



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 186 469**

⑫ Número de solicitud: 200000990

⑤① Int. Cl.⁷: C12N 15/85
C12N 5/10

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **14.04.2000**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2003**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2003

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

⑦② Inventor/es: **Alonso Carrión, Francisco José;**
Márquez Gómez, Francisco Javier y
Segura Checa, Juan Antonio

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Células tumorales viables modificadas genéticamente, para inhibir parcialmente la expresión del enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) y su aplicación como vacuna antitumoral.**

⑤⑦ Resumen:

Células tumorales viables modificadas genéticamente, para inhibir parcialmente la expresión del enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) y su aplicación como vacuna antitumoral.

Se describe un procedimiento para la estimulación del sistema inmunológico de animales, al utilizar como vacuna células tumorales viables pero modificadas genéticamente por técnicas de antisentido. Dicha manipulación genica va dirigida, en concreto, a inhibir la expresión de un enzima que es clave en la supervivencia, proliferación y manifestación de propiedades fenotípicas de todas las células tumorales: el enzima mitocondrial glutaminasa activada por fosfato (PAG). Con este procedimiento se consigue generar inmunidad a largo plazo frente a cánceres murinos y se posibilita la potencial utilización del animal inmunizado, como modelo de experimentación biológica. Esta invención encuadra dentro del campo de la inmunoterapia tumoral.

ES 2 186 469 A1

DESCRIPCION

Células tumorales viables modificadas genéticamente, para inhibir parcialmente la expresión del enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) y su aplicación como vacuna antitumoral.

5 **Campo de la técnica**

Esta invención se encuadra dentro del campo de la inmunoterapia tumoral. Describe un procedimiento con el que se consigue generar inmunidad a largo plazo frente a cánceres murinos y posibilita la potencial utilización del animal inmunizado, como modelo de experimentación biológica. Se trata de la estimulación del sistema inmunológico del animal, al utilizar como vacuna células tumorales viables pero modificadas genéticamente por técnicas de antisentido. Dicha manipulación génica va dirigida, en concreto, a inhibir la expresión de un enzima que es clave en la supervivencia, proliferación y manifestación de propiedades fenotípicas de todas las células tumorales: el enzima mitocondrial glutaminasa activada por fosfato (PAG); (EC 3.5.1.2) (Curthoys, N. P. y Watford, M. (1995), *Annu Rev Nutr.*15: 133-59).

15 **Antecedentes**

Las células tumorales se han descrito como “trampas de nitrógeno”, ya que consumen ávidamente aminoácidos, tanto esenciales como no-esenciales, procedentes del animal portador del tumor. Esta situación produce en éste un desgaste continuo de sus reservas proteicas que explica, en parte, la aparición de caquexia. La glutamina es el aminoácido más abundante del plasma y el principal vehículo no tóxico de nitrógeno entre los diferentes tejidos de los mamíferos; es, también, la principal fuente nitrogenada que las células tumorales reciben del huésped por lo que juega un papel clave en su metabolismo (Medina, M. A. et al. (1992), *Mol. Cell Biochem.* 113: 1-15).

La reacción de hidrólisis que convierte a la glutamina en glutamato y amonio, catalizada por el enzima PAG, constituye el primero y más importante de los pasos del proceso glutaminolítico. Muchos datos experimentales ponen de manifiesto el papel fundamental de este enzima en el control de los procesos proliferativos de células tumorales y tejidos de rápido crecimiento, y una estrecha relación entre su nivel de expresión y la malignidad de la célula tumoral (Souba, W. W. (1993), *Ann. Surg.* 218: 715-28).

Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio empleando varias líneas celulares de tumores humanos, confirman la existencia de una clara correlación entre los niveles de actividad PAG y la tasa de proliferación celular. La máxima actividad enzimática se alcanza al iniciarse la fase exponencial de crecimiento; esto es, cuando las células comienzan a dividirse activamente y tienen requerimientos energéticos y de precursores biosintéticos más elevados. Además, tanto en tumores experimentales, carcinoma ascítico de Ehrlich, como en células de cáncer de mama cultivadas *in vitro*, hemos comprobado, que la mayor actividad catalítica PAG coincide con una más elevada expresión de los niveles del ARNm de glutaminasa (Aledo, J. et al. (1994), *FEBS Lett.* 341: 39-42). Estos resultados sugieren una regulación a largo plazo del enzima mediante expresión génica diferencial, que permite su máxima expresión cuando las células están en fase exponencial de crecimiento, en coincidencia con los máximos requerimientos de nitrógeno.

Uno de los abordajes experimentales más fructíferos que la Biología Molecular ha introducido con el fin de analizar el papel que una enzima desempeña en la célula, se basa en interferir la expresión de su gen con moléculas antisentido (Antisense ARN and ARN (1992), Murray H. ed. Willey Liss, NY). La estrategia antisentido mas frecuente consiste en intentar bloquear parcial o totalmente el proceso normal de traducción del ARN mensajero que codifica a la proteína diana y luego analizar sus consecuencias. Como antisentidos, se utilizan secuencias nucleotídicas que hibridan con el ARNm blanco, ya sean oligonucleótidos de ADN, o ARN generados en la célula tras ser transfectadas con las construcciones génicas adecuadas. Esta última estrategia, dirigida al enzima PAG como gen diana, nos ha permitido corroborar la estrecha relación entre actividad PAG y proliferación de células tumorales, así como poner de manifiesto el importante papel que este enzima juega en la expresión de las propiedades fenotípicas asociadas a las mismas. Así, cuando se transfectan células de carcinoma ascítico de Ehrlich (EATC) con construcciones génicas que expresan establemente segmentos de ARN de PAG renal de rata en antisentido y que, por lo tanto, tienen un menor nivel de expresión proteica y actividad glutaminasa, éstas experimentan, además de notables cambios morfológicos, un aumento del tiempo de duplicación, una disminución de su densidad de saturación, eficiencia de plateo y actividad telomerasa (datos no publicados). Todos estos cambios reflejan que las células que expresan los antisentidos de PAG (EATC-AS) han adquirido un estatus de mayor diferenciación, esto es, que en ellas se ha producido una clara reversión del fenotipo transformado *in vitro*. Mas aún, y en estrecha relación con el objetivo de esta patente, lo que resulta más destacable es que las células transfectadas con antisentidos pierden la capacidad, manifestada por la línea parental EATC, de generar tumores ascíticos *in vivo*, cuando son inoculadas en la cavidad peritoneal de ratones

Swiss isogénicos. Mientras los animales que han sido inoculados con 10^7 células EATC mueren, a consecuencia de la aparición del tumor ascítico, a los 16 días aproximadamente, los inoculados con un número incluso 2.5 veces superior de células EATC-AS, no desarrollan tumor y sobreviven con total normalidad.

5 Como hemos indicado, a consecuencia de la modificación génica introducida, las células EATC-AS sufren una serie de cambios fenotípicos in vitro relacionables claramente con una disminuida capacidad proliferativa. Ya que alguno de estos cambios podría haber afectado también a la antigenicidad celular, realizamos un análisis citométrico de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en el peritoneo y en el bazo de animales inoculados con células EATC, así como en animales inoculados con las
10 células EATC-AS. Puede destacarse el gran incremento en el porcentaje de células CD18 en el bazo y el de macrófagos activados F4/80+ en la cavidad peritoneal, en ratones inoculados con células EATC-AS. Estos cambios, detectados únicamente con las células EATC-AS, indican que éstas son capaces de elicitar una respuesta inmunológica en el huésped, suficientemente potente y efectiva como para rechazar el tumor. Este resultado contrasta con el obtenido al inocular con la línea parental EATC, que consigue
15 fácilmente evadir el sistema inmunológico del animal portador del tumor.

Una de las causas bien establecidas que ayudan a justificar la escasa inmunogenicidad de las células EATC, se debe a la capacidad que éstas tienen para expresar mucinas del tipo MUC-1 aberrantemente glicosiladas que, si bien son potencialmente inmunogénicas, ejercen un gran efecto inhibitorio sobre la
20 activación de las células T (Chan, A. K. et al. (1999), Int. J. Cancer. 82: 721-6; Viñuela, J. et al. (1991), Int. J. Cancer. 47:86-91). El análisis por Western blot de MUC-1, muestra una fuerte expresión de la glicoproteína en células de la línea parental EATC, mientras que ésta es indetectable en las células EATC-AS. La expresión de MUC-1 está relacionada también con la menor capacidad de adhesión de las células tumorales tanto in vitro como in vivo. La pobre expresión de MUC-1 en las células EATC-AS
25 podría justificar los cambios morfológicos observados y su patrón de crecimiento in vitro, claramente diferente al de la línea parental EATC.

Otra propiedad que posibilita a las células EATC y a otros tumores escapar al sistema inmunológico del animal portador es la elevada expresión de la actividad N-acetil- α -D-galactosaminidasa (Yamamoto, N. et al. (1996), Cancer Res. 56: 2827-31). Esta enzima bloquea al factor estimulante de macrófagos (MAF) desglucosilando a su precursor, la proteína de unión a vitamina D (vitamine D binding-protein). Medida esta actividad enzimática en células EATC-AS encontramos un valor que representa tan solo el 14 % del correspondiente a la línea parental EATC. Esto justificaría la gran cantidad de macrófagos
30 hallados en la cavidad peritoneal de animales inoculados. con las células EATC-AS y la consiguiente eliminación del tumor.
35

En resumen, el menor nivel de expresión tanto de MUC-1 como de N-acetil- α -D-galactosaminidasa pueden considerarse alguno de los cambios fenotípicos que, junto a otros aún por estudiar, podrían justificar que las células EATC-AS muestren un nivel de antigenicidad mucho mayor que la línea parental EATC.
40

La respuesta inmunológica generada en animales inoculados con células que expresan antisentidos de PAG se ejerce, además, a largo plazo y es tan eficaz que éstos adquieren incluso capacidad para rechazar posteriores inoculaciones de células de la línea parental EATC. Puede decirse, entonces, que después de haber inoculado al animal con las células EATC-AS queda protegido o si se quiere “vacunado” contra el
45 tumor.

Como se deduce de lo expresado anteriormente, muchos tumores tienen capacidad para escapar al sistema inmunológico del huésped para lo cual utilizan diferentes mecanismos (Möller (1980), Immunol. Rev. 51). No es de extrañar, por tanto, que una de las estrategias terapéuticas de lucha contra la aparición y progresión tumoral se oriente a buscar formas con las que potenciar el sistema inmunológico del animal portador del tumor. En esta línea, una de las aproximaciones con las que se ha tenido más éxito, al menos en modelos de experimentación animal, ha sido el empleo de células modificadas genéticamente para adquirir capacidad de expresar neo-antígenos de tumor, citoquinas, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y/o moléculas coestimuladoras, que eliciten una respuesta inmunológica positiva y potente (Suh K.W. et al. (1999), J. Surg. Oncol., 72(4): 218-24; Ostrand-Rosenberg, S. et al. (1999), Immunol. Rev. 170: 101-14; Borrello, I. et al. (1999), Hum. Gene Ther.10(12): 1983-91); Simons, J. W. et al. (1999), Cancer Res. 59(20): 5160-8); Sun, Y. et al. (1999), J. Mol. Med., 77(8): 593-608; Baskar, S. (1996), Cancer Immunol. Immunother. 43(3): 165-73; Linehan, D. C. et al. (1996), Ann. Surg. Oncol. 3(2): 219-28; Cai, Q. et al. (1995), Cancer Gene Ther. 2(2): 125-36; Zatloukal, K. et al. (1993).
50 Gene 135(1-2): 199-207). El objetivo, quizás utópico, de todos estos procedimientos es pues, conseguir una vacuna que permita al animal defenderse frente a la aparición de un tumor concreto, rechazarlo y/o evitar la aparición de metástasis.
60

Con frecuencia, las células que se manipulan genéticamente son las propias células responsables de la aparición del tumor, irradiadas o sometidas a otros tratamientos con el fin de anular su capacidad proliferativa. Sin embargo, estos métodos para inhibir la replicación celular también inhiben, en muchos casos de manera muy específica, la inmunogenicidad celular (Sella et al. (1989), Clin. Exp. Metástasis. 7: 97-105). En otras ocasiones, se han intentado utilizar alternativamente, preparaciones a base de membranas de células tumorales, pero tampoco con estos métodos suele producirse una adecuada respuesta inmune. Por consiguiente, es claramente muy ventajoso desarrollar sistemas que utilicen células tumorales inmunogénicas viables pero atenuadas adecuadamente para evitar su proliferación.

Explicación de la invención

En la línea de actuación antitumoral indicada en los párrafos anteriores puede encuadrarse la invención que se desea patentar, ya que está basada en la utilización de células tumorales viables genéticamente manipuladas, como vacuna antitumoral. La principal innovación con respecto a otros abordajes, está en el mecanismo de manipulación génica, que como se ha dicho, se basa en la expresión de antisentidos frente al enzima PAG y no en la sobre-expresión de antígenos tumorales o citoquinas estimuladoras del sistema inmune. La propia elección de la diana contra la que se dirigen los antisentidos, esto es, el enzima PAG, es esencial para el éxito de la invención, ya que como también se ha expresado, esta es una enzima muy importante en la proliferación de las células tumorales. Tras la acción de los antisentidos de PAG se consigue aumentar el grado de diferenciación de la célula tumoral; esta reversión fenotípica evita la proliferación celular in vivo, pero no es suficiente para evadir una respuesta inmunológica eficiente del animal. Es importante indicar también, que si bien la invención que se describe se circunscribe a un modelo tumoral murino, al ser la PAG un enzima clave para todas las células tumorales sin excepción, las conclusiones que hasta aquí se han extraído pudieran muy bien ser extrapolables a otros modelos animales y a tumores de diferentes orígenes y tejidos. Para poder diseñar los antisentidos y con ellos la construcción génica adecuada a transfectar, el único paso limitante sería el conocimiento de las secuencias de ADNc de las glutaminasa de las especies y tejidos en cuestión. No obstante, como lo prueba nuestro propio trabajo, la similitud completa entre el ARNm de la glutaminasa diana y los antisentidos no es necesaria para conseguir interferir eficazmente la expresión del gen. En cualquier caso, cada día son más las secuencias de glutaminasas que son conocidas y recogidas en los bancos de datos; nuestro propio grupo ha clonado recientemente la primera glutaminasa de cáncer de mama humano (Gómez-Fabre, P. M. et al. (2000), Biochem. J. 345: 365-75).

Para definir la capacidad tumorigénica celular es frecuente emplear como modelo animales que han sido inmunosuprimidos por diferentes técnicas, ejemplo de ello son los ratones desnudos. Como se dijo, los ratones que son inoculados con las células EATC-AS quedan inmunizados a largo plazo frente al tumor; por esta razón, constituyen en sí mismos un nuevo modelo de experimentación animal, que se desea proteger también bajo esta patente.

Descripción de una realización preferida

Las etapas del método descrito en la presente invención son básicamente tres:

- 1) Construcción génica de plásmidos que expresan ARN del enzima glutaminasa activada por fostato (PAG) en antisentido.
- 2) Transfección estable de células tumorales viables con las construcciones génicas obtenidas en 1).
- 3) Inoculación de las células tumorales transfectadas en los animales.

Estas etapas básicas junto con otros pasos necesarios para la aplicación del método se detallan a continuación como una forma de realización preferida.

1.- Construcción de plásmidos que expresan ARN de PAG en antisentido

Dos segmentos de ADNc de glutaminasa renal de rata (Genebank M65150), HindIII (1893)-EcoRI (1614) y EcoRI (3314)-EcoRI (1614), se obtuvieron del plásmido recombinante pGA104 (Shapiro, R. A. et al. (1991), J. Biol. Chem. 266: 18729-96) y se subclonaron en orientación antisentido detrás del promotor de citomegalovirus del vector de expresión para mamíferos pcDNA3 (Invitrogene) (figura 1) utilizando técnicas convencionales de ADN recombinante. Las construcciones resultantes fueron designadas pcDNA3-0.28 y pcDNA3-1.7, respectivamente. Las secuencias se seleccionaron en base a la similaridad encontrada entre los segmentos de ADNc que codifican para la zona C-terminal de las glutaminasas conocidas.

Para que sean eficaces los antisentidos no es necesaria una similitud completa con el ARNm diana. Más aún, dada la importancia de la PAG sobre la proliferación de la celular tumoral es incluso aconsejable que no lo sean ya que el bloqueo completo del enzima comprometería la viabilidad celular y probablemente con ello también la inmunogenicidad.

Alternativamente podrían utilizarse para llevar a cabo las construcciones génicas otros plásmidos de expresión para transfección de ADN en mamíferos ya sean comerciales o diseñados por el investigador.

2.- *Transfección de las células parentales EATC con las construcciones génicas obtenidas y evaluación fenotípica y morfo-funcional in vitro de la eficiencia de las células transfectadas que expresan ARN de glutaminasa en antisentido*

2.1. *Transfección de las células parentales EATC con las construcciones génicas obtenidas*

Entre 1-2 μg de las construcciones obtenidas anteriormente, así como del plásmido pcDNA3 vacío (control), fueron transfectados en células EATC (American Type Culture Collection) por lipofección, empleando el lípido DOSPER (Boehringer Mannheim). Las células se crecieron en medio RPMI-1640 (Sigma) con un 10 % de suero bovino fetal y antibióticos, a 37°C en una atmósfera con 5 % CO_2 /95 %. La selección de células que han adquirido los plásmidos se llevó a cabo en el medio de cultivo anterior conteniendo 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antibiótico G418. Tras 2-3 semanas se seleccionaron al azar 6 colonias neo^+ de células establemente transfectadas con cada tipo de construcción génica (células 0.28AS y 1.7AS) y el plásmido pcDNA3 (vector-control).

Alternativamente como medio para la obtención de células transfectadas establemente podría utilizarse cualquier otra técnica de transfección como las basadas en el empleo de fosfato de calcio, electroporación, polibreno, etc...

2.2. *Evaluación fenotípica y morfo-funcional in vitro de la eficiencia de las células que expresan ARN de glutaminasa en antisentido*

a) *Curvas de crecimiento celular*

El crecimiento celular in vitro de las líneas transfectadas con los antisentidos y los controles se evaluó sembrando en cada uno de los pocillos de placas de 6 pocillos, 10^4 células con 3 ml de medio de cultivo y contando con un hemocitómetro (Coulter ZM) diariamente el número resultante de células. Las células se separaron del soporte mediante tratamiento con tripsina. En la figura 2, aparecen los resultados medios obtenidos. A partir de estas curvas pueden calcularse los tiempos de duplicación de las poblaciones celulares y sus densidades de saturación que aparecen recogidos en la tabla 1. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

b) *Ensayo de formación de colonias en soporte sólido*

Se sembraron por triplicado 250 células en placas de cultivo de 80 cm^2 con 12 ml de medio de cultivo completo. Después de 15 días creciendo, las células se fijaron y tiñeron con 5 % Giemsa, efectuándose entonces el conteo de las colonias con un número de células superior a 60. Los resultados aparecen recogidos en la tabla 1.

c) *Análisis de la cantidad de proteína glutaminasa*

La determinación de la cantidad de proteína glutaminasa se llevó a cabo por Western blot.

Células que crecían exponencialmente entre un 60-80 % de confluencia fueron separadas del soporte con tripsina y precipitadas por centrifugación a 400 g. Después de ser lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS) se lisaron con buffer RIPA (30 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 % (p/v) Tritón X-100, 0.1 % (p/v) SDS y 1 % ácido deoxicólico) conteniendo además los inhibidores de proteasas, pepstatin A (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), leupeptin (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y PMSF 0.2 mM a pH 7.6. Las células lisadas fueron centrifugadas a 10^4 g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida (10 %) con SDS (SDS-PAGE). Se pincharon 25 μg de proteína por cada pocillo. Concluida la electroforesis las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Dichas membranas fueron primero incubadas con un anticuerpo policlonal antiglutaminasa renal de rata desarrollado en conejo que reconoce a la glutaminasa de EATC (Segura, J. A. et al. (1995), Protein Express. Purif. 6: 343-51) y a continuación con IgG anti-conejo de cabra marcado con avidina-peroxidasa. Finalmente, las bandas se detectaron usando diaminobenzidina como sustrato. Los resultados de tres colonias 0.28 AS aparecen en la figura 3.

d) *Ensayos de la actividad glutaminasa*

Las actividades del enzima glutaminasa activada por fosfato se determinaron como sigue: una vez separadas las células con tripsina se lavaron 3 veces con Tris/HCl a pH 8.0 y se suspendieron durante 3 h en el mismo tampón con el fin de deplecionar sustratos endógenos. El medio de reacción fue, fosfato 0.1 M, glutamina 20 mM, oligomicina 20 $\mu\text{g/ml}$ y antimicina A 20 $\mu\text{g/ml}$, para prevenir la oxidación del glutamato mitocondrial. Bajo estas condiciones la glutamina y el fosfato están a concentraciones saturantes. Para cada ensayo se emplearon 0.2 ml de suspensión celular, equivalentes a 106 células; después de 6 minutos de incubación a 37°C la reacción se paró con 0.5 ml de HCL 0.4 M. La mezcla se neutralizó con KOH y se centrifugó a 16000 g durante 5 minutos. Finalmente, el glutamato formado se determinó de acuerdo con el método de P. Lund (Method of Enzymatic Analysis, vol. 8 (Bergmeyer, H. U. ed.), pp. 357-63, Verlag-Chemie, Weinheim). Para asegurarnos que la glutaminasa era el enzima realmente ensayado se sustrajeron los valores correspondientes a muestras sin fosfato. Blancos sin muestra fueron ensayados también, en paralelo. Resultados significativos aparecen en la figura 4.

e) *Cuantificación de la expresión de MUC-1*

La cuantificación de la proteína MUC-1 en las células EATC y 0.28AS-2 se realizó por la técnica de Western blot. Las células se lisaron en la placa de cultivo con tampón de electroforesis (Tris-HCl 60 mM 6.8, SDS 2% y DTT 100 mM). Después de eliminados los restos celulares por centrifugación, las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliácridamida al 6% con SDS (SDS-PAGE) y posteriormente se transfirieron a nitrocelulosa. La detección de las bandas de MUC-1 se realizó usando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal de cabra anti MUC-1, y como secundario la porción Fab de un anticuerpo de conejo anti IgG de cabra conjugado a peroxidasa. El color se obtuvo usando diaminobencidina en la mezcla de reacción de la peroxidasa. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 5.

f) *Medida de la actividad N-acetil- α -D-galactosaminidasa*

La medida enzimática se llevó a cabo en extractos celulares preparados según el método descrito por Yamamoto et al. (1996). Se recolectaron 10^7 células (EATC y 0.28AS-2) y se homogeneizaron en frío en 3 ml de tampón Tris-HCl, pH 7.0, usando un Potter de vidrio-teflón. El homogeneizado se clarificó por centrifugación a 11000 g durante 15 min y posteriormente se realizó una precipitación fraccionada con 70% de sulfato amónico. El precipitado se disolvió en 0.5 ml de tampón citrato-fosfato 50 mM, pH 6, y se dializó frente al mismo tampón a 4°C. La actividad N-acetil- α -D-galactosaminidasa [Yagi et al. 1990] se midió a 37°C añadiendo 50 μl de la muestra dializada a 1 ml de una mezcla de reacción que contenía tampón citrato 50 mM, pH 6, y 2.5 μmoles de p-nitrofenil N-acetil- α -D-galactosamina como sustrato. Después de 60 min se paró la reacción añadiendo 100 μl de Na_2CO_3 0.5 M. Tras centrifugar, se midió la cantidad de p-nitrofenol liberado en el sobrenadante por absorción a 420 nm. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1.

g) *Medida de la actividad Telomerasa*

Los telómeros son estructuras de ADN-proteína que se encuentran en los extremos de los cromosomas eucariotas. El ADN telomérico se compone de secuencias repetitivas muy conservadas evolutivamente. Parece que los telómeros juegan un papel de protección del ADN genómico. Puesto que la ADN polimerasa α no es capaz de replicar las secuencias más extremos del ADN lineal, en cada ciclo de replicación se produce un acortamiento progresivo de las terminaciones teloméricas hasta llegar a un punto en el que es imposible la replicación. Este hecho está ligado a la capacidad proliferativa limitada de las células somáticas de eucariotas superiores (senescencia).

En contraste con las células somáticas, las células germinales son perpetuas y se requiere que preserven la información contenida en su genoma por completo. Para asegurar que así sea deben salvar los efectos resultantes del acortamiento de los telómeros. El mecanismo que desarrollan para ello consiste en la adición de secuencias teloméricas al extremo de los cromosomas por medio del enzima telomerasa.

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias TTAGGG a los extremos de los cromosomas de los vertebrados usando como molde una secuencia complementaria de ARN. Un mecanismo por el que las células tumorales escapan de las limitaciones proliferativas de la senescencia celular consiste en una reactivación de la actividad telomerasa.

La determinación de esta actividad enzimática se hizo siguiendo las instrucciones del kit de detección de actividad telomerasa mediante PCR-ELISA de Boehringer Mannheim (n° cat. 1854666). En este método la telomerasa presente en una muestra añade repeticiones teloméricas al extremo 3' de un oligonucleótido sintético (P1-ST) marcado con biotina. En un segundo paso, los productos de la elongación son amplificados por PCR, usando dos primeros, P1-ST y P2. Se obtienen así una serie de productos de PCR con incrementos específicos de 6 nucleótidos. A continuación, una alícuota de los productos de PCR se desnaturaliza e hibrida con una sonda específica para las terminaciones teloméricas, marcada con digoxigenina (DIG). Los productos resultantes se inmovilizan en una placa de ELISA recubierta de estreptavidina y pueden detectarse con un anticuerpo anti-DIG conjugado con peroxidasa (anti-DIG-POD). Finalmente, la sonda se visualiza gracias a que la peroxidasa metaboliza al sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) formando un aducto coloreado que absorbe a 450 nm. El color obtenido es proporcional a la actividad telomerasa de la muestra. Los resultados aparecen en la Tabla 1.

h) *Análisis de la morfología celular*

Como consecuencia de la transfección con construcciones génicas que expresan antisentidos PAG se producen notables cambios morfológicos. Ejemplo de ello es la figura 6 donde se muestran las células 0.28AS-2, correspondientes al clon de células empleado en los ensayos de tumorigenicidad *in vivo*, comparadas con las EATC y Vector-control (células EATC transfectadas con el plásmido pcDNA3 sin inserto).

TABLA 1

Descripción de las principales características de crecimiento de la línea 0.28AS-2 transfectadas con ADNc de PAG en antisentido

EATC: línea parental. Vector-control: células transfectadas con el plásmido pcDNA3 sin inserto. 0.28AS-2: células EATC transfectadas con la construcción pcDNA3-0.28. ^{a)} Representa el número de células en condiciones de saturación en placas de 35-mm de diámetro. ^{b)} NAG: actividad N-acetil galactosaminidasa. Las diferencias experimentales entre los dos controles usados fueron analizadas mediante U-Mann Witney; * $P < 0.05$.

Características	EATC	Vector-Control	0.28AS-2
Tiempo de duplicación (horas)	28.5 ± 1.5	28.9 ± 2.0	35.4 ± 0.8*
Densidad de saturación (10 ⁶) ^a	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.3 ± 0.1*
Eficiencia de plateo (%)	44 ± 1.0	38 ± 2.0	26 ± 2.0*
[4pt] Actividad Telomerasa (%)	100 ± 10	89.5 ± 6.8	65.6 ± 8.2*
Actividad NAG ^b (nmol/min mg)	52		7.4

3.- *Inoculación de animales con las células transfectadas evaluación de resultados*

3.1. *Ensayo de tumorigenicidad in vivo*

Para ensayar la capacidad tumorigénica, las células transfectadas con segmentos de ADNc de glutaminasa del clon 0.28AS-2 fueron inoculadas intraperitonealmente en ratones albinos hembra Swiss isólogos, de 25 g de peso aproximadamente. El crecimiento tumoral fue seguido mediante la pesada diaria de cada animal. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 7.

3.2. *Análisis de poblaciones celulares del sistema inmune*

Las diferencias encontradas en los ensayos *in vivo* entre las líneas EATC, vector-control y 0.28AS-2 son el reflejo de una diferente respuesta inmunológica del animal frente a las mismas. Para poder extraer tal conclusión se inyectaron 107 células de cada tipo a grupos de animales y se efectuó un estudio por citometría de flujo con anticuerpos específicos marcados fluorescentemente capaces de detectar las principales poblaciones celulares relacionadas con el sistema inmune del animal, tanto en el peritoneo como en el bazo. Dichas medidas se efectuaron a los 2, 4 y 7 días tras la inoculación celular. Los resultados se muestran en la figuras 8-10.

Las células esplénicas o peritoneales se lavaron en PBS, y se ajustó su concentración a 2x10⁶ células/ml. Posteriormente se fijaron durante 20 min en formaldehído al 2% en PBS a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron a una densidad de 1-2x10⁶ células/ml en

tampón PBS al que se adicionó BSA 0.5% y NaN_3 0.02%. Las células se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su procesado. La tinción con anticuerpos se llevó a cabo en un volumen final de 30 μl durante 30 min a 4°C, con la dilución apropiada del anticuerpo en tampón PBS con BSA y NaN_3 suplementado con suero de ratón al 10% para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Las muestras se analizaron en un
5 citómetro de flujo con software CellQuest (Becton Dickinson).

3.3.- Evaluación de la inmunidad a largo plazo frente a las células parentales EATC

Como se muestra en la figura 11, cuando 60 días después de que un grupo de animales inoculados
10 con 10^7 células del tipo 0.28AS-2 se reinoculan con 2.5×10^7 células EATC parentales, no se observa el desarrollo de tumor ascítico alguno. Estos resultados indican que han quedado inmunizados frente al tumor. Recuérdese (figura 7) que 107 células EATC inoculadas i.p. eran suficientes para generar tumor ascítico y que, a consecuencia del mismo, los animales morían entorno a los 16 después de la inoculación.

15 Explicación de las figuras

Figura 1

Características del plásmido de expresión pcