



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 135 350**

⑫ Número de solicitud: 9800019

⑤① Int. Cl.⁶: C12N 9/88

C12N 9/96

A61K 38/51

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **08.01.98**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.99**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.10.99

⑦① Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE MALAGA**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑦② Inventor/es: **Urdiales Ruiz, José Luis;**
Viquera Mínguez, Enrique;
Esteban del Valle, Alicia;
Olmo Aparicio, María Teresa y
Sánchez Jiménez, Francisca María

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Aplicaciones bioquímicas e inmunológicas de una proteína de fusión glutatión transferasa-histidina descarboxilasa de rata.**

⑤⑦ Resumen:

Aplicaciones bioquímicas e inmunológicas de una proteína de fusión glutatión transferasa-histidina descarboxilasa de rata.

Mediante transcripción inversa (RT) y amplificación en cadena (PCR) se obtuvo un cDNA de histidina descarboxilasa de rata residuos del 1 al 512 (rHDC1/512), que fue utilizado para la construcción de un plásmido recombinante capaz de expresar una fusión de la glutatión transferasa (GST) con la rHDC1/512. La purificación de polipéptidos con actividad HDC se ve considerablemente simplificada y abaratada con la utilización de esta fusión (GST-rHDC1/512), en comparación con la obtención de proteína HDC de fuentes naturales. La proteína de fusión se puede utilizar para la búsqueda y caracterización de fármacos antihistamínicos que tengan como diana la actividad histidina descarboxilasa, y para estudios de afinidad, degradación y modificaciones post-traduccionales del polipéptido HDC. A partir de la proteína de fusión GST-rHDC1/512 se obtuvieron anticuerpos policlonales, capaces de reconocer al antígeno original HDC de rata, con interés en el desarrollo de métodos de purificación y diagnóstico de la proteína.

DESCRIPCION

Aplicaciones bioquímicas e inmunológicas de una proteína de fusión glutatión transferasa-histidina descarboxilasa de rata.

Campo de la técnica

La presente invención tiene su aplicación dentro de la industria farmacéutica dedicada al desarrollo y comercialización de productos con finalidad de diagnóstico, o de investigación en Biomedicina de enfermedades relacionadas con la respuesta inmune, la úlcera gástrica, y otras degeneraciones tisulares: cáncer (de colon, mama y pulmón), síndrome de Crohn, etc.; en definitiva, procesos fisiológicos y patológicos en los que esté directamente implicada la enzima histidina descarboxilasa.

Antecedentes

La enzima histidina descarboxilasa (HDC)(E.C. 4.1.1.22, según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica), en células de mamíferos es una proteína homodimérica de aproximadamente 110 kDa, muy minoritaria (menos del 0.001% del contenido proteico celular), cuya actividad es dependiente de piridoxal-fosfato o PLP. Esta actividad se expresa con actividad apreciable en un número muy reducido de tipos celulares: algunas células del sistema nervioso central y periférico, algunas células de la línea blanca como los blastocitos, mastocitos, epitelios digestivos y pulmonares, y algunos tejidos fetales, especialmente el hígado de fetos de roedores, y células cancerosas desdiferenciadas. En la mayoría de estas células o tejidos, no se ha estudiado aún en profundidad cuál es el papel fisiológico de esta enzima o de su producto, la histamina, aunque parecen estar claramente implicadas en la respuesta inmune, el choque anafiláctico, la transmisión sináptica de algunos tipos neuronales, y el desarrollo de tejidos fetales y cancerosos. Además, la proteína presenta una gran inestabilidad, tanto *in vivo* como en extractos libres de células, lo cual ha dificultado aún más su purificación y caracterización.

De hecho, la proteína nativa no pudo purificarse de tejidos de mamíferos hasta 1984 cuando Taguchi y colaboradores [J. Biol. Chem., (1984) 259: 5214-5221] purificaron parcialmente la enzima de rata partiendo de hígado fetal; a partir de 400 g de tejido consiguieron únicamente 940 µg de proteína purificada, con un protocolo que incluye 8 pasos de purificación y tiene una recuperación del 5%. En 1990, Ohmori y colaboradores [J. Biochem., (1990) 107: 834-839] purificaron a homogeneidad la enzima de ratón utilizando como fuente de partida 90.000 millones de células de mastocitoma P-480, recogidas del líquido ascítico de 250 ratones inoculados con 4,5 millones de células siete días antes; así se obtienen tan sólo 15 µg de proteína HDC, fruto de 9 pasos de purificación con una recuperación del 7%. En estas condiciones la obtención de anticuerpos policlonales específicos de histidina descarboxilasa de mamíferos se convierte en un proceso muy costoso y poco rentable.

En ese mismo año 1990, Joseph y colaboradores [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (1990) 87: 733-737] clonaron un cDNA correspondiente a la histidina descarboxilasa de rata. Posteriormente, Yamamoto y colaboradores clonaron el cDNA completo de la histidina descarboxilasa de ratón [FEBS Lett., (1990) 276: 214-218], y Yatsunami y colaboradores [J. Biol. Chem., (1994) 269: 1554-1559] aislaron 24 Kb del gen de la HDC humana.

Aunque los cDNAs aislados de mamíferos codifican un polipéptido de 74-77 kDa, el monómero nativo tiene un tamaño de 53-57 kDa. Es decir, el producto primario de traducción del mensajero sufre una proteólisis parcial antes de dar lugar al monómero que forma parte de la enzima activa. De hecho, la versión completa de roedores no presenta actividad enzimática [Yamamoto y colaboradores, Biochem. Biophys. Acta, (1993) 1216: 431-440; y resultados de nuestro grupo no publicados]. Sin embargo, aún se desconoce el(os) punto(s) concreto(s) de la secuencia por donde tiene lugar el procesamiento de la proteína *in vivo*, y los mecanismos que operan en el proceso proteolítico.

Una gran dificultad para el estudio de la expresión fisiológica o patológica de histidina descarboxilasa en células de mamíferos es la escasez de anticuerpos específicos. En el mercado no existe ninguna preparación de anticuerpos específicos para esta proteína. Este hecho viene motivado por el bajo rendimiento de los protocolos de purificación de la proteína a partir de su fuente natural, que hace que el proceso no sea rentable para cualquier empresa del sector. Sin embargo, la comercialización de anticuerpos anti-HDC de mamíferos tendría una relevancia especial en métodos diagnósticos; lo cual es función de la importancia que tiene el antígeno en procesos de degeneración neurológica, procesos alérgicos, degeneración de epitelios digestivos (úlcera gástrica, síndrome de Crohn, cáncer de colon, leucemias blastocíticas, mastocitomas, etc.).

Breve descripción

Mediante reacciones de reverso transcripción y de polimerización de DNA en cadena efectuadas a partir de una preparación de mensajeros de hígado fetal de rata, se obtuvo un fragmento (correspondiente a los residuos 1-512, más 8 nucleótidos del extremo 5' no traducido del mensajero de HDC de rata) con extremos compatibles con el vector de expresión en *E. coli*, pGEX-3X, comercializado por Pharmacia-Biotech. Este vector, los derivados de él y los productos polipeptídicos obtenidos de ellos están recogidos en la patente de los Estados Unidos de referencia 5654176.

En nuestro caso, el plásmido recombinante, denominado pGEX-3X-rHDC1/512, se obtuvo por digestión con BamHI de ambos (plásmido e inserto) y posterior incubación con la ligasa del fago T4. Esta construcción recombinante se utilizó para transformar células de *E. coli* (estirpe XL1-Blue) mediante electroporación. La selección de colonias potencialmente positivas se efectuó mediante aislamiento de plásmidos por hidrólisis alcalina y mapas de restricción de los mismos. De este escrutinio resultó seleccionado uno de los clones que en lo sucesivo denominaremos cGEX-3X-rHDC1/512. La figura 1 muestra un esquema de la estrategia utilizada para la clonación en pGEX-3X del inserto rHDC1/512, lo que da como resultado en plásmido recombinante pGEX-3X-rHDC1/512.

Posteriormente, se realizó una puesta a punto de las condiciones idóneas de expresión de la construcción concreta cuyo producto sería un polipéptido de 79 kDa (tamaño teórico de la fusión GST-rHDC1/512) (GST= 26 kDa, HDC= 53 kDa), en respuesta al tratamiento con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido o IPTG (inductor del promotor tac, que dirige la expresión de la fusión) (figura 1). Sobre el clon cGEX-3X-rHDC1/512, se estudió la eficacia de producción relativa del polipéptido de 79 kDa utilizando distintas concentraciones del inductor, IPTG, y distintas temperaturas de incubación durante la inducción. De estas pruebas efectuadas, resultaron fijadas las condiciones definitivas para los posteriores cultivos e inducciones, que se llevaron a cabo en una escala de cultivo 15 veces superior, siguiendo un protocolo que consistía básicamente en un cultivo en medio LB (medio Luria-Bertani, por litro: 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl), crecido a partir de un precultivo preparado la noche anterior, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (2 horas), la adición posterior de IPTG a una concentración final de 0,1-0,3 mM, y la incubación con el inductor durante 12 horas a 20°C. Tras la inducción, los cultivos se sonicaban y el contenido celular se sometía a una cromatografía de afinidad por glutation, que retenía a la fusión GST-rHDC1/512. Tras diversos lavados con tampón PBS (tampón fosfato salino: KCl 6,19 mM, NaCl 150 mM, fosfato monosódico 1,65 mM, fosfato bisódico 9,35 mM, pH 7,4), se procedía a la elución de la fusión de la columna utilizando tampón de elución que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y glutation reducido a concentración 10 mM. La fusión de 79 kDa suponía el 40-50 % de proteína de la preparación final. De manera que, como media, se obtenían 2-3 mg de la proteína de fusión por 500 ml de cultivo bacteriano.

El extracto purificado por afinidad a glutation se sometía a una electroforesis preparativa desnaturalizante (o SDS/PAGE). El fragmento de poliacrilamida que contenía la banda correspondiente a 79 kDa (aproximadamente 2,4 mg) se extraía y se sonicaba en proporción 1:1 con coadyuvante completo de Freund.

Esta emulsión servía de preparación antigénica para la sensibilización de conejos de la estirpe Nueva Zelanda. La primera sensibilización de los conejos tuvo lugar mediante múltiples inyecciones subcutáneas que contenían aproximadamente 2,5 mg de proteína de fusión en un volumen total de 2 ml. Transcurridos 30 días de la primera inmunización, los conejos fueron sometidos de nuevo a múltiples inyecciones de una emulsión que contenía 2,5 mg de proteína de fusión aproximadamente en un volumen total de 2 ml. A los 10 días se realizó el sangrado del conejo, y se probó la capacidad inmunoreactiva del suero obtenido. De las pruebas realizadas se deduce que los sueros obtenidos contienen anticuerpos policlonales, objeto de la presente patente, que son capaces de reconocer selectivamente al polipéptido de partida (inmunógeno) y al polipéptido de la HDC 17/656 de rata expresado *in vitro* a partir del plásmido recombinante pX-HDC [obtenido a partir del clon HDC-2.3 de Joseph y colaboradores, Proe. Natl. Acad. Sci., (1990) USA, 87: 733-737].

Este trabajo supone una gran simplificación y un abaratamiento extraordinario de la obtención de la proteína y de sus anticuerpos, lo que permite abordar, por tanto, la producción de estos anticuerpos a escala industrial con fines diagnósticos y de investigación. Los anticuerpos obtenidos reconocen al polipéptido de HDC de rata, tanto en estado nativo (inmunoprecipitación) como en estado desnaturalizado (transferencia "Western"). Estas características avalan la posibilidad de que puedan ser empleados en el desarrollo de métodos de diagnóstico o seguimiento de la expresión de HDC de rata del tipo RIA, ELISA, pulso con radioligandos (por ejemplo, con ³⁵S-metionina) y seguimiento mediante inmunoprecipitación de la expresión, maduración o degradación en células en cultivo, etc. El abaratamiento de este

procedimiento frente a la obtención de polipéptido rHDC de su fuente natural por medios convencionales se estima en al menos 200 veces.

La posibilidad de liberar la fracción GST mediante tratamiento proteolítico, abre la posibilidad de modificación del protocolo para la obtención de polipéptido rHDC1/512 libre de fusión, si bien la inestabilidad de esta proteína hace que disminuya notablemente el rendimiento de la producción de antígeno. A pesar de esta pérdida de rendimiento, esta posibilidad podría ser interesante para obtener polipéptido de HDC purificado como proteína patrón en algunos de los métodos inmunológicos mencionados anteriormente (RIA, ELISA, etc).

Además, la fusión GST-rHDC1/512 presenta actividad HDC, lo cual facilita la generación y análisis de secuencias mutantes que tengan como finalidad la detección y caracterización de residuos implicados en el sitio catalítico de la enzima HDC.

Descripción detallada de la invención

Puesto que la patente del plásmido pGEX-3X está vigente y abarca también a los productos de fusión, mencionaremos, aunque de forma resumida el procedimiento por el cual se obtuvo la proteína de fusión cuyas aplicaciones son el objeto de la presente patente. Los protocolos de extracción, manipulación, recombinación *in vitro* de DNA, y transformación bacteriana quedan perfectamente descritos en la bibliografía sobre técnicas de DNA recombinante [ver Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: a laboratory manual, (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press]. En la presente descripción detallaremos el protocolo de obtención del suero que contiene los anticuerpos que reconocen este polipéptido y los experimentos realizados para la comprobación de la invención y su aplicabilidad.

Los fetos de rata, material de partida para la obtención del cDNA de HDC 1/512, tenían 16 días de gestación y procedían de una rata de raza Wistar gestante. Se procedió a la extracción de RNA mensajeros utilizando 100 mg de tejido y el preparado comercial MroFastTrack de Invitrogene. Para la reverso transcripción (RT) se utilizó la reverso transcriptasa de leucemia del virus murino de Molowni (Boehringer Mannheim). La reacción procedió en un volumen final de 20 μ l durante 60 minutos a 37°C, en presencia de desoxinucleótidos (dNTPs) a concentración 1 mM (Boehringer Mannheim), 10 μ l de solución de mensajeros, 22 unidades de enzima, y 50 pmoles del cebador sintético H1, de secuencia 5'-ACCCTCAGGATCTACTCCAGGGATAGCC-3', fabricado a petición nuestra por Pharmacia-Biotech), y que introduce un sitio de parada de la traducción (en negrita) en la posición del aminoácido 513 de la secuencia de HDC de rata, y un sitio de restricción BamHI subrayado en la secuencia. La reacción se paraba por calentamiento a 65°C durante 10 minutos.

La reacción PCR posterior procedió en el mismo tampón con volumen final 100 μ l, durante un ciclo de desnaturalización (3 min y 94°C), 30 ciclos de amplificación (desnaturalización 1 min y 92°C, hibridación 2 min y 45°C, polimerización 3 min y 72°C), y una extensión final de 5 min a 72°C. La amplificación ocurrió gracias a la presencia de los dNTPs y un nuevo cebador adicional (H2), de secuencia 5'-GATTTGGATCCCTATGATGGATCCCAG-3', que introduce un sitio BamHI (subrayado) antes del codón que codifica la primera metionina (en negrita) de la HDC de rata. La secuencia completa del fragmento amplificado con los cebadores H1 y H2 y la secuencia traducida en aminoácidos en el marco de lectura correcto se detalla en la Lista de secuencias. Se marca también los sitios de corte con la enzima de restricción BamHI. Una vez secuenciado el producto de amplificación se observó que presentaba algunas mutaciones con respecto a la secuencia publicada por Joseph y colaboradores [Proc. Natl. Acad. Sci., (1990) USA, 87: 733-737], hecho que probablemente se debe a variaciones alélicas dentro de una misma especie. El producto de PCR obtenido fue subclonado en el plásmido pCR-ScriptTM AmpSK(+) de la casa comercial Stratagene y el plásmido recombinante obtenido se utilizó para transformar una suspensión de *E. coli* XL1-Blue. De las colonias obtenidas se aisló el plásmido recombinante y se digirió con BamHI.

Tras la digestión del producto de amplificación y del plásmido pGEX-3X con BamHI, ambos DNAs se sometieron a una electroforesis horizontal submarina (gel de 0,8 % de agarosa en Tris 40 mM, acetato sódico 20 mM, EDTA 1mM, pH 7,2). Las bandas electroforéticas de tamaño adecuado se purificaron utilizando el preparado comercial GeneClean (BIO 101 Inc.). El plásmido pGEX-3X se trató con fosfatasa alcalina de intestino de buey (Boehringer Mannheim) para evitar su recircularización. Una vez purificado el producto de amplificación y el plásmido pGEX-3X desfosforilado se ligaron *in vitro* mediante la reacción de la ligasa del fago T4 comercial (Boehringer Mannheim).

La mezcla de la reacción de la ligasa se utilizó para transformar una suspensión de la cepa *E. coli* XL1-Blue. Sobre seis clones aislados se extrajo DNA plasmídico y se comprobó, mediante digestiones con distintas enzimas de restricción, la orientación del cDNA de HDC de rata insertado (en sentido o anti-

sentido respecto al promotor tac presente en el plásmido). Se seleccionó un clon insertado en el sentido correcto para el análisis posterior de la eficacia de expresión de la fusión GST-rHDC1/512 en respuesta a diferentes concentraciones de IPTG.

Como puede apreciarse en la figura 1, en cGST-rHDC1/512, la fusión ocurre entre un residuo de prolina de la secuencia de GST, situado al final del sitio BamHI, y la primera metionina de la rHDC1/512. El codón que codifica la última prolina perteneciente a la GST tiene en su tercera posición una timina procedente de la rHDC1/512 en lugar de la citosina presente en el plásmido original, esta substitución no altera el aminoácido codificado por dicho codón. De manera que la fusión expresada en respuesta a IPTG tiene un peso molecular teórico de 79 kDa.

La inducción de la expresión de cGST-rHDC1/512 se realizó diluyendo un cultivo bacteriano, crecido durante toda la noche en medio LB sin IPTG, e incubándolo en el mismo medio a 37°C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se añadió IPTG a concentración final 0,3 mM, y se proseguió la incubación a 20°C durante 12 horas.

La figura 2 muestra el resultado de la expresión de la fusión en un cultivo de cGST-rHDC 1/512. Una vez concluidos el tiempo de inducción, las bacterias presentes en 1,5 ml de cultivo se centrifugaron, lavaron en tampón PBS 1X y resuspendieron en 200 µl del tampón PBS-Triton X-100 al 0,1 % y se sonicaron en un sonicador Branson modelo Sonifier 250. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 13.000 rpm, obteniendo por separado un sobrenadante (proteínas solubles) y un sedimento en el que incluye los cuerpos de inclusión que la bacteria forma con la proteína expresada. La fotografía corresponde al resultado de una electroforesis desnaturalizante convencional en gel de poliacrilamida y SDS, en la que se habían cargado 5 µl de sedimento (calle 1) o sobrenadante (calle 2) de los extractos bacterianos, así como al resultado de la purificación por cromatografía de afinidad a glutation-Sepharose (calle 3), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Pharmacia Biotech). Las proteínas se tiñeron con Azul de Coomassie R-250.

En las distintas pruebas efectuadas la cantidad de polipéptido GST-rHDC1/512 se estimó en aproximadamente el 40 % de la cantidad de proteínas totales. En caso de que la fusión fuera activa, este sistema proveería de un método de escrutinio rápido de actividad/pérdida de actividad HDC de secuencias mutadas en residuos o fragmentos potencialmente implicados en el mecanismo de reacción. Es más, las fusiones GST-HDC en estado nativo activo, en lo que a actividad HDC se refiere, serán de gran utilidad como herramienta biológica: i) en estudios de afinidad de la fracción HDC a otros polipéptidos, como ha ocurrido en el caso de la ornitina descarboxilasa [Coleman y colaboradores, J. Biol. Chem., (1993) 268: 24572-24579; Coleman y colaboradores, J. Biol. Chem., (1994) 269: 3155-3158], ii) en estudios encaminados a esclarecer el mecanismo proteolítico de la maduración o degradación de la HDC en células de mamíferos, iii) en la selección ("screening") de fármacos antihistamínicos que tengan como blanco de acción la propia enzima productora de histamina.

Por ello, se detectó la actividad HDC de los sobrenadantes de las bacterias inducidas por 0,3 mM IPTG. El método está basado en el seguimiento del desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ catalizado por la enzima a partir de histidina marcada con ^{14}C en el carbono 1 en una mezcla que contiene ditiotreitol 0,2 mM, PLP 10 µM, polietilenglicol-300 10 mg/ml y fosfato potásico 100 mM pH 6,8. El desprendimiento de CO_2 se midió como describimos previamente en Urdiales y colaboradores [FEBS lett., (1992) 305: 260-264]. La tabla I muestra los resultados obtenidos con distintos volúmenes de sobrenadante de bacterias cGST-rHDC1/512 inducidas durante 12 horas a 20°C:

TABLA I

Actividad HDC en extractos obtenidos de bacterias que expresan solo GST (control) o la fusión GST-rHDC1/512.

	Actividad HDC (DPM/h)	Veces de incremento*
GST	519	—
GST-HDC 1	268221	517
GST-HDC 2**	109949	212

* con respecto a la actividad de los controles.

** se utilizó la mitad de proteínas totales que en GST-HDC 1.

Como control se usó un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido original pGEX-3X (que expresa la GST sin fusionar). Diez microlitros del extracto las bacterias GST-rHDC1/512 (aproximadamente 1,3 mg de proteínas totales) contienen, al menos, dos órdenes de magnitud más actividad HDC que la que puede obtenerse a partir de un millón de células de mamíferos o de igual volumen de una reacción de expresión de HDC *in vitro*, y en una riqueza (antes de la cromatografía de afinidad a GST) que supone el 10-20 % de la proteína bacteriana, mientras que en cualquiera de los otros sistemas mencionados, la proteína está en los extractos en cantidad muy inferior al 0,1 %. De ello se deduce que, ciertamente, este sistema facilita la obtención a escala preparativa de proteína con actividad HDC, de potencial aplicación, como se ha mencionado anteriormente, en el desarrollo farmacéutico de nuevos productos inhibidores de la biosíntesis de histamina o la caracterización funcional de la enzima.

La fusión es también una fuente de proteína HDC recombinante activa no fusionada a GST. Así por ejemplo, 20 ml de sobrenadante de un extracto de cGST-rHDC1/512 (400 ml de cultivo) se sometieron a cromatografía en columna de glutation-Sepharose y el eluido (800 μ l) se trató con factor Xa (Boehringer Mannheim) (50 ng Factor Xa por cada 5 μ g de proteína recombinante, durante 120 min, y 25°C en tampón Xa (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8,0). La actividad detectada en 10 μ l del producto de digestión fue de 200.000 dpm/mg proteína, actividad también muy superior a la que puede detectarse de una fuente natural. No obstante, como consecuencia del tratamiento proteolítico, la cantidad de proteína HDC (53 kDa) se veía muy disminuida respecto a la cantidad inicial de polipéptido de fusión, y aparecían nuevas bandas de peso molecular inferior producto de una proteólisis no específica en zonas internas de la secuencia de HDC. Aunque la secuencia de HDC no presenta un motivo consenso de hidrólisis por la proteasa Xa, probablemente la preparación comercial de factor Xa contenga otras proteasas contaminantes que actúan sobre el polipéptido de HDC. Casos similares con otras proteínas han aparecido en la bibliografía utilizando este sistema de expresión procariota.

Para la obtención de un suero capaz de efectuar el inmunoreconocimiento de HDC, el proceso de obtención de la fusión GST-rHDC1/512 descrito anteriormente se amplió a una escala de 400 ml de cultivo bacteriano. Mediante electroforesis preparativa desnaturalizante en gradiente 5-10 % de acrilamida se separó el polipéptido de fusión de 79 kDa. El trozo de gel correspondiente a ese peso molecular (2 g de gel que contenía aproximadamente 2,4 mg de proteína), junto con 1 ml de coadyuvante completo de Freund, se sonicaron hasta conseguir una emulsión estable, y se inyectaron subcutáneamente en el lomo de un conejo de raza Nueva Zelanda. A los 30 días, tuvo lugar una segunda sensibilización del animal, esta vez utilizando 1 ml de coadyuvante incompleto de Freund y otros 2,4 mg de proteína GST-HDC1/512 incluida en poliacrilamida. Transcurridos 10 días desde la segunda inmunización, los animales se sangraron para probar la inmunoreactividad del suero. El suero se obtuvo por los métodos habituales que implican la centrifugación a baja velocidad tras facilitar la coagulación sanguínea.

Este suero se sometió a una doble prueba, encaminada a detectar si los anticuerpos reconocían, tanto a la proteína de fusión, como a la proteína no fusionada a GST expresada por una fuente alternativa (expresión *in vitro*). Además quisimos comprobar que el suero reconocía tanto a la proteína nativa como a la proteína desnaturalizada en extractos crudos.

Para probar el suero anti GST-HDC en inmunotransferencia se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS/PAGE) (figura 3) con las siguientes muestras: bacterias expresando cGST-rHDC1/512 (calles 2 y 6), la fusión GST-rHDC 1/512 (calles 3 y 7) y la GST no fusionada (calle 4), todas ellas purificadas por afinidad, extractos procedentes de fibroblastos BALB/c 3T3 (calles 1 y 5), como controles negativos se utilizaron estas dos últimas muestras. Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa según el protocolo descrito por Harlow y Lane [Antibodies: a laboratory manual. (1988) Cold Spring Harbor Laboratory]. Posteriormente los filtros se saturaron incubándolo durante 1 hora con PBS suplementado con Tween-20 0,1 % y leche en polvo desnatada al 5 %. Seguidamente los filtros se incubaron con diluciones del suero anti GST-HDC (1/1000 y 1/5000) hechas en PBS suplementado con Tween-20 al 0,1 % y albúmina bovina al 2 % (figura 3). Puede observarse que la dilución 1/5000 del suero es capaz de reconocer el polipéptido de fusión purificado de 79 kDa minimizando el ruido de fondo debido a hibridaciones inespecíficas. En los extractos de GST (calle 4) o en los extractos de células 3T3 (donde no se espera expresión de proteína HDC) no se observaron señales algunas de 79 kDa a dilución 1/5000.

Por otra parte, con objeto de probar la capacidad del suero de inmunoprecipitar selectivamente proteína HDC en extractos eucariotas, se procedió a la expresión *in vitro* del plásmido pX-HDC utilizando como sistema de expresión el preparado comercial TnT de Promega, que contiene un lisado crudo de reticulocitos de conejo. El plásmido pX-HDC contiene el clon HDC 2.3 descrito por Joseph y colaboradores [Proc. Natl. Acad. Sci., (1990) USA, 87: 733-737]. Este clon, traducido *in vitro*, codifica los aminoácidos 17 al 656 de la HDC de rata, un polipéptido no fusionado a GST mayor que el empleado

para la obtención del suero. En ese sistema, la cantidad de proteína expresada en una hora es tan baja respecto a la cantidad de proteínas totales presentes en los reticulocitos, que no se puede detectar por anticuerpos específicos en experimentos de inmunotransferencia ("Western"). La única forma de visualizar el polipéptido expresado *in vitro* es mediante marcaje del péptido sintetizado de *nov*o por la incorporación de ^{35}S -Met.

Se procedió a la inmunoprecipitación de la proteína rHDC 17/656 expresada *in vitro* y marcada con ^{35}S -Met; para ello se tomaron alícuotas de 5 μl de la reacción TnT y se incubaron durante 3 horas con distintos volúmenes del suero anti-fusión GST-rHDC1/512 (0.5, 1, 2 y 3 μl). En paralelo, se tomó el mismo volumen de una reacción de expresión *in vitro* de ornitina descarboxilasa de rata, como control, y se procedió también a su incubación con 3 μl del mismo suero anti-fusión. Finalizada la incubación de los extractos con el suero anti-fusión, se añadieron 40 μl de Proteína A-agarosa (Boehringer Mannheim), y se realizó una incubación adicional durante otros 60 min. Posteriormente los precipitados de antígenos-anticuerpos-Proteína A se lavaron 6 veces mediante centrifugación a 350 g. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 20 μl de tampón de carga SDS-PAGE (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% (v/v), DTT 0.2 M, azul de bromofenol 0,02%) y se desnaturalizaron a 95-100°C durante 5 minutos. Las muestras desnaturalizadas se cargaron en un gel de electroforesis desnaturalizante, en el orden que se especifica en la figura 4A, donde la cantidad de μl indica el volumen de suero utilizado, y las siglas superiores indican la enzima que se utilizó como antígeno en cada caso. La imagen es el resultado de la fluorografía realizada sobre los geles, aprovechando la emisión beta de los antígenos marcados con ^{35}S . La intensidad de las bandas indica, por tanto, la cantidad de proteína (HDC u ODC) que ha sido inmunoprecipitada por el anticuerpo. Los resultados de las bandas 73 y 51 kDa de la figura 4A (correspondientes a los teóricos pesos moleculares de los monómeros de HDC y ODC, respectivamente) cuantificados mediante densitometría se muestran en la figura 4B. Un microlitro de suero anti-fusión son suficientes para inmunoprecipitar el polipéptido rHDC17/656 presente en un extracto eucariota, donde el polipéptido HDC supone un porcentaje mínimo de la proteína total, al igual que ocurre en cualquier célula de mamífero, incluso en las mejores condiciones de expresión de HDC. Como puede observarse en la calle correspondiente a la inmunoprecipitación de ODC con el suero anti-fusión, el ruido de fondo causado por los anticuerpos es mínimo sobre la muestra compleja que supone el extracto de reticulocitos de conejo.

Estos resultados nos indican que estos anticuerpos podrían utilizarse en protocolos de inmunoprecipitación e inmunolocalización de HDC *in vivo*, y para el desarrollo de preparados comerciales para la detección de enzima mediante técnicas de radioinmunoensayo y ELISA.

El coste total estimado para la obtención de 200 ml de suero inmune (en la escala descrita anteriormente) es inferior a las 20.000 pts. La obtención del polipéptido de fusión (antígeno) necesario para la inmunización (desde que comienza el crecimiento bacteriano) no requiere más de 48 horas. Por el contrario, una purificación convencional a partir de una fuente naturales un proceso mucho más laborioso que debe prolongarse durante varios días consecutivos. Además, el crecimiento del material de partida original (tejidos animales o crecimiento del cultivo de las células eucariotas) consume como mínimo varios días. El tiempo de obtención de anticuerpos viene determinado por el protocolo de inmunización 40-45 días. Este tiempo es independiente de la fuente de obtención del antígeno. El coste del material de partida o medios de cultivo es también muy diferente en ambos casos. El precio de un litro de cultivo bacteriano, puede estimarse en menos de 100 pts incluyendo el IPTG añadido, mientras que el precio del número de fetos (o litros de cultivo) necesarios para obtener una cantidad equivalente de antígeno puede alcanzar varias decenas de miles de pesetas.

Explicación de las figuras

Figura 1. Esquema de la estrategia utilizada para la clonación en pGEX-3X del inserto rHDC1/512, lo que da como resultado el plásmido recombinante pGEX-3X-rHDC1/512.

Figura 2. Resultado de la expresión de la fusión en un cultivo de cGST-rHDC 1/512. La fotografía corresponde al resultado de una electroforesis desnaturalizante convencional en gel de poliacrilamida y SDS, en la que se habían cargado 5 μl de sedimento o material no soluble obtenido tras la lisis bacteriana (calle 1), 5 μl de sobrenadante o material soluble obtenido tras la lisis bacteriana (calle 2), así como el resultado de la purificación por cromatografía de afinidad a glutation-Sepharose (calle 3), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Pharmacia Biotech). Las proteínas se tiñeron con Azul de Coomassie R-250.

Figura 3. Resultado de una electroforesis desnaturalizante (SDS/PAGE), para probar el suero anti GST-HDC en inmunotransferencia, con las siguientes muestras:

ES 2 135 350 A1

- bacterias expresando cGST-rHDC1/512 (calles 2 y 6)
- fusión GST-rHDC 1/512 (calles 3 y 7)
- GST no fusionada (calle 4)
- Extractos procedentes de fibroblastos BALB/c 3T3 (calles 1 y 5)

Figura 4. Inmunoprecipitación de la proteína rHDC 17/656, expresada *in vitro*, marcada con ^{35}S -Met y separada por electroforesis desnaturalizante.

A. Imagen resultante de la fluorografía realizada sobre los geles, aprovechando la emisión beta de los antígenos marcados con ^{35}S . La cantidad de μl indica el volumen de suero utilizado, y las siglas superiores indican la enzima que se utilizó como antígeno en cada caso.

La intensidad de las bandas indica, por tanto, la cantidad de proteína (HDC u ODC) que ha sido inmunoprecipitada por el anticuerpo.

B. Cuantificación de las bandas inmunoprecipitadas por el suero anti GST-HDC

Lista de secuencias

ID.SEC.nº 1. Información de la secuencia

Longitud: 1564 pares de bases

Tipo: ácido nucleico (DNA)

Número de hebras: doble

Tipo de molécula: DNA complementario (cDNA)

Origen: Ratus norvegicus

Característica:

Zona codificante: 14 - 1549

Sitios de restricción BamHI: 6 - 11; 1552 - 1557

Otra información: clon de cDNA truncado de la histidina descarboxilasa de rata

Descripción de la secuencia:

```

GATTTCGATC CCT ATG ATG GAG CCC AGT GAA TAC CAT GAA TAC CAA GCT AGA GGG AAA GAG      61
      Met Met Glu Pro Ser Glu Tyr His Glu Tyr Gln Ala Arg Gly Lys Glu
      1              5              10              15
ATG GTG GAT TAC ATC TGC CAG TAC CTG AGC ACC GTG CGG GAG AGG CAG GTG ACC CCA AAT      121
Met Val Asp Tyr Ile Cys Gln Tyr Leu Ser Thr Val Arg Glu Arg Gln Val Thr Pro Asn
      20              25              30              35
GTG AAG CCT GGG TAC CTG CGA GCC CAG ATA CCT TCA AGT GCT CCT GAG GAA CCC GAC AGC      181
Val Lys Pro Gly Tyr Leu Arg Ala Gln Ile Pro Ser Ser Ala Pro Glu Glu Pro Asp Ser
      40              45              50              55
TGG GAT AGC ATC TTT GGG GAC ATT GAG CAA ATC ATC ATG CCT GGG GTG GTT CAC TGG CAG      241
Trp Asp Ser Ile Phe Gly Asp Ile Glu Gln Ile Ile Met Pro Gly Val Val His Trp Gln
      60              65              70              75

```


ES 2 135 350 A1

	AGC CCC CAC ATG CAC GCC TAC TAT CCG GCT CTC ACC TCT TGG CGA TCC CTG CTA GGA GAT	301
	Ser Pro His Met His Ala Tyr Tyr Pro Ala Leu Thr Ser Trp Arg Ser Leu Leu Gly Asp	
5	80 85 90 95	
	ATG CTG GCT GAT GCC ATC AAC TGC TTG GGG TTC ACG TGG GCT TCC AGC CCG GCC TGC ACA	361
	Met Leu Ala Asp Ala Ile Asn Cys Leu Gly Phe Thr Trp Ala Ser Ser Pro Ala Cys Thr	
10	100 105 110 115	
	GAG CTG GAG ATG AAC ATC ATG GAC TGG CTG GCG AAG ATG CTG GGG CTC CCG GAC TTC TTC	421
	Glu Leu Glu Met Asn Ile Met Asp Trp Leu Ala Lys Met Leu Gly Leu Pro Asp Phe Phe	
15	120 125 130 135	
	CTG CAC CAC CAT CCC AGC AGC CAG GGG GGA GGC GTC TTG CAG AGG ACT GTC AGC GAA TCC	481
	Leu His His His Pro Ser Ser Gln Gly Gly Gly Val Leu Gln Arg Thr Val Ser Glu Ser	
20	140 145 150 155	
25	ACT TTA ATT GCC CTG CTG GCA GCA AGG AAG AAC AAA ATC CTA GAA ATG AAA GCG CAT GAG	541
	Thr Leu Ile Ala Leu Leu Ala Ala Arg Lys Asn Lys Ile Leu Glu Met Lys Ala His Glu	
	160 165 170 175	
30	CCC AAT GCT GAT GAG TCC TCT CTG AAC GCT CGT CTT GTT GCC TAT GCC TCT GAC CAG GCT	601
	Pro Asn Ala Asp Glu Ser Ser Leu Asn Ala Arg Leu Val Ala Tyr Ala Ser Asp Gln Ala	
	180 185 190 195	
35	CAC TCT TCA GTG GAG AAG GCT GGC TTG ATT TCC CTT GTG AAG ATC AAA TTT CTG CCT GTG	661
	His Ser Ser Val Glu Lys Ala Gly Leu Ile Ser Leu Val Lys Ile Lys Phe Leu Pro Val	
	200 205 210 215	
40	GAC GAC AAC TTC TCA CTC CGA GGA GAA GCT CTC CAG AAG GCC ATC GAG GAA GAC AAG CAA	721
	Asp Asp Asn Phe Ser Leu Arg Gly Glu Ala Leu Gln Lys Ala Ile Glu Glu Asp Lys Gln	
	220 225 230 235	
45	CAG GGC TTG GTG CCT GTG TTT GTC TGT GCA ACC TTA GGG ACC ACT GGA GTC TGT GCA TTT	781
	Gln Gly Leu Val Pro Val Phe Val Cys Ala Thr Leu Gly Thr Thr Gly Val Cys Ala Phe	
	240 245 250 255	
50	GAC AAG CTG TCA GAG CTG GGG CCC ATC TGT GCC AGG GAG GGA CTG TGG CTC GCC GTC GAT	841
	Asp Lys Leu Ser Glu Leu Gly Pro Ile Cys Ala Arg Glu Gly Leu Trp Leu Ala Val Asp	
	260 265 270 275	
55	GCT GCT TAT GCA GGA ACA GCC TTT CTG CGC CCT GAG CTC CGG GGC TTC CTG AAG GGC ATT	901
	Ala Ala Tyr Ala Gly Thr Ala Phe Leu Arg Pro Glu Leu Arg Gly Phe Leu Lys Gly Ile	
	280 285 290 295	
60		

ES 2 135 350 A1

	GAG TAC GCC GAC TCC TTC ACC TTT AAC CCT TCC AAG TGG ATG ATG GTG CAC TTT GAC TGC	961
	Glu Tyr Ala Asp Ser Phe Thr Phe Asn Pro Ser Lys Trp Met Met Val His Phe Asp Cys	
5	300 305 310 315	
	ACT GGG TTC TGG GTC AAG GAC AAG TAC AAG CTA CAG CAG ACC TTC AGT GTG AAC CCC ATC	1021
	Thr Gly Phe Trp Val Lys Asp Lys Tyr Lys Leu Gln Gln Thr Phe Ser Val Asn Pro Ile	
10	320 325 330 335	
	TAC CTC AGA CAT GCG AAC TCT GGT GTC GCC ACT GAC TTC ATG CAT TGG CAG ATC CCC TTG	1081
	Tyr Leu Arg His Ala Asn Ser Gly Val Ala Thr Asp Phe Met His Trp Gln Ile Pro Leu	
15	340 345 350 355	
	AGC CGG CGC TTT CGC TCC ATT AAG CTG TGG TTT GTG ATT CGG TCC TTC GGG GTG AAG AAT	1141
	Ser Arg Arg Phe Arg Ser Ile Lys Leu Trp Phe Val Ile Arg Ser Phe Gly Val Lys Asn	
20	360 365 370 375	
	CTT CAA GCA CAT GTC AGA CAC GGT ACA GAC ATG GCT AAA TAC TTT GAA TCT CTA GTC AGG	1201
	Leu Gln Ala His Val Arg His Gly Thr Asp Met Ala Lys Tyr Phe Glu Ser Leu Val Arg	
25	380 385 390 395	
30	AGC GAC CCT GTT TTC GAA ATT CCT GCT GAG AGG CAC CTT GGT CTG GTG GTT TTT CGT CTG	1261
	Ser Asp Pro Val Phe Glu Ile Pro Ala Glu Arg His Leu Gly Leu Val Val Phe Arg Leu	
	400 405 410 415	
35	AAG GGT CCC AAC TGT CTC ACA GAA AGT GTG TTA AAG GAA ATA GCC AAA ACT GGC CAG GTC	1321
	Lys Gly Pro Asn Cys Leu Thr Glu Ser Val Leu Lys Glu Ile Ala Lys Thr Gly Gln Val	
	420 425 430 435	
40	TTC CTC ATC CCA GCC ACT ATC CAG GAC AAG CTG ATC ATC CGT TTC ACC GTC ACG TCC CAG	1381
	Phe Leu Ile Pro Ala Thr Ile Gln Asp Lys Leu Ile Ile Arg Phe Thr Val Thr Ser Gln	
	440 445 450 455	
45	TTC ACC ACC AAG GAT GAC ATC CTG AGA GAT TGG AAC CTC ATC CGA GAG GCT GCT AAC CTT	1441
	Phe Thr Thr Lys Asp Asp Ile Leu Arg Asp Trp Asn Leu Ile Arg Glu Ala Ala Asn Leu	
	460 465 470 475	
50	GTC CTG AGC CAG CAC TGC ACT TCT CAG CCG AGC CCT CGG GCC AAG AAC CTT ATT CCA CCG	1501
	Val Leu Ser Gln His Cys Thr Ser Gln Pro Ser Pro Arg Ala Lys Asn Leu Ile Pro Pro	
	480 485 490 495	
55	CCG GTG ACC AGA GAC TCC AAA GAC CTG ACC AAT GGG CTA TCC CTG GAG TAG GATCCTGAGG	1562
	Pro Val Thr Arg Asp Ser Lys Asp Leu Thr Asn Gly Leu Ser Leu Glu *	
	500 505 510	
60	GA	1564

REIVINDICACIONES

1. Los anticuerpos policlonales obtenidos a partir de la proteína de fusión GST-rHDC1/512, que reconocen como antígeno a la HDC de rata en su forma nativa y desnaturalizada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

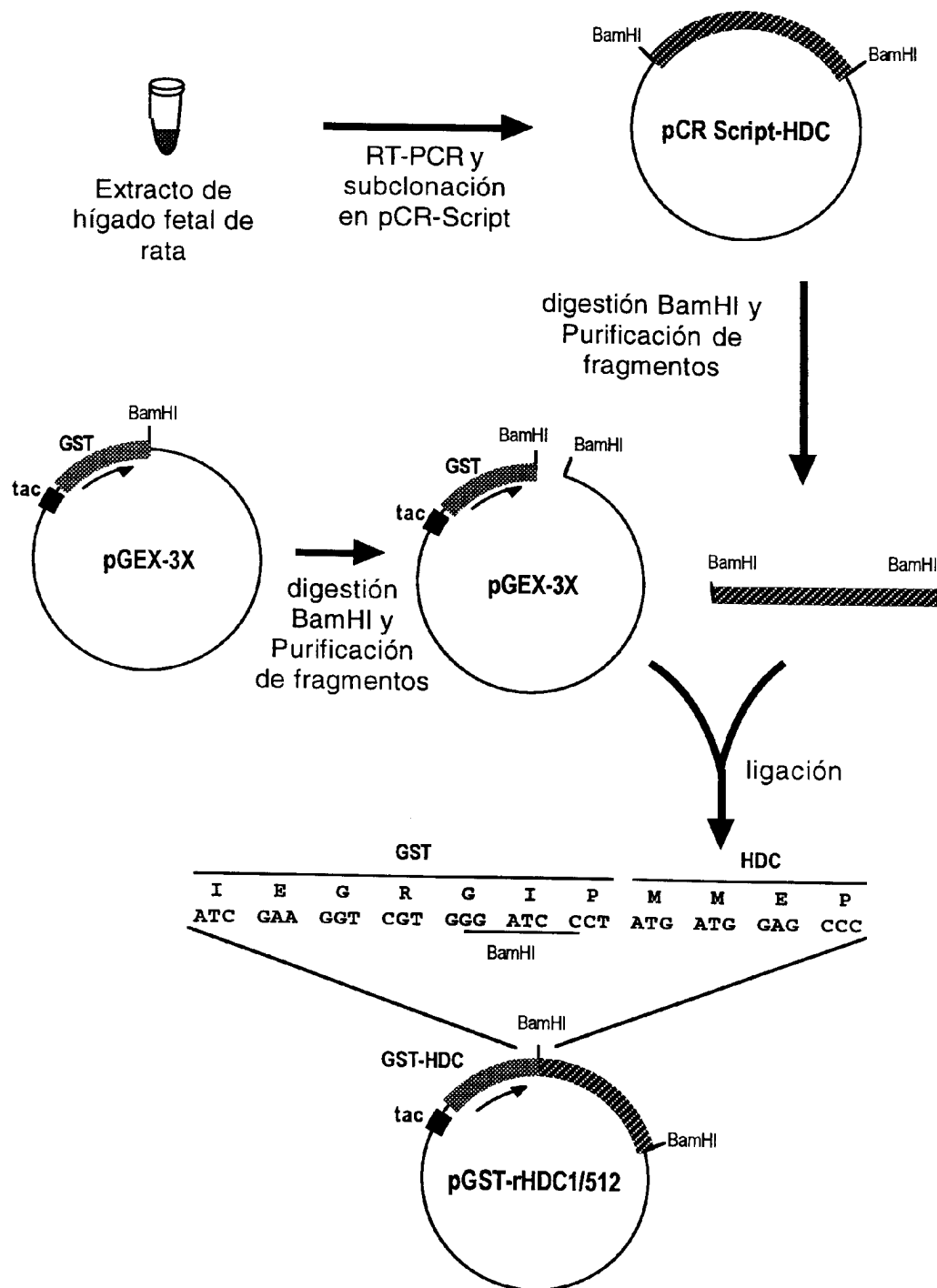


Figura 1

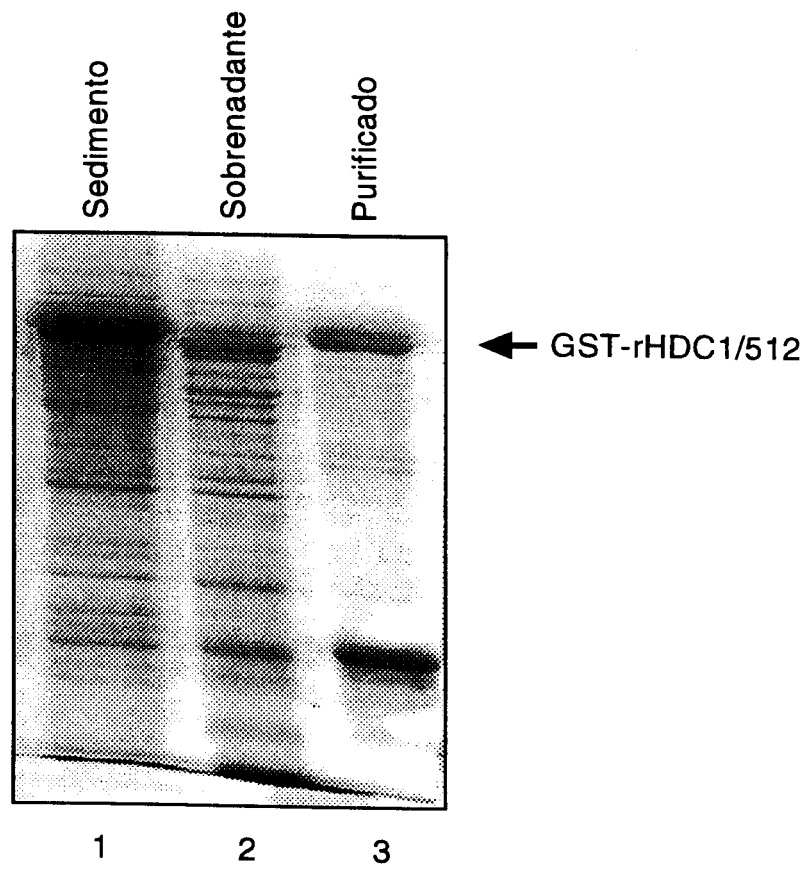


Figura 2

ES 2 135 350 A1

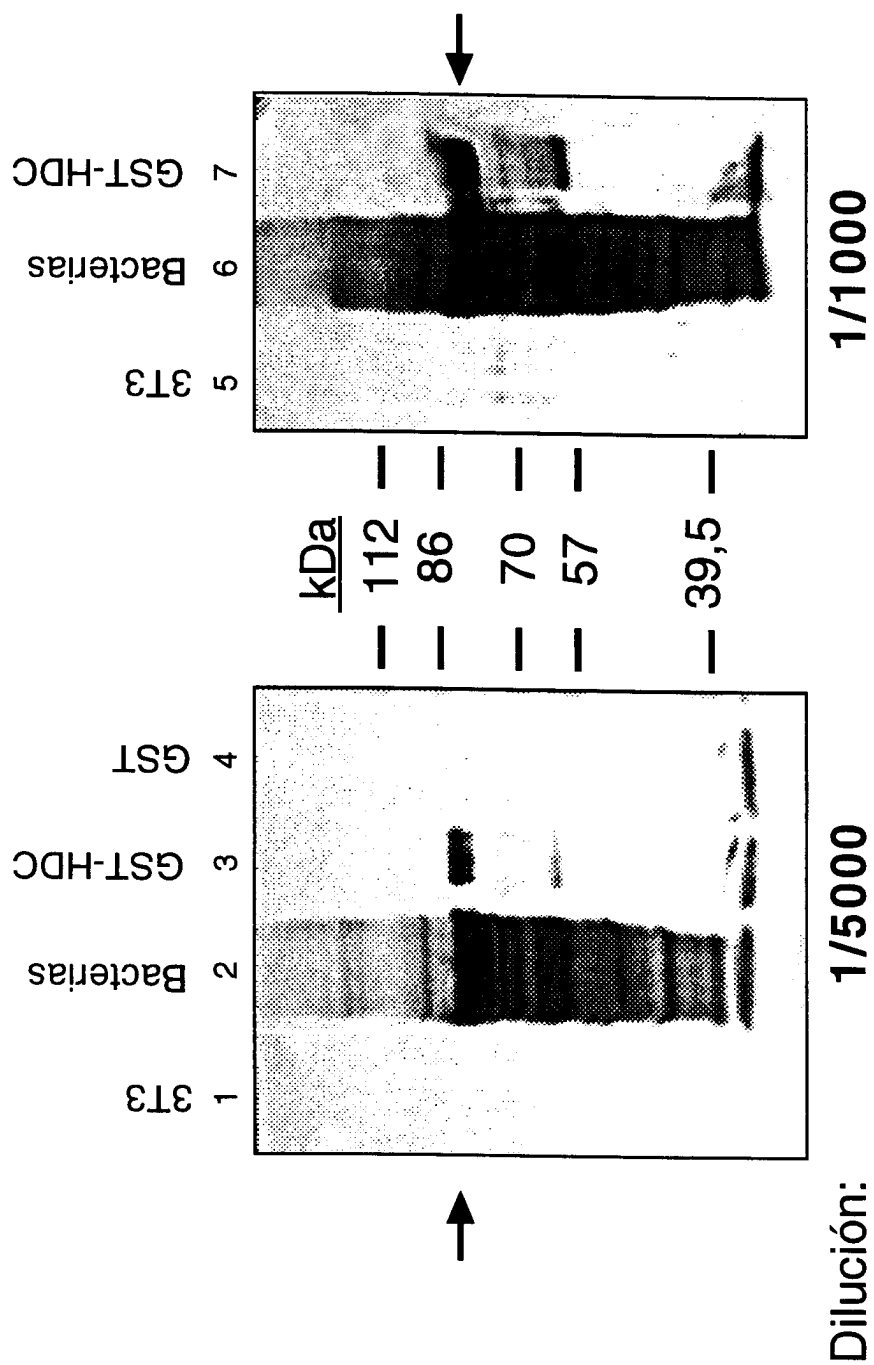


Figura 3

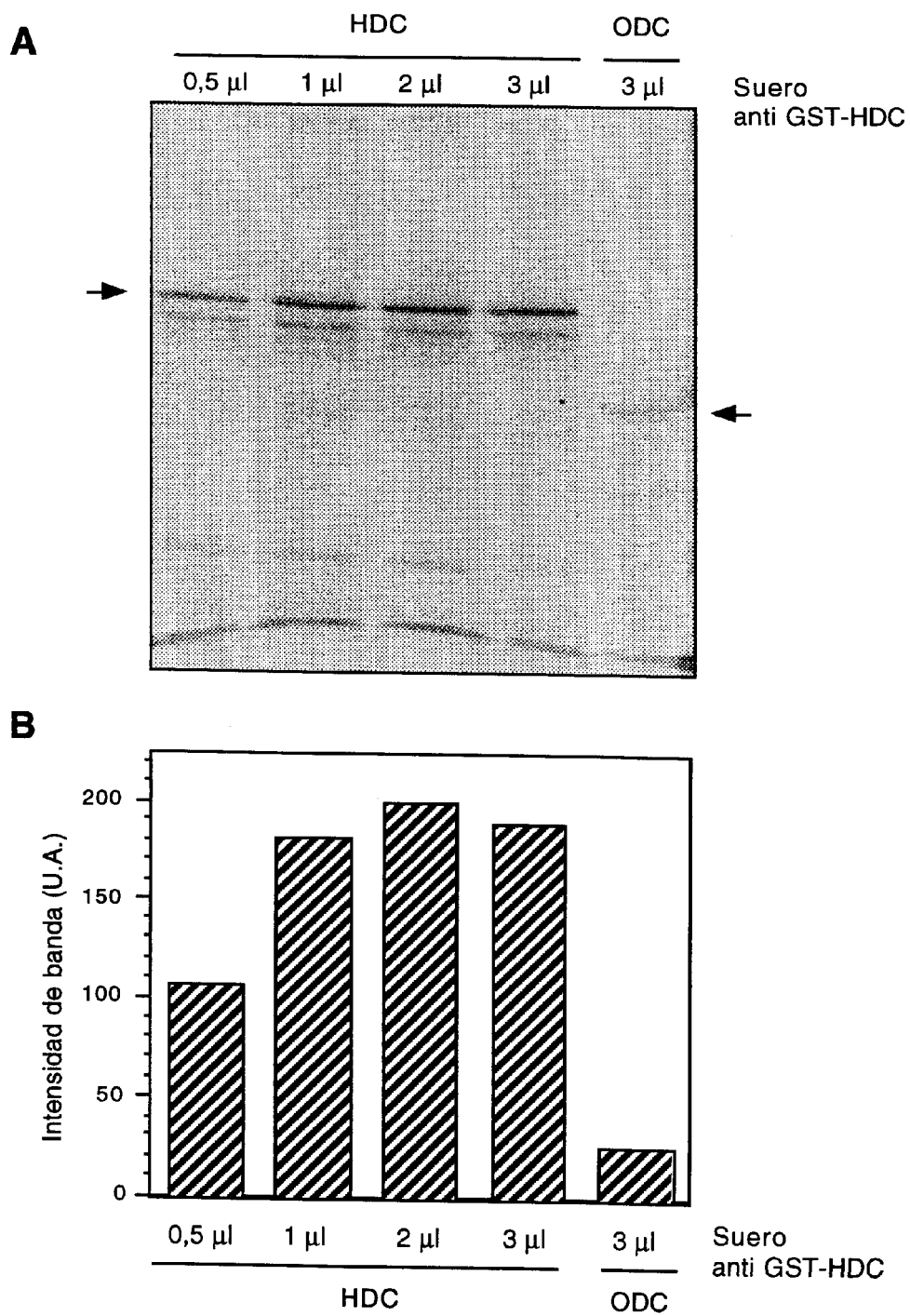


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 135 350
⑫ N.º solicitud: 9800019
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 08.01.98
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12N 9/88, 9/96, A61K 38/51

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 5654176 A (SMITH, D.B.) 05.08.1997, página 2, línea 62 - página 3, línea 15; página 4, líneas 28-30; página 11, línea 40 - página 13, línea 17.	1
Y	JOSEPH, D.R. et al. "Characterization and expression of the complementary DNA encoding rat histidine decarboxylase". Sept. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 87 (18), páginas 734-736.	1
A	BRUNEAU, G. et al. "Preparation of a rat brain histidine decarboxylase (HDC) cDNA probe by PCR and assignment of the human HDC gene to chromosome 15". Nov. 1992. HUMAN GENETICS, Vol. 90 (3), páginas 235-8.	1
A	YAMAMOTO, J. et al. "Expression and characterization of recombinant mouse mastocytoma histidine decarboxylase". Dic. 1993. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. Vol. 1216 (3), páginas 431-40.	1

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 n.º:

Fecha de realización del informe
06.07.99

Examinador
A. Collados Martín Posadillo

Página
1/1