β aislada de semillas de *Lupinus angustifolius* L., en adelante “proteína de la invención”, para su uso como radiosensibilizador en radioterapia.

Preferiblemente la proteína de la invención presenta una identidad de al menos un 95% o de 30 al menos un 99% o de un 100% con cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 7 y posee la actividad y las características estructurales de las respectivas proteínas conglutina β_1 a β_7 .

Más preferiblemente la proteína de la invención presenta una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con la SEQ ID NO 1 y posee la actividad y las características estructurales de la proteína conglutina β 1, o una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con SEQ ID NO 3 y posee la actividad y las 5 características estructurales de la proteína conglutina β 3, o una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con SEQ ID NO 6 y posee la actividad y las características estructurales de la proteína conglutina β 6.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una composición que comprende al menos una proteína de la invención para su uso como radiosensibilizador en radioterapia, 10 en adelante “composición de la invención”.

Preferiblemente la composición comprende al menos una proteína que presenta una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con cualquiera de las secuencias aminoacídicas SEQ ID NO 1 a SEQ ID NO 7 y posee la actividad y las características estructurales de las respectivas proteínas conglutina β 1 a β 7. Más 15 preferiblemente, comprende al menos una proteína que presenta una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 6 y que posee la actividad y las características estructurales de las proteínas conglutinas β 1, β 3, β 6 respectivamente. Más preferiblemente comprende al menos una proteína de secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO:6.

20 En una realización preferida de la composición de la invención, se trata de una composición farmacéutica, y más preferiblemente, además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

Un **tercer aspecto** de la invención describe la proteína o la composición de la invención para su uso como radiosensibilizador en un método que utiliza radioterapia para el 25 tratamiento del cáncer. El cáncer podría ser cualquier tipo de cáncer que sea susceptible al beneficio clínico de un tratamiento con radioterapia. Preferiblemente el tipo de cáncer se selecciona de la lista que comprende cáncer de colon, cáncer de páncreas, hepatocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y cáncer de mama. Más preferiblemente el cáncer es cáncer de mama y aún más 30 preferiblemente, el cáncer de mama es del tipo triple negativo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se

desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Figura 1.** Estructuras 3D de las conglutinas $\beta 1$ a $\beta 7$: se representan α -hélices (rojo), β -hojas (amarillo) y espirales (verde) integrando los principales dominios de las proteínas.

Figura 2. Tabla con los alineamientos de las secuencias nucleotídicas de las conglutinas $\beta 1$ a $\beta 7$ (SEQ ID NO 8 A SEQ ID NO 14).

Figura 3. Curvas dosis-respuesta (fracción de supervivencia) para las cuatro líneas celulares. (a) MCF10-A, (b) MCF-7, (c) SKBR-3 y (d) MDA-MB-231 con un tratamiento durante 24h con concentraciones seleccionadas de proteínas conglutinas $\beta 1$; $\beta 3$ y $\beta 6$ y una dosis de radiación añadida combinada: 0, 1, 2, 4, 6 y 8 Gy. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas.

Figura 4: Células apoptóticas en un modelo de CM avanzado *in vitro* tras 24 horas de pretratamiento con proteínas conglutinas $\beta 1$ (2,5 ng/ μ l), $\beta 3$ (5 ng/ μ l) o $\beta 6$ (10 ng/ μ l) y posterior tratamiento RI a 4 y 6 Gy en (a) MCF-7, (b) SK-BR-3 y (c) MDA-MB-231. Las células se tripsinizaron 1 h después de la RI y se incubaron durante 15 min con annexinV-FITC y yoduro de propidio-PI. El porcentaje de apoptosis se calculó con células apoptóticas tempranas y tardías. Las muestras se analizaron con el citómetro de flujo BD FACS aria IIIu. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas, y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ y ### $p < 0,001$ frente a otros tratamientos.

Figura 5: Análisis Western Blot de caspasa 3 total. Se utilizó β -actina como control. Las células se trataron con proteínas conglutinas $\beta 1$ (2,5 ng/ μ l), $\beta 3$ (5 ng/ μ l) o $\beta 6$ (10 ng/ μ l) durante 24 h en MCF-7, SK- BR-3 y MDA-MB-321 y después se irradiaron a 4 Gy. La proteína se recogió 24 h después de la RI.

Figura 6: Análisis Western Blot de la caspasa 3 total. Se utilizó β -actina como control. Las células se trataron con proteínas conglutinas $\beta 1$ (2,5 ng/ μ l), $\beta 3$ (5 ng/ μ l) o $\beta 6$ (10 ng/ μ l) durante 24h en MCF-7, SK-BR- 3 y MDA-MB-321 y después se irradiaron a 6 Gy. La proteína se recogió 24h después de la RI.

30 **Figura 7:** Niveles de ROS tras el tratamiento con proteínas conglutinas $\beta 1$ (2,5 ng/ μ l), $\beta 3$ (5 ng/ μ l) o $\beta 6$ (10 ng/ μ l) durante 24h y un RI posterior a 4 y 6 Gy en (a) MCF-7, (b) SK-BR-3, y

(c) MDA-MB-321. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas, y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ frente a otros tratamientos.

Figura 8: γ H2Ax fosforilada (%) o tasa de reparación del ADN tras el tratamiento con proteínas conglutinas β 1 (2,5 ng/ μ l), β 3 (5 ng/ μ l) o β 6 (10 ng/ μ l) durante 24h y un RI posterior a 4 y 6 Gy en (a) MCF-7, (b) SK-BR-3 y (c) MDA-MB-321. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas, y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ frente a otros tratamientos.

Figura 9: Análisis Western Blot de SIRT1, FoxO1, LC3B y p62. Se utilizó β -actina como control. Las células fueron tratadas con proteínas conglutinas β 1 (2,5 ng/ μ l), β 3 (5 ng/ μ l) o β 6 (10 ng/ μ l) durante 24h en MCF10-A, MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-321 e irradiadas a 4 Gy.

Figura 10: Análisis Western Blot de SIRT1, FoxO1, LC3B y p62. Se utilizó β -actina como control. Las células fueron tratadas con proteínas conglutinas β 1 (2,5 ng/ μ l), β 3 (5 ng/ μ l) o β 6 (10 ng/ μ l) durante 24h en MCF10-A, MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-321 e irradiadas a 6 Gy.

Figura 11. Actividad de ALDH1 tras un pretratamiento de 24 h con proteínas conglutinas β 1 (2,5 ng/ μ l), β 3 (5 ng/ μ l) o β 6 (10 ng/ μ l) y un tratamiento RI posterior a 4 y 6 Gy en (a) MCF-7, (b) SK- BR-3, y (c) MDA-MB-321. Las células ALDH1+ viables se cuantificaron por citometría de flujo 1h después del tratamiento RI en un citómetro de flujo BD FACS aria Illu * 20 $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas y ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ frente a otros tratamientos.

Figura 12. Expresión de CD44 /CD24highlow con un pretratamiento durante 24h con proteínas conglutinas β 1 (2,5 ng/ μ l), β 3 (5 ng/ μ l) o β 6 (10 ng/ μ l) y un tratamiento RI posterior a 4 Gy y 6 Gy en (a) MCF-7, (b) SK-BR-3, y (c) MDA-MB-321. Las muestras se 25 analizaron por citometría de flujo 1h después de la RI en un citómetro de flujo BD FACS aria Illu ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas y # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ frente a otros tratamientos.

Figura 13. Cuantificación de mamoesferas tras un pretratamiento de 24 h con proteínas conglutinas β 1 (2,5 ng/ μ l), β 3 (5 ng/ μ l) o β 6 (10 ng/ μ l) y posterior tratamiento RI a 4 y 6 Gy. 30 El tratamiento RI se realizó 24h antes de sembrar mamoesferas de (a) MCF-7, (b) SK-BR-3, y (c) MDAMB- 231 y las esferas se caracterizaron en (e). Las esferas $> 50 \mu\text{m}$ se contaron y

capturaron utilizando el microscopio binocular con un aumento de 10x. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ frente a células no tratadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

5 Sobreexpresión y purificación de isoformas de conglutina β

Para obtener las proteínas conglutinas β de altramuz, concretamente las isoformas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$, se llevó a cabo el mismo protocolo utilizado en [10] que incluye una sobreexpresión y purificación de estas proteínas basada en un protocolo previo [11] con modificaciones siguiendo los siguientes pasos:

- 10 - Construcción de plásmidos de expresión para cada una de las isoformas de conglutina $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 6$ utilizando un vector pET28b(+) (Novagen) con una polihistidina N-terminal (6xHis) y un vector intermedio pUC57 que contiene un gen sintético que codifica para cada proteína conglutina.
 - Sobreexpresión de estas isoformas de proteínas conglutinas β utilizando diferentes métodos de inducción de la expresión (químicos y físicos) en bacterias (*Escherichia coli*).
 - Purificación de las isoformas de proteínas conglutinas β mediante combinación de técnicas bioquímicas como sonicación de células bacterianas, centrifugación diferencial, cromatografía de afinidad en tandem con proteínas unidas a un His-tag, etapas de diálsis, siguiendo el protocolo de Jiménez-López *et al.* 2016 [11] con modificaciones.
- 20 - Identificación de las proteínas β -conglutina obtenidas previamente mediante métodos como SDS-PAGE e inmunoblotting utilizando un anticuerpo anti-conglutina β altamente específico (Agrisera, Suecia) [4, 6, 11].

Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas se obtuvieron de ATCC, en concreto, tres líneas tumorales de CM: MCF-7 (ER α positiva, débil para HER2), SK-BR-3 (ER α negativa, HER2 positiva) y MDA-MB-231 (ER α negativa, negativa para HER2, triple negativa), y la línea celular epitelial no tumorigénica MCF-10A.

Las tres líneas celulares tumorales de CM se cultivaron en medio Gibco Dulbecco's modificado Eagle (DMEM) con alto contenido en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.)

suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), un 1% de penicilina-estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B y 2mM de L-glutamina. Las células MCF-10A se cultivaron en medio DMEM/F-12 (Mezcla de nutrientes) (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.), suplementado con un 10% de FBS, un 1% de penicilina-estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B, 2mM 5 de L-glutamina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 10 µg/ml de insulina. Todos los reactivos utilizados para complementar el medio de cultivo procedían de Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU. Todas las líneas celulares se cultivaron en una atmósfera de humedad relativa y en condiciones estándar de temperatura (37°C) y CO₂ (5%) y se cultivaron en monocapa hasta que tuvieron la confluencia y cantidad óptimas 10 para poder ser utilizadas en los diferentes experimentos. El tratamiento de las líneas celulares se realizó utilizando concentraciones de conglutinas β 1, 3 y 6, diluidas con medio de cultivo, de 10 ng/µl a 2,5 ng/µl durante 24h.

Irradiación celular

Las líneas celulares tumorales de CM se sembraron en placas de 6 pocillos en ausencia o 15 presencia de las proteínas conglutinas β. Transcurridas 24 horas, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio fresco. A continuación, se irradiaron las células utilizando un equipo de rayos X (Yxlon Smart Maxishoot 200-E, Copenhague, Dinamarca) a temperatura ambiente (TA), bajo una corriente constante de 4,5 mA y 200kV de potencia, realizando un rango de dosis de radiación de 0 Gy (control) a 8Gy (0, 1, 2, 4, 6, y 8 Gy, respectivamente) 20 utilizando el tamaño de campo de 15 cm x 8 cm con una distancia focal de 15 cm. La dosimetría trazable se realizó siguiendo el protocolo de calibración, *Technical Report Series* (TRS) 398 de la Organización Internacional de Energía Atómica (IAEA).

Ejemplo 1: Efecto *in vitro* de las conglutinas β en combinación con RI.

Para estudiar el efecto radiosensibilizante del tratamiento con proteínas conglutinas β y sus 25 mecanismos de acción se utilizó un modelo de CM *in vitro* en el que se realizaron tratamientos con proteínas conglutinas β individuales en combinación con diferentes dosis de radiación. Se realizó un ensayo de formación de colonias y se obtuvieron las curvas dosis-respuesta para cada línea celular y condición experimental, lo que permitió estimar la supervivencia celular en cada caso.

30 Ensayo de formación de colonias

La irradiación se llevó a cabo siguiendo el protocolo anterior de irradiación celular, con y sin pretratamiento con proteínas conglutinas β durante 24 horas. Las concentraciones de

proteínas conglutinas β utilizadas fueron de 2,5 ng/ul para $\beta 1$, 5 ng/ul para $\beta 3$ y 10 ng/ul para $\beta 6$. Dichas dosis se eligieron para garantizar que la viabilidad de las células epiteliales sanas MCF10-A fuera de al menos el 85% tras los tratamientos, y que el efecto sobre el resto de células CM fuera lo suficientemente significativo [10].

- 5 Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con concentraciones celulares seriadas, de 500 a 4000 células para MCF-7, de 1500 a 12000 células para SK-BR-3 y de 1000 a 8000 células para MDA-MB-231, para las que se estableció a su vez un control no irradiado y dosis de irradiación de 2, 4, 6 y 8 Gy. Tras el protocolo de irradiación, las células se mantuvieron en la incubadora durante al menos dos semanas, en función del crecimiento 10 para cada línea celular.

A continuación, se retiró el medio de cultivo y se tiñó cada pocillo añadiendo colorante violeta de genciana (ICN Biomedicals, 101775) durante 2-3 minutos. Los pocillos se lavaron con agua y las placas se dejaron secar toda la noche. El número de colonias se contó utilizando el microscopio óptico modelo Olympus 1X51, conectado a un Olympus TH4- 200 15 de potencia. Una colonia se definió como una agrupación de células con al menos 50 células y sin signos de colonia abortiva (colonía no homogénea, que presenta agujeros en el centro de la colonia o cualquier signo visual de muerte celular). Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada condición. La fracción de supervivencia (FS) celular se calculó de la siguiente manera:

- 20 FS = Número de colonias contadas / (Número de células sembradas para esta condición X
eficacia de clonación)

Los datos de supervivencia obtenidos se ajustaron a un modelo lineal-cuadrático y este modelo proporcionó los valores de la fracción de supervivencia y los parámetros α y β de la curva de supervivencia celular como indicadores de la radiosensibilidad intrínseca. La 25 ecuación matemática del modelo lineal cuadrático (L-Q) es la siguiente:

$$FS = \exp [-(\alpha D + \beta D^2)]$$

A la hora de valorar los resultados obtenidos en el presente ensayo debe considerarse que el tratamiento simple con proteínas conglutinas β , en concreto con $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$, presenta por sí mismo un efecto negativo en la viabilidad de las células de CM [10]. Dicho efecto no se 30 mide ni interfiere de forma alguna en los resultados de los presentes ensayos, ya que se toma como punto de partida para establecer el 100% de supervivencia el valor medido al final del pretratamiento con proteínas conglutinas β y previo a iniciar el tratamiento con

radiación. De esta forma, se toma como punto de partida un control donde el efecto simple de las proteínas conglutinas β ya ha sido restado. Por tanto, los datos de supervivencia de este ensayo miden únicamente el efecto de la radiación sobre las células de CM, valorando a su vez si ese efecto se ve condicionado (potenciado o no) en función del tipo de pretratamiento con proteínas conglutinas β aplicado o su ausencia. Para los siguientes ejemplos de realización que se presentan en esta memoria, el diseño de los ensayos sigue esta misma lógica, de forma que no se tiene en cuenta el efecto que haya podido tener el pre-tratamiento con proteínas conglutinas β sobre las células de CM, sino si éste condiciona en alguna medida la efectividad del tratamiento posterior con RT.

- 10 Los resultados de la dosimetría trazable mostraron cambios no significativos con respecto a la resistencia del tratamiento RI convencional en las células sanas no tumorigénicas MCF-10A (**Figura 3a**), con lo que podemos concluir que el pretratamiento con conglutinas β no afecta negativamente a la supervivencia de células no tumorales en tratamiento con RT, lo que corrobora que las proteínas conglutinas β son inocuas para líneas celulares no 15 tumorales a las concentraciones estudiadas [10].

Por su parte, el efecto radiosensibilizador de las proteínas conglutinas β en las líneas celulares tumorales parece ser diferente según la isoforma conglutina β y el tipo de línea celular tumoral. En células MCF-7 $\beta 1$ disminuye significativamente la fracción de supervivencia para dosis > 4 Gy (**Figura 3b**). Respecto a las células SK-BR-3, $\beta 1$ redujo 20 significativamente ($p<0,05$) la fracción de supervivencia a 4 Gy, y $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ la redujeron a 6 y 8 Gy (**Figura 3c**). En la línea celular MDA-MB-231, el efecto radiosensibilizante fue el mayor, con una reducción significativa de la fracción de supervivencia a partir de 2 Gy en los experimentos incluyendo conglutina $\beta 1$, así como una reducción significativa de la fracción de supervivencia combinando $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ con dosis mayores de radiación, de 4 a 8 Gy. En 25 este caso, para las células MDA-MB-231, también es importante mencionar que se detecta la misma fracción de supervivencia para la terapia combinada ($\beta 1+2$ Gy) que la encontrada para el tratamiento de irradiación simple a 4Gy (**Figura 3d**).

En base a estos datos podemos concluir que las conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$ potencian el efecto de la RI *in vitro* en líneas celulares tumorales de CM, especialmente $\beta 1$ sobre la línea 30 tumoral que corresponde a CM triple negativo, la forma más agresiva de CM.

Ejemplo 2: Efecto *in vitro* de las conglutinas β en combinación con RI sobre la apoptosis independiente de la caspasa.

Se estudió el efecto citotóxico de la terapia combinada de conglutinas β y RI en las tres líneas tumorales evaluando los niveles de apoptosis a 4 Gy y 6 Gy, dosis en las que se obtuvo el efecto radiosensibilizador en las tres líneas celulares de CM en el ejemplo 1, ya que a 2 Gy, sólo se encontró una radiosensibilización potencial de las células MDA-MB-231.

- 5 En esas mismas condiciones experimentales (terapia combinada de conglutinas β y RI en las tres líneas tumorales a 4 Gy y 6 Gy, a las concentraciones de conglutina β elegidas en el Ejemplo 1) se estudiaron mediante la técnica de Western Blot los niveles de proteína de la caspasa 3 total, una caspasa ejecutora. Se sabe que la RI activa la cascada de caspasas, lo que provoca la apoptosis de las células de CM en condiciones normales. Esta activación de 10 caspasas también ha demostrado estimular la repoblación de células tumorales, lo que reduce la eficacia de los tratamientos con RI a largo plazo [12]. Así pues, la apoptosis independiente de caspasas inducida por las conglutinas β podría revertir esos efectos no deseados.

Ensayo de apoptosis

- 15 La apoptosis se analizó utilizando el kit IP-Anexina V (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Se sembraron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos para cada línea celular y se trataron con conglutininas β durante 24 horas, en combinación con el protocolo de irradiación, como se ha descrito previamente.

A continuación, se tripsinizaron, se lavaron y se incubaron con AnnexinV-FITC y yoduro de 20 propidio durante 15 minutos en la oscuridad. Las muestras se analizaron inmediatamente utilizando el citómetro de flujo BD FACS Aria IIIu (Becton Dickinson, BD Bioscience). AnnexinV-FITC se detectó mediante un láser azul (488 nm) FSC, con un filtro 502 LP (Long Pass) y un filtro 530/30. El yoduro de propidio-PI se detectó mediante láser 561 YGL (561 nm), con un LP 600 y un filtro 610/20. La apoptosis se calculó sumando las células 25 apoptóticas (población AnnexinV positiva/Propidium iodide negativa) y las células apoptóticas tardías (población AnnexinV positiva/Propidium iodide positiva).

En la **figura 4** se observa como la apoptosis aumentó significativamente en las tres líneas celulares, dependiendo del tratamiento con conglutina β y de la dosis de RI. En MCF-7 la conglutina β induce una mayor tasa de apoptosis en comparación con RI a 4 Gy (**Figura 30 4a**) y no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) a 6 Gy, donde todas las condiciones mostraron tasas apoptóticas extremadamente altas (>50%).

En las células SK-BR-3 se encontraron diferencias, aunque no estadísticamente significativas, para β 3 a 4 Gy (**Figura 4b**), en concordancia con lo mostrado en la **Figura 3**, mientras que β 1 indujo un pico de apoptosis significativo en comparación con el control a 6 Gy.

5 Finalmente, en células MDA-MB-231(**Figura 4c**) β 1 y β 3 indujeron 4 veces más apoptosis en combinación con una dosis de 4 Gy en comparación con las células control. β 1 mostró un aumento significativo del porcentaje de apoptosis a 6 Gy en comparación con el control irradiado.

Para dilucidar si el aumento de la apoptosis está mediado por la activación de las caspasas, 10 se analizaron los niveles de proteína de la caspasa 3 total mediante la técnica de inmunotransferencia, a una dosis de RI de 4 Gy (**Figura 5**) y 6 Gy (**Figura 6**) y utilizando β -actina como control.

Los resultados mostraron que ninguna de las tres isoformas de conglutina β indujo una activación significativa de la caspasa 3 en ninguna de las líneas celulares ensayadas a 4 Gy 15 (**Figura 5**). De hecho, las proteínas conglutinas β parecen reducir los niveles de caspasa 3 y la inducción de apoptosis por β 3 (línea celular MCF-7), y β 1 y β 3 (línea celular MDA-MB-231), lo que significa que ambas son independientes de la caspasa. Cuando la dosis de RI se incrementó a 6 Gy, β 3 y β 6 produjeron un aumento de los niveles de proteína caspasa 3 en todas las líneas celulares (**Figura 6**). Este aumento no fue acompañado de un 20 incremento en la tasa de apoptosis (**Figura 4a, 4b y 4c**). Los mayores niveles de apoptosis a 6 Gy inducidos por β 1 (líneas celulares SK-BR-3 y MDA-MB-231) son también independientes de la caspasa, ya que β 1 no mostró ningún efecto de aumento de los niveles de proteína caspasa 3.

Estas tasas apoptóticas más elevadas no se acompañaron de una activación de la caspasa 25 3, por lo que las conglutinas β inducen una apoptosis independiente de la caspasa, no sólo en tratamiento simple [10], sino también en combinación con RI. La inhibición de la caspasa 3 no compromete el potencial terapéutico de la RT y su efecto citotóxico [13]. Debe considerarse que en los tumores son comunes los defectos en las vías de señalización que conducen a la activación de las caspasas, por lo que muchas células tumorales pueden 30 sobrevivir inesperadamente a la activación de las caspasas, por lo que los mecanismos de muerte celular independientes de las caspasas resultan de gran interés para el tratamiento del cáncer [14].

Ejemplo 3: Efecto *in vitro* de las conglutinas β en combinación con RI en las líneas celulares de CM.

Para dilucidar los efectos sobre las líneas celulares de CM tras el tratamiento combinado con conglutinas β y RI, se midieron los niveles de ROS intracelulares y de daño en el ADN 5 siguiendo las metodologías descritas previamente.

La modulación de las ROS en las células cancerosas puede representar una posible estrategia para superar la farmacorresistencia o la radiorresistencia [15]. Se sabe que la RI eleva los niveles intracelulares de las ROS, que tienen un doble papel: pueden desencadenar la muerte celular de forma dependiente de p53 y, a su vez, el aumento de los 10 niveles de las ROS también está relacionado con la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y la transformación carcinogénica, siendo un potencial factor iniciador de la transformación maligna [16].

Cuantificación de las ROS

Los niveles de las ROS se monitorizaron sembrando 3×10^3 células/pocillo en una placa de 15 96 pocillos y realizando el tratamiento con proteínas conglutinas β durante 24 horas en combinación con el protocolo de radiación que se ha descrito previamente (líneas celulares de CM con conglutinas β durante 24 horas seguido de RI durante 1h utilizando 4 y 6 Gy). A continuación, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 100 µl de 10 µM de diacetato de 2'7'-dclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-20 Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en medio libre de suero durante 30 min en una incubadora, con el fin de garantizar las condiciones de cultivo celular. Por último, se midió la fluorescencia en un lector multimodal tríada utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm. Se entiende que los resultados de fluorescencia en unidades de fluorescencia relativa (RFU) son comparables a los niveles 25 intracelulares de las ROS en las líneas celulares, asumiendo mayores niveles para mayor fluorescencia [10, 17].

El tratamiento combinado con conglutinas β y RI, indujo un nivel general más bajo de las ROS en las líneas celulares de CM en comparación con las células únicamente irradiadas. Se observó una desregulación de los niveles de ROS en función de la isoforma de 30 conglutina β y del tipo de línea celular.

En la línea celular MCF-7, la proteína conglutina β1 indujo un pico de niveles de las ROS a 4 Gy, mientras que se observó una inhibición significativa de los mismos a la misma dosis

para el tratamiento con β 3. La terapia combinada con β 6 a 6 Gy de tratamiento RI disminuyó los niveles de las ROS. No se obtuvo ningún efecto significativo cuando el tratamiento se desarrolló a 6 Gy con las isoformas de conglutina β 1 o β 3 (**Figura 7a**).

En las líneas celulares SK-BR-3 la combinación del tratamiento β 3 y 4 Gy exhibió un 5 aumento de los niveles de las ROS, mientras que β 1 y β 3 en combinación con 6 Gy redujeron los niveles de las ROS (**Figura 7b**).

En la línea celular MDAMB- 231 no se encontraron cambios significativos en los niveles de las ROS a 4 Gy, mientras que se encontró una inhibición significativa cuando las células fueron tratadas a la dosis RI de 6 Gy con todas las conglutinas β 1, y β 3 y β 6 ($p < 0,05$) 10 (**Figura 7c**).

Los resultados mostraron que los niveles de las ROS dependen del tratamiento y de la dosis de RI, presentando niveles más bajos de ROS en las mismas condiciones en las que se indujo una mayor apoptosis con el tratamiento combinado. En algunos casos, las conglutinas β combinadas con tratamiento RI inducen picos de niveles de las ROS. Dado 15 que el papel de las ROS es dual, esos picos podrían corresponder a una acumulación de las ROS que conduce a un cambio de sus funciones carcinogénicas a efectos antitumorales a través de la inducción de la muerte celular como la necrosis o la ferroptosis [16]. El aumento de los niveles de ROS en esos casos específicos mostró un efecto radiosensibilizador significativo en relación con el ensayo de formación de colonias, por lo que las ROS podrían 20 potenciar otras muertes celulares independientes de la caspasa en esos casos para obtener tasas de supervivencia más bajas sin una tasa de aumento apoptótico.

El principal mecanismo de destrucción celular inducido por la radiación es el daño del ADN, por lo que los mecanismos de Respuesta al Daño del ADN (DDR) son cruciales para la radiorrespuesta [18]. La sensibilidad de las células cancerosas a la radiación depende en 25 gran medida de su capacidad para reconocer y responder a las roturas de doble cadena DSBs que produce la RI. Algunas células cancerosas, normalmente CSCs, promueven la radioresistencia y la supervivencia mediante la activación de la DDR y la reparación del ADN tras la exposición a RI [19].

En este contexto, se evaluó el daño en el ADN tras el tratamiento combinado de RI con 30 conglutinas β , midiendo la γ H2Ax fosforilada por citometría de flujo. Los resultados de la cuantificación de γ H2Ax pueden dar información sobre el daño causado por RI en el ADN y la modificación de la tasa de reparación en función del pretratamiento. Se ha demostrado que la reparación eficiente de los DSBs requiere un DDR coordinado que incluye la

fosforilación de la histona H2Ax, formando γH2Ax [20], por lo que su cuantificación no sólo muestra información sobre el número de DSBs sino también sobre la eficiencia de la reparación tras el tratamiento.

Daño en el ADN

5 El daño en el ADN de las diferentes líneas celulares de CM se cuantificó utilizando el kit de detección de γH2Ax BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, Cat. 554714) y el anticuerpo PE-
CF594 Mouse anti-H2Ax (pS139) (BD Biosciences, Cat. 564719). En este caso, se
sembraron 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y, a continuación, se trataron con
las proteínas conglutinas β durante 24 horas en combinación con el protocolo de irradiación,
10 tal como se describe para el resto de experimentos. Tras los tratamientos, las células se
tripsinizaron, se lavaron dos veces, se fijaron y se permeabilizaron utilizando el tampón de
fijación y permeabilización durante 30 minutos a TA. Por último, las células se incubaron con
100 µL del tampón BD Perm/Wash 1X durante 15 minutos a TA y con el anticuerpo anti-
H2Ax durante 30 min en la oscuridad a TA. Las muestras se analizaron inmediatamente por
15 citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo BD FACS Aria Illu (Becton Dickinson, BD
Bioscience). Para la detección de la población γH2Ax, el fluorocromo rojo PETexas se utilizó
un láser verde amarillo 561 (561 nm), con un filtro 600 LP y 610/20.

El pretratamiento con conglutinas β antes de la exposición a RI redujo drásticamente la
población de γH2Ax fosforilada en comparación con el control sin tratamiento RI, lo que
20 promovió una reducción significativa de la tasa de reparación del ADN después de RI.
(Figura 8). En general, la desregulación de los niveles de ROS estuvo acompañada por una
reducción de γH2Ax fosforilada y una inhibición de la tasa de reparación.

El tratamiento de la línea celular MCF-7 con las tres isoformas de conglutina β indujo un
efecto reductor significativo en los niveles de γH2Ax fosforilada en comparación con las
25 células control irradiadas a 4 Gy, mientras que β3 indujo un efecto reductor significativo en
los niveles de γH2Ax cuando las células se trataron con una dosis RI superior de 6 Gy
(Figura 8a).

En la línea celular SKBR- 3 no se encontraron cambios significativos para 4 Gy, pero los
tratamientos con todas las isoformas de la proteína conglutina β indujeron menores tasas de
30 reparación bajo 6 Gy ($p < 0,05$) en esta línea celular **(Figura 8b)**.

Por último, en la línea celular MDA-MB-231 β 1 y β 3 indujeron una disminución significativa de γ H2Ax a 4 Gy, mientras que sólo β 1 combinada con una RI de 6 Gy indujo niveles disminuidos de γ H2Ax (**Figura 8c**).

Estos resultados apoyan el papel de las proteínas conglutinas β de semilla de altramuz azul 5 como inhibidores de la tasa de reparación natural, reduciendo la población γ H2Ax fosforilada tras la exposición a RI e impidiendo que los mecanismos de reparación del ADN de la célula superen el efecto de RI, controlando el rebrote tumoral tras el tratamiento con conglutinas β .

La combinación de propiedades citotóxicas, apoptosis y muerte independiente de caspasas, la modulación de las ROS e inhibición de la reparación del ADN confieren a las proteínas 10 antioxidantes conglutinas β su papel radiosensibilizador.

Ejemplo 4: Implicación de la vía SIRT1/FoxO1 y la autofagia en la radiosensibilización de células CM bajo tratamientos combinados de conglutinas β y RI.

Con el fin de dilucidar el posible mecanismo de acción de las conglutinas β como radiosensibilizador en combinación con RI, se analizaron los cambios en las expresiones de 15 SIRT1 y FoxO1, así como de marcadores de autofagia, tanto a 4 Gy como a 6 Gy.

El eje regulador SIRT1/FoxO1 es una vía sensible a las ROS implicada en la progresión y agresión del CM [21–24]. Tanto su estimulación como su inhibición es un mecanismo de gran interés en la terapia del CM, ya que esta vía muestra una regulación dual dependiendo de p53 y del fenotipo de la línea celular tumoral.

20 La autofagia es uno de los procesos regulados por la vía SIRT1/FoxO1, que está estrechamente relacionada con la resistencia a la RI. Para evaluar la autofagia se estudiaron tras el tratamiento las proteínas LC3B y p62, dos marcadores de autofagia. El papel de la autofagia con respecto a la RT podría ser dual, por un lado, la inhibición de los genes implicados en la autofagia resulta en la radiosensibilización tumoral *in vitro* [25]; pero por 25 otro lado, induce la radiorrespuesta *in vivo* [26] ya que la autofagia podría proporcionar una oportunidad para que las células cancerosas sobrevivan en respuesta a la radioterapia [27]. Evidencias recientes sugieren que la muerte celular por irradiación podría estar implicada en la autofagia [28, 29] y otros estudios sugieren que la autofagia podría ser una alternativa de muerte celular inducida por radiación en el cáncer, para aquellas células que presentan 30 defectos en la vía de la apoptosis [30]. También se ha demostrado que p53 está implicado en la muerte celular autofágica en CM inducida por radiación [31]. Finalmente, un estudio reciente demostró que la inhibición de la autofagia sensibiliza las células de CM a la

radiación [32]. Todas estas investigaciones recientes ofrecen diferentes posibilidades sobre el papel de la autofagia en la radiorrespuesta en CM.

Obtención de proteínas totales y Western Blot de cultivos celulares en diferentes condiciones experimentales

5 Células trisninizadas se lavaron dos veces con PBS helado (después de los tratamientos) y se incubaron con tampón de lisis RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EE.UU.). Las proteínas se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford, se desnaturizaron y posteriormente se separaron en geles de SDS-poliacrilamida. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF
10 utilizando el sistema de transferencia Bio-Rad Trans Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.).

A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios apropiados contra SIRT1, FoxO1, caspasa 3, LC3B, p62 y actina β (Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante toda la noche y, posteriormente, con los anticuerpos secundarios apropiados (Santa
15 Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, TX, EE.UU.) durante 1h. Por último, las proteínas se detectaron utilizando el reactivo de detección Western Blot Amersham ECL select (GE Healthcare, Reino Unido) en la membrana y adquiriendo las imágenes con el sistema de captura de imágenes ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). Las imágenes de Western Blot se analizaron y cuantificaron utilizando el software Fiji. Se realizó una
20 densitometría para cada membrana y se calcularon el área y la intensidad media de cada condición. Por último, se calculó la proporción entre el control actina β y la proteína de interés y se comparó con la proporción del control no tratado en cada caso [10, 17].

Tras la RI a 4 Gy, las isoformas de proteínas conglutinas β inducen una disminución de la expresión de SIRT1 en las tres líneas celulares estudiadas (MCF-7, SK-BR-2 y MDA-MB-
25 231). También se observó una disminución paralela en la expresión de la proteína FoxO1 en las líneas celulares MCF-7 y SK-BR-3, mientras que la expresión de la proteína aumentó en el caso de las células MDA-MB-231 (**Figura 9**).

Por el contrario, cuando la RI fue de 6 Gy, las conglutinas $\beta 3$ y $\beta 6$ indujeron un aumento de la expresión de SIRT1 en la línea celular MCF-7, y la $\beta 1$ también aumentó la SIRT1 en las
30 células MDA- MB-231. El resto de tratamientos siguen induciendo menores niveles de expresión de SIRT1. Estos cambios en la expresión de SIRT1 a 6 Gy van acompañados de cambios similares en la expresión de FoxO1 (**Figura 10**).

Los resultados sugieren un doble efecto de SIRT1 en la radiosensibilidad en el CM y el importante papel de su actividad a través de FoxO1.

Trabajos recientes demostraron que dirigirse a SIRT1 podría ser una terapia prometedora para la radiosensibilidad a la RI, ya que su gen en estado “*knockdown*” suprimía la tumorigénesis y mejoraba la radiosensibilidad en líneas celulares de CM [33]. De forma controvertida, varios informes han demostrado que la regulación al alza de SIRT1 podría causar radiosensibilidad en células de CM y reducir la población de CSCs, con un papel importante de IL-6, interleucina que está regulada por conglutinas β [34]. Por otra parte, su potencial efecto como radiosensibilizador se ha demostrado en líneas celulares CM a pesar de su efecto sobre la activación de SIRT1 [35].

Así pues, se concluye que efecto final del tratamiento con conglutinas β como radiosensibilizador está fuertemente ligado a una regulación a la baja de la vía SIRT1/FoxO1, al estado de p53, a las características fenotípicas de la línea celular, a la dosis de radiación y a la radiosensibilidad de cada línea celular utilizada [36].

En cuanto al papel de la autofagia, las **figuras 9 y 10** muestran los resultados a 4 Gy y 6 Gy respectivamente de los niveles de LC3B y p62, marcadores de autofagia, tras el tratamiento con proteínas conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$.

En la línea celular MDA-MB-231 a 4 Gy para las tres conglutinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 6$, se observó un aumento de los niveles de LC3B y una disminución de los niveles de p62. Se obtuvieron los mismos resultados para $\beta 6$ a 6 Gy, lo que sugiere que los procesos de autofagia se activan en estas condiciones (son conglutinas β y RI dosis dependientes).

En las células SKBR3 a ambas dosis de RI se observó una disminución de la expresión en LC3B y un aumento de la expresión de p62, mostrando una inactivación de la autofagia. En MCF-7 no se observó ninguna regulación de la autofagia en ningún caso.

Estos resultados confirman el papel dual de la autofagia en la radiosensibilización celular, dependiendo principalmente de la línea celular, el estado de p53, la regulación de la vía SIRT1/FoxO1 y el contexto celular de estrés (ROS y diferentes dosis de RI).

Ejemplo 5: Efecto *in vitro* de las conglutinas β en combinación con RI en las CSCs.

A pesar de sus propiedades terapéuticas en CM, la RI convencional ha mostrado un potencial aumento del fenotipo de las CSCs como efecto no deseado, pudiendo estar en el origen del rebrote tumoral y la metástasis como efecto tardío de la RT [37, 38, 39]. Otros

estudios han demostrado que el fracaso de la RT podría atribuirse a la erradicación incompleta de la subpoblación de CSCs [40, 41], por lo que el control de la adquisición del fenotipo CSCs y la reducción de esta subpoblación proporcionaría mejores resultados clínicos y una reducción de los efectos secundarios y de la recaída tras de la exposición a 5 RI.

Tras el tratamiento con conglutinas β y RI, las CSCs de mama se caracterizaron utilizando marcadores específicos como la actividad de la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), que está directamente relacionada con el número de CSCs, y la expresión de marcadores de superficie CD44high/CD24low, y los resultados se compararon con los de las células de 10 control irradiadas sin pretratamiento con proteínas conglutina β para cada dosis.

Cuantificación de la actividad enzimática positiva de ALDH1

Para detectar la actividad de la ALDH1 se utilizó el kit ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá). Tras los tratamientos, las células se sometieron a tripsinización, se lavaron y se incubaron con BODIPY amino acetaldehído (BAAA), un 15 sustrato fluorescente no tóxico para la ALDH, que se convirtió en BODIPY aminoacato (BAA) y quedó retenido en el interior de las células. Las células ALDH1+ viables se cuantificaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACS Aria IIIu (Becton Dickinson, BD Bioscience). El inhibidor específico de ALDH1, dietilaminobenzaldehído (DEAB), se utilizó para controlar la fluorescencia de fondo. Las células ALDH1 positivas se 20 cuantificaron con un fluorocromo FITC que se detectó mediante un láser azul (488 nm) FSC, con un filtro 502 LP (Long Pass) y un filtro 530/30 [10, 17].

La actividad ALDH1 disminuyó significativamente en MCF-7 a 4 Gy cuando las células fueron tratadas individualmente con las isoformas de conglutina β_1 , β_3 y β_6 , respectivamente, mientras que no se encontraron diferencias significativas a 6 Gy (**Figura 25 11a**).

Curiosamente, cuando las células SK-BR-3 fueron tratadas con las isoformas de conglutina **Figura 11b**), sólo β_1 a 4 Gy mostró un aumento significativo de los niveles de actividad ALDH1, lo que concuerda con los resultados de supervivencia (**Figura 3b**) y apoptosis (**Figura 4b**) a esta dosis de RI.

30 Finalmente, los tratamientos en MDA-MB- 231 con β_3 y β_6 reducen la actividad ALDH1 a 4 Gy, mientras que sólo β_1 induce esos niveles más bajos en 6 Gy **Figura 11c**).

Es importante mencionar que la actividad ALDH1 se redujo drásticamente con 6 Gy en comparación con 4 Gy en células control (no tratadas con conglutinas β) para las tres líneas celulares. Los tratamientos con conglutinas $\beta 3$ y $\beta 6$ en la línea celular MDA-MB-231 a 4 Gy redujeron los niveles de ALDH1 como la terapia única con RI a 6 Gy, es decir, mostraron 5 porcentajes de ALDH1 similares que el control de 6 Gy (sin tratamiento con proteínas conglutinas β); y el tratamiento con $\beta 6$ en MCF-7 a 4 Gy indujo una menor actividad ALDH1 que en las muestras control de 6 Gy. Así pues, en función de la línea celular tratada y la isoforma de proteína conglutina β , el tratamiento combinado con RI puede llegar a ser más efectivo en la disminución de las CSCs presentes en el tumor que el propio el incremento de 10 la dosis de la RI.

Caracterización de las CSCs mediante citometría de flujo

La caracterización fenotípica de las CSCs se realizó utilizando anticuerpos CD44-PE y CD24-FITC (Biolegend, San Diego, CA, EE.UU.). Tras los tratamientos, las células se sometieron a tripsinización, se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 30 minutos en la 15 oscuridad y a 4°C con ambos anticuerpos. Todas las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo BD FACS Aria IIIu (Becton Dickinson, BD Biosciences). El anticuerpo CD24-FITC se detectó mediante un láser azul (488 nm) FSC, con un filtro 502 LP (Long Pass) y un filtro 530/30. CD44-PE se detectó mediante láser 561 YGL (561 nm), con un filtro 582/15 [10, 17].

20 Del mismo modo, los tratamientos con conglutinas β disminuyeron la expresión de los marcadores de superficie celular CD44high/CD24low en las tres líneas celulares ensayadas en comparación con las células de control RI. Concretamente, todos los tratamientos indujeron una menor expresión de los marcadores proteicos CD44high/CD24low en las líneas celulares MCF-7 y SK-BR-3 a 4 Gy, mientras que sólo la conglutina $\beta 3$ mostró una 25 disminución significativa de estos marcadores de superficie para MDA-MB-231 a 4 Gy.

En la línea celular MDA-MB-231 la RI de 6 Gy mostró que todas las isoformas de proteínas conglutinas β inducen una disminución de los niveles de expresión de CD44high/CD24low, pero sólo la conglutina $\beta 3$ mostró una disminución significativa de estos marcadores de superficie en la línea celular MCF-7, y la isoforma $\beta 1$ en la línea celular SK-BR-3 (**Figura 30 12**).

Estos resultados apoyan que la combinación de conglutinas β y RI regula el fenotipo de potencialidad en células de CM, inhibiendo la capacidad de la subpoblación de CSCs de

auto-renovación *in vitro* y previniendo la adquisición del fenotipo de potencialidad que se asociada a la terapia con RI de forma única.

Ejemplo 6: Efecto *in vitro* de las conglutinas β en combinación con RI en la capacidad de autorrenovación.

5 Se analizó también la capacidad de autorrenovación de las células de CM tras los tratamientos con proteínas conglutinas β seguidos de RI mediante el ensayo de mamosferas.

Ensayo de formación de mamosferas

Se sembraron 2×10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos 2 días antes de iniciar el ensayo 10 de formación de esferas y, a continuación, se trataron durante 24 horas con las conglutinas β_1 , β_3 y β_6 , tal como se ha descrito previamente. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se irradiaron las células siguiendo el protocolo de radiación celular previamente descrito y se dejaron otras 24 horas en la incubadora. Una vez realizado el tratamiento deseado, las células se sometieron a tripsinización, y se sembraron en una densidad de $1 \times 15 10^2$ células/pocillo por triplicado en una placa de 24 pocillos de fijación ultrabaja (Corning, Massachusetts, EE.UU.) en DMEM/F12 suplementado con 1% P/S (penicilina/estreptomicina), B27 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidrocortisona, 4 ng/ml de heparina, 10 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de FGF. A continuación, las esferas se dejaron crecer en la incubadora durante 5-8 días. Las esferas de más de 50 μm de diámetro se contaron con el 20 microscopio binocular Leica DM500 [10, 17]. Todos los reactivos se adquirieron en Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU.).

Las conglutinas β_1 , β_3 y β_6 redujeron significativamente el número de mamosferas en la línea celular MCF-7 (**Figura 13**). β_1 y β_3 redujeron el número de mamosferas en la línea celular MDA-MB-231 en ambas dosis de RI (4 y 6 Gy). Sólo la conglutina β_1 en combinación 25 con 6 Gy fue capaz de reducir la capacidad de formar esferas de la línea celular SKBR-3. La caracterización de dichas esferas mediante microscopía se muestra en la **Figura 13d**.

Estos resultados apoyan el efecto de las conglutinas β asociada a la terapia con RI en la disminución de la capacidad de auto-renovación de las líneas celulares tumorales y por tanto, apoyan su papel en la prevención de la recurrencia del CM.

30 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y los resultados se expresaron como media ± desviación estándar, salvo indicación en contrario. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk para analizar la normalidad del conjunto de datos y el análisis ANOVA de dos vías, con corrección de Dunnett o Tukey utilizando el software GraphPad Prism 9 (GraphPad software LLC, Boston, EE.UU.). Las diferencias estadísticas entre muestras se consideraron significativas cuando los valores de p fueron p <0,05 (*), p <0,01 (**) o p <0,001 (***)�.

Referencias

1. Sun, L. Radioresistance and Cancer Stem Cells: Survival of the Fittest. *J Carcinog Mutagen* **s1**, (2011).
2. Bhat, V. *et al.* Radiotherapy and radiosensitization in breast cancer: Molecular targets and clinical applications. *Crit Rev Oncol Hematol* **169**, 103566 (2022).
3. Jimenez-Lopez, J. C. Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β -conglutin: A multifunctional family of proteins with roles in plant defence, human health benefits, and potential uses as functional food. *Leg Sci* **2**, e33 (2020).
4. Lima-Cabello, E. *et al.* Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) seed β -conglutins reverse the induced insulin resistance in pancreatic cells. *Food Funct.* **9**, 5176–5188 (2018).
5. Lima-Cabello, E. *et al.* *Ex vivo* and *in vitro* assessment of anti-inflammatory activity of seed β -conglutin proteins from *Lupinus angustifolius*. *J Func Foods* **40**, 510–519 (2018).
- 20 6. Lima-Cabello, E. *et al.* Narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β -conglutin proteins modulate the insulin signaling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration. *Mol Nutr Food Res* **61**, (2017).
7. Foley, R. C. *et al.* Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. *BMC Plant Biol* **15**, 106 (2015).
- 25 8. Jimenez-Lopez, J.C, *et al* Lupin Allergy: Uncovering Structural Features and Epitopes of β -conglutin Proteins in *Lupinus angustifolius* L. with a Focus on Cross-allergenic Reactivity to Peanut and Other Legumes. In: Ortuño, F., Rojas, I. (eds) *Bioinf and Biom Eng.* vol **9043**. Springer, Cham. (2015).

9. Lima-Cabello E, Escudero-Feliu J, et al. β -Conglutins' Unique Mobile Arm Is a Key Structural Domain Involved in Molecular Nutraceutical Properties of Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 21; **24**(8):7676. (2023).
10. Escudero-Feliu, J. et al. Narrow Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β -Conglutin Seed
5 Proteins as a New Natural Cytotoxic Agents against Breast Cancer Cells. *Nutrients* **15**, 523
(2023).
9. Jimenez-Lopez, J. C. et al. Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) β 1- and β 6-
Conglutin Proteins Exhibit Antifungal Activity, Protecting Plants against Necrotrophic
Pathogen Induced Damage from *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phytophthora nicotianae*. *Front
10 in Plant Sci* **7**, (2016).
12. Rahamanian, N. et al. A. The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation
therapy. *J Biomed Sci* **23**, 88 (2016).
13. Rodriguez-Ruiz, M. E. et al. Apoptotic caspases inhibit abscopal responses to radiation
and identify a new prognostic biomarker for breast cancer patients. *Oncoimmunology* **8**,
15 e1655964 (2019).
14. Mathiasen, I. S. & Jäättelä, M. Triggering caspase-independent cell death to combat
cancer. *Trends in Mol Med* **8**, 212–220 (2002).
15. Cui, Q. et al. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist
Updat* **41**, 1–25 (2018).
- 20 16. Wang, Y. et al. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy.
Theranostics **11**, 4839–4857 (2021).
17. Ríos-Arrabal, S. et al. Endothelin-1 as a Mediator of Heme Oxygenase-1-Induced
Stemness in Colorectal Cancer: Influence of p53. *J Pers Med* **11**, 509 (2021).
18. Chen, Y. et al. LRRC31 inhibits DNA repair and sensitizes breast cancer brain
25 metastasis to radiation therapy. *Nat Cell Biol* **22**, 1276–1285 (2020).
19. Deng, S. et al. Targeting the DNA Damage Response and DNA Repair Pathways to
Enhance Radiosensitivity in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **14**, 4874 (2022).
20. Collins, P. L. et al. DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a
contact-dependent manner. *Nat Commun* **11**, 3158 (2020).

21. Hwang, J., et al. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med* **61**, 95–110 (2013).
22. Yao, H. & Rahman, I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochem Pharmacol* **84**, 1332–1339 (2012).
- 5 23. Shi, L. et al. A SIRT1-centered circuitry regulates breast cancer stemness and metastasis. *Oncogene* **37**, 6299–6315 (2018).
24. Fukui, M. et al. Mechanism underlying resveratrol's attenuation of paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells: Role of the SIRT1-FOXO1-HER3 signaling pathway. *Cancer Treat Res Commun* **28**, 100386 (2021).
- 10 25. Zhuang, W. et al. Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int J Cancer* **129**, 2720–2731 (2011).
26. Ko, A. et al. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ* **21**, 92–99 (2014).
27. Li H. et al. Autophagy-regulating microRNAs: potential targets for improving radiotherapy.
- 15 J Cancer Res Clin Oncol. 144(9):1623-1634 (2018). 28. Kim, W. et al. Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* **8**, 1105 (2019).
29. Levine, B. & Yuan, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**, 2679–2688 (2005).
30. Kim, K. W. et al. Autophagy for cancer therapy through inhibition of pro-apoptotic proteins and mammalian target of rapamycin signaling. *J Biol Chem* **281**, 36883–36890 (2006).
- 20 31. Cui, L. et al. Radiation induces autophagic cell death via the p53/DRAM signaling pathway in breast cancer cells. *Oncol Rep* **35**, 3639–3647 (2016).
32. Wang, B. et al. PLK1 Inhibition Sensitizes Breast Cancer Cells to Radiation via Suppressing Autophagy. *Int J Rad Onc, Bio, Phy* **110**, 1234–1247 (2021).
- 25 33. Zhang, X., et al. miR-22 suppresses tumorigenesis and improves radiosensitivity of breast cancer cells by targeting Sirt1. *Biol Res* **50**, 27 (2017).

34. Masoumi, H., et al. The beneficial role of SIRT1 activator on chemo- and radiosensitization of breast cancer cells in response to IL-6. *Mol Biol Rep* **47**, 129–139 (2020).
35. Amini, P. et al. Resveratrol Induces Apoptosis and Attenuates Proliferation of MCF-7 Cells in Combination with Radiation and Hyperthermia. *Current Mol Med* **21**, 142–150 (2021).
36. Mahmoud, A. S. et al. The Detection of DNA Damage Response in MCF7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines after X-ray Exposure. *Genome Int* (2023) doi:10.14293/genint.14.1.001.
- 10 37. Kim, R.-K. et al. Radiation promotes malignant phenotypes through SRC in breast cancer cells. *Cancer Sci* **106**, 78–85 (2015).
38. Gomez-Casal, R. et al. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes. *Mol Cancer* **12**, 94 (2013).
- 15 39. Gao, X. et al. Radiation-Induced Reprogramming of Pre-Senescent Mammary Epithelial Cells Enriches Putative CD44+/CD24-/low Stem Cell Phenotype. *Front in Onc* **6**, (2016).
40. Krause, M., et al. Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy. *Clin Cancer Res* **17**, 7224–7229 (2011).
41. Pawlik, T. M. & Keyomarsi, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy.
20 *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**, 928–942 (2004).

REIVINDICACIONES

1. Proteína conglutina β aislada de semillas de *Lupinus angustifolius* L. para su uso como radiosensibilizador en radioterapia.
2. La proteína según la reivindicación anterior para su uso como radiosensibilizador en radioterapia caracterizada por que presenta una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con la SEQ ID NO 1 y posee la actividad y las características estructurales de la proteína conglutina β 1, o una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con SEQ ID NO 3 y posee la actividad y las características estructurales de la proteína conglutina β 3, o una identidad de al menos un 95% o de al menos un 99% o de un 100% con SEQ ID NO 6 y posee la actividad y las características estructurales de la proteína conglutina β 6.
3. La proteína conglutina β 1, β 3 o β 6 para su uso como radiosensibilizador en radioterapia.
4. Composición que comprende al menos una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como radiosensibilizador en radioterapia.
- 15 5. La composición según la reivindicación anterior que es una composición farmacéutica.
6. La composición según la reivindicación anterior que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.
7. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su uso como radiosensibilizador en un método 20 que utiliza radioterapia para el tratamiento del cáncer.
8. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su uso según la reivindicación anterior donde el cáncer se selecciona de la lista que comprende cáncer de colon, cáncer de páncreas, hepatocarcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón y cáncer 25 de mama.
9. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su uso según la reivindicación anterior donde el cáncer es cáncer de mama.

10. La proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su uso según la reivindicación anterior donde el cáncer de mama es del tipo triple negativo.

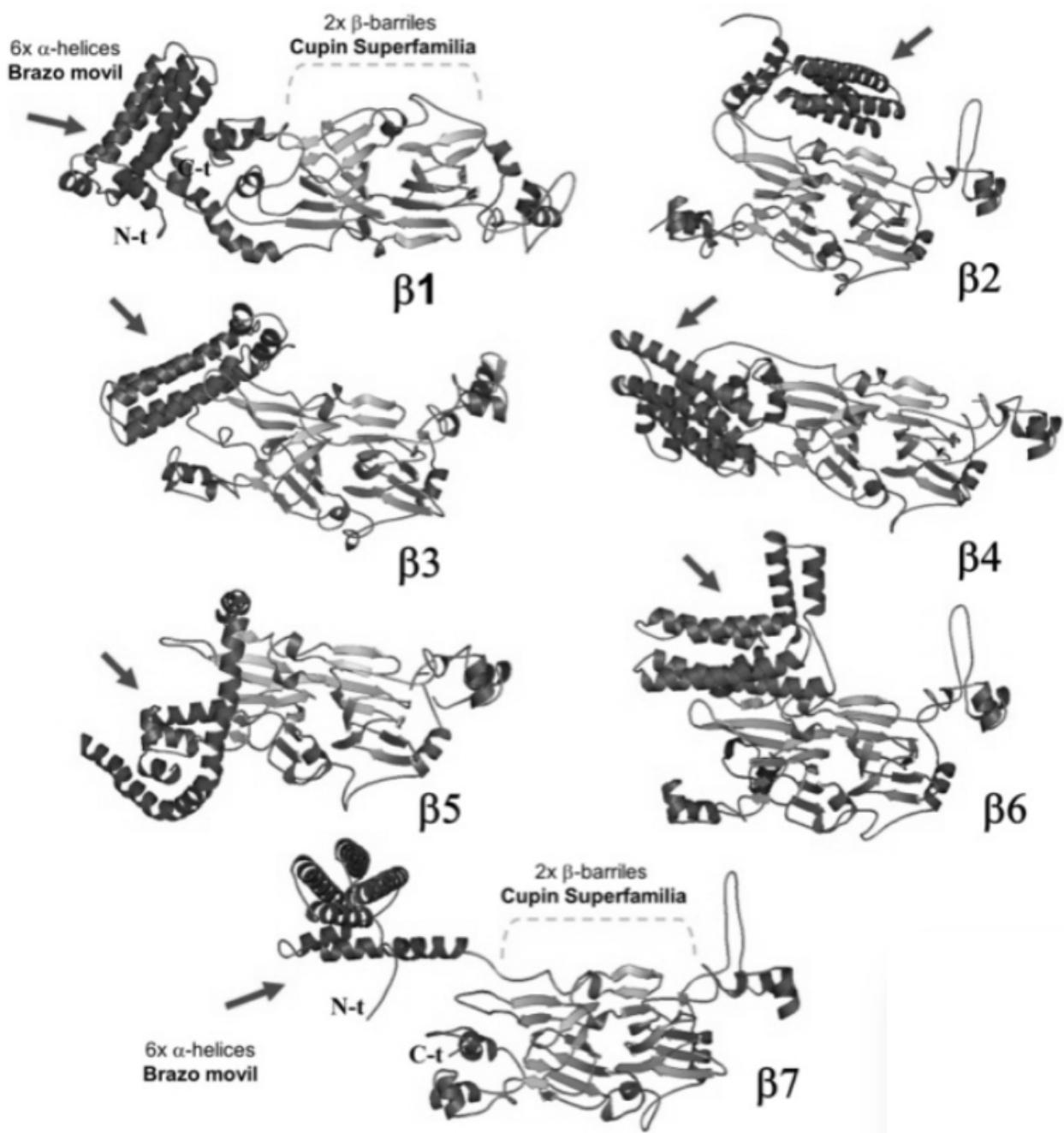


FIG.1

ES 3 018 016 A1

FIG.2

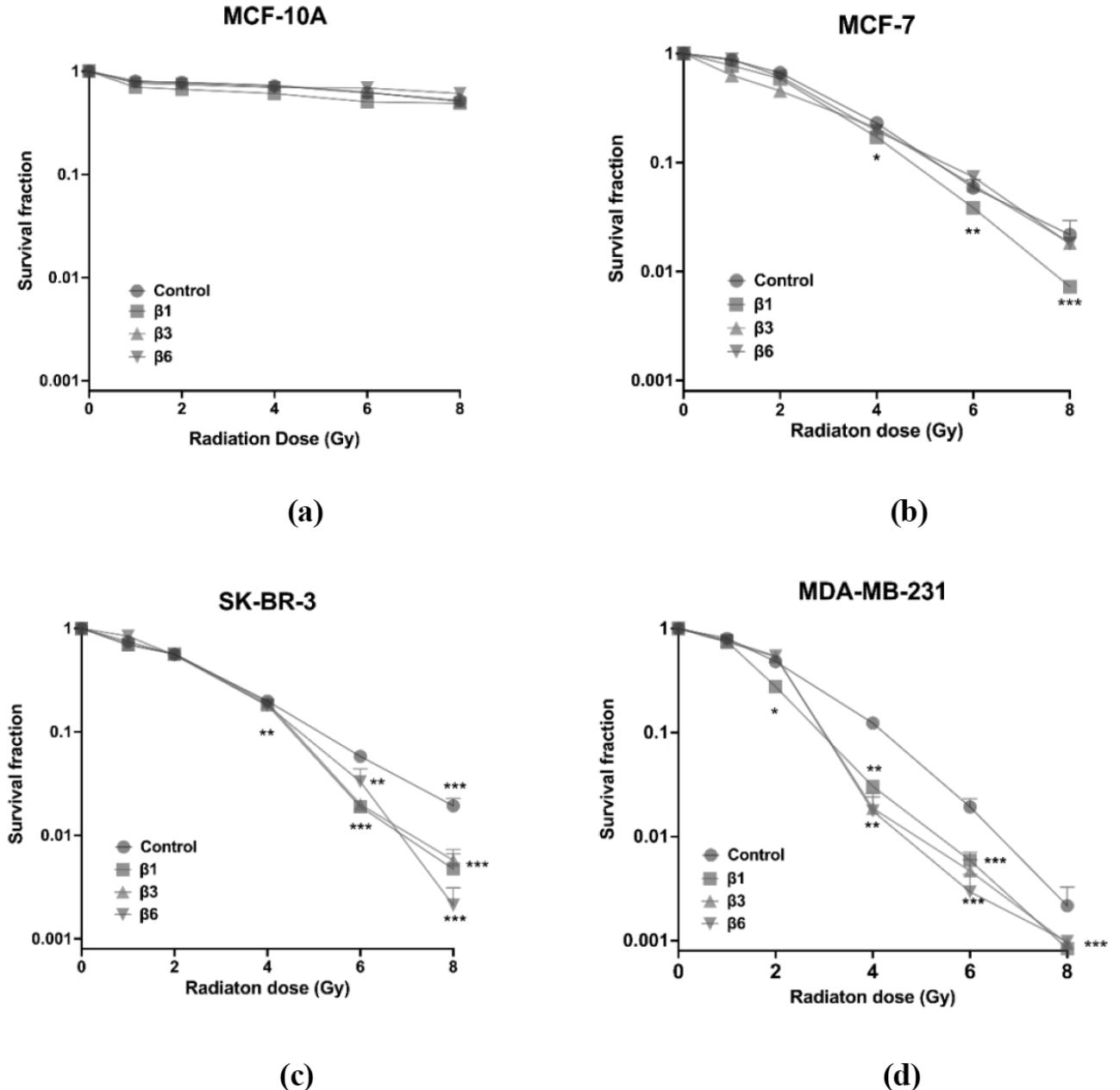


FIG.3

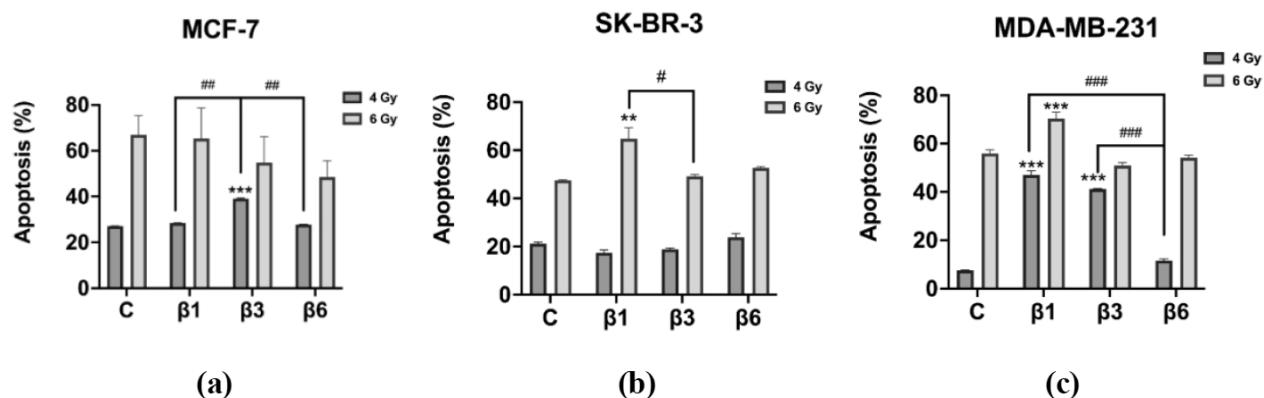


FIG. 4

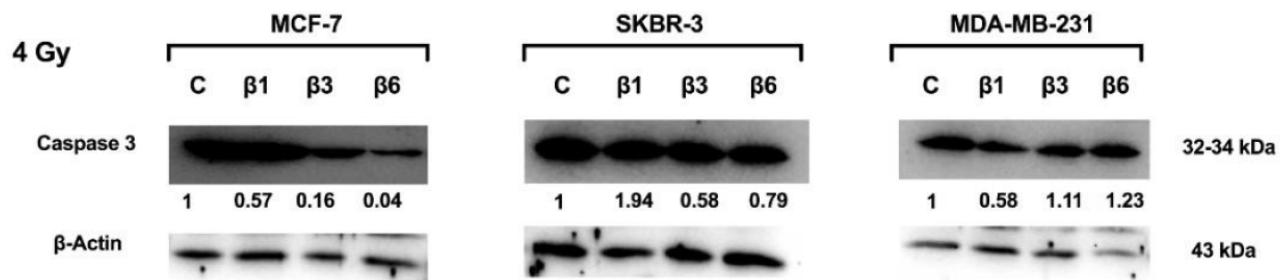


FIG. 5

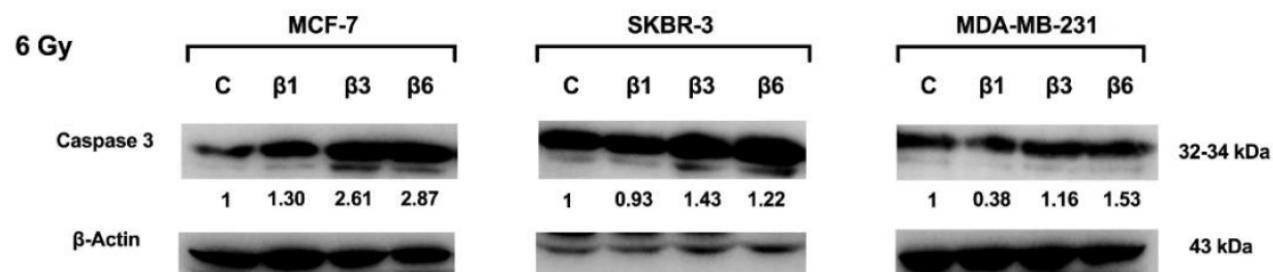


FIG. 6

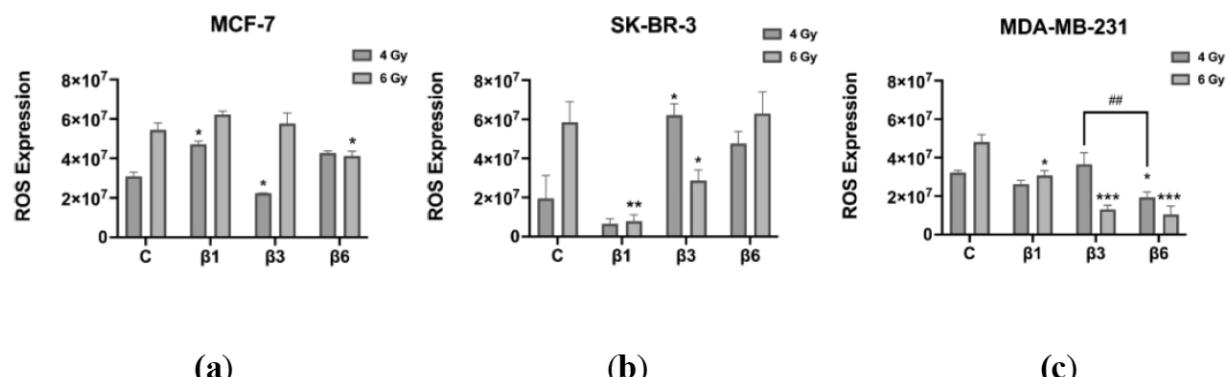


FIG. 7

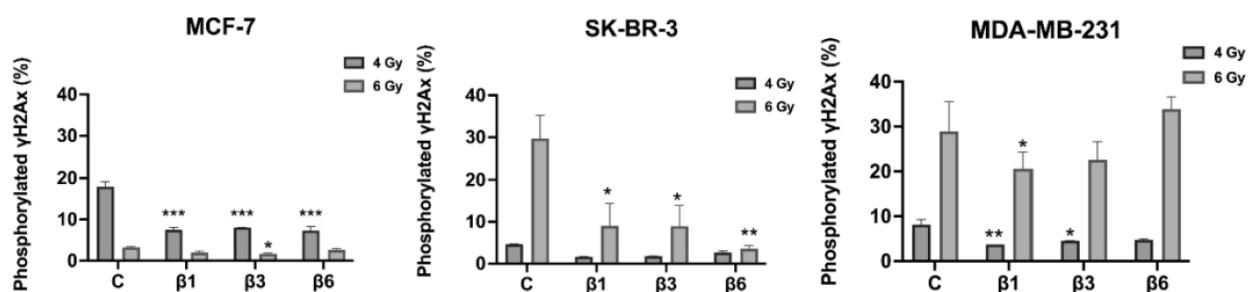


FIG. 8

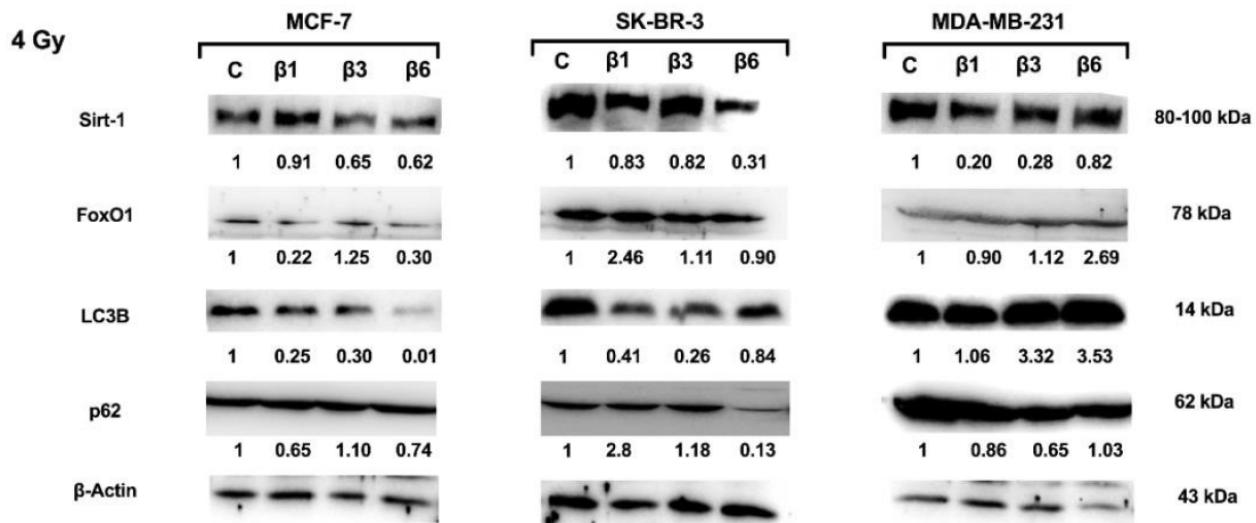


FIG. 9

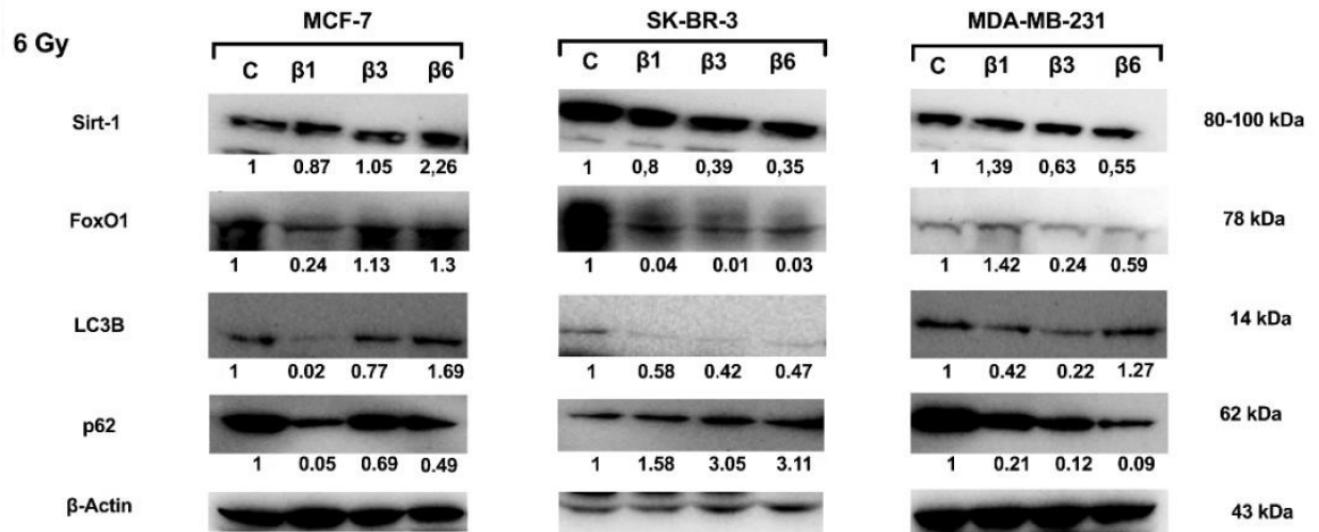


FIG. 10

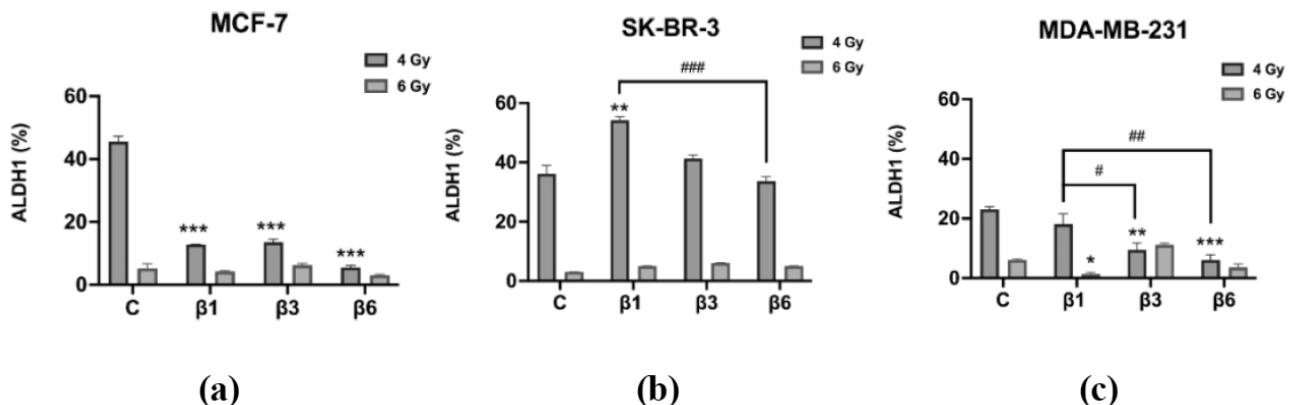


FIG. 11

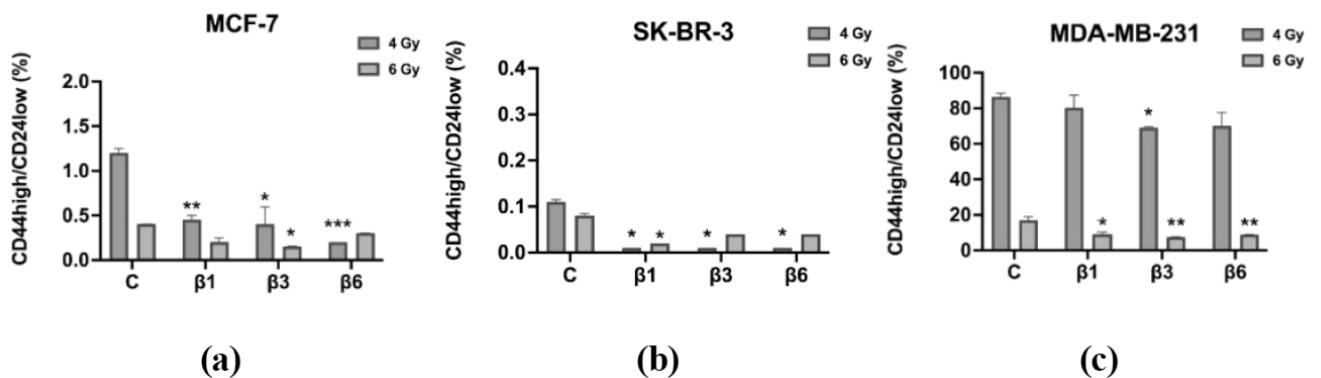
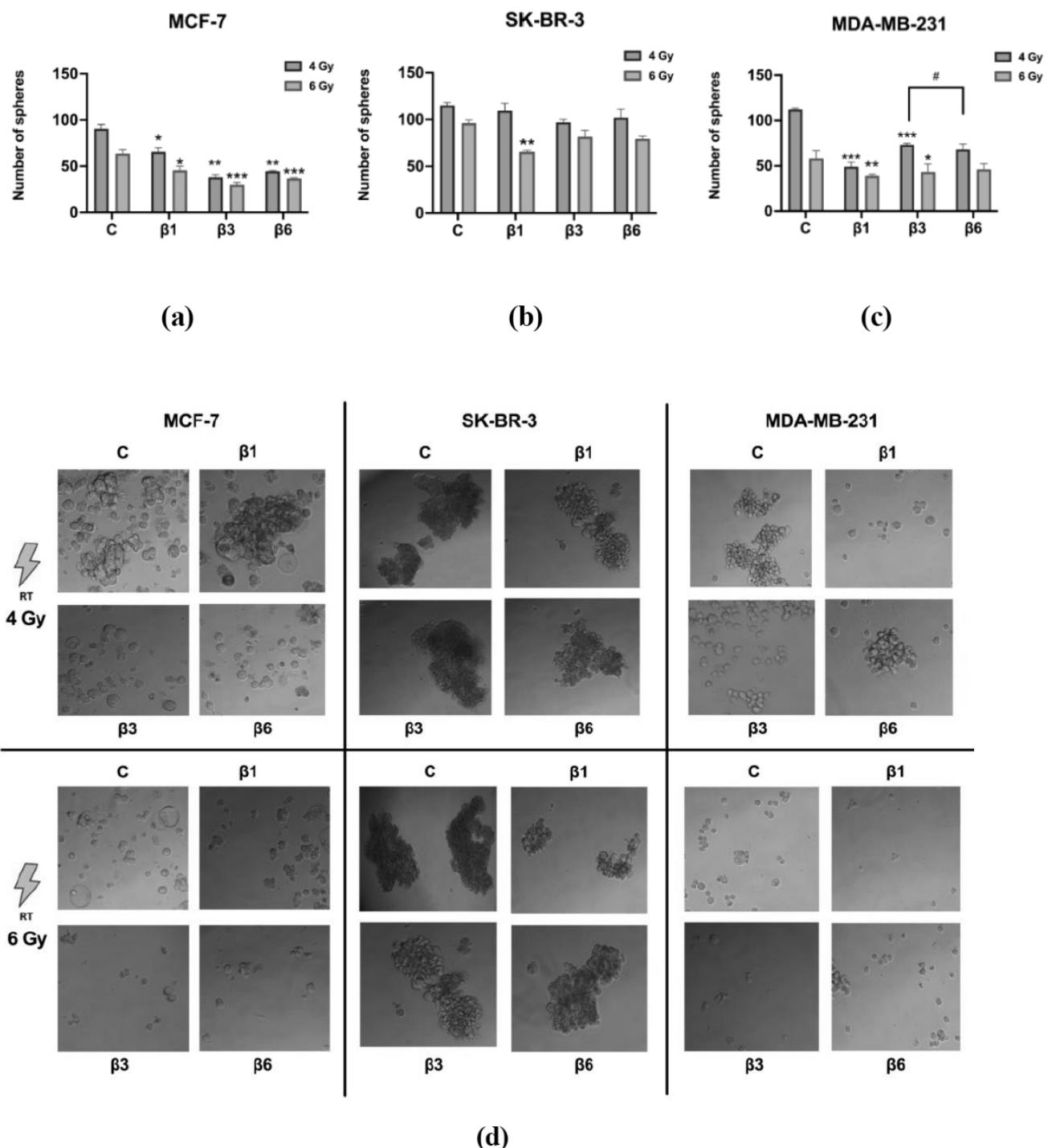


FIG. 12

**FIG. 13**



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202330927

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 13.11.2023

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl. : **A61K36/48** (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X		ESCUDERO-FELIU, J. Narrow Leafed Lupin (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) beta-conglutin proteins as new preventive, cytotoxic and radiosensitizing agents against breast cancer cells. Tesis Doctoral Universidad de Granada [en línea] 31/03/2023 [recuperado el 23/10/2024] & Base de datos GenBank. Número de acceso HQ670409, versión 1 [en línea] 16/04/2011 [recuperado el 23/10/2024] Recuperado de internet <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ670409 versión 16/04/2011>. Todo el documento	1-10
X		ESCUDERO-FELIU, J. et al. Narrow Leafed Lupin (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) beta-conglutin seed proteins as a new natural cytotoxic agents against breast cancer cells. Nutrients, 2023, Vol. 15, Nº 3, artículo nº:523 [en línea][recuperado el 23/10/2024], ISSN 2072-6643 (Electronic), <DOI:10.3390/nu15030523>. Todo el documento	1-10
X		LIMA-CABELLO, E. et al. Beta-Conglutins' unique mobile arm is a key structural domain involved in molecular nutraceutical properties of Narrow-Leafed Lupin (<i>Lupinus angustifolius</i> L.). International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, Nº 8, artículo nº:7676 [en línea][recuperado el 23/10/2024], ISSN 1422-0067 (Electronic), <DOI:10.3390/ijms24087676>. Todo el documento	1-10
X		ESCUDERO-FELIU, J. IV Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Biomedicina: Narrow-Leafed Lupin (<i>Lupinus angustifolius</i> L.) seed β-conglutin proteins induce G0/G1 arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. Universidad de Granada, 06/11/2020 [en línea][recuperado el 23/10/2024]. Recuperado de Internet <URL: www.conbiopreval.com>. Todo el documento	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 23.10.2024	Examinador C. González Valdespino	Página 1/2
--	--------------------------------------	---------------

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, INSPEC, COMPDX, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE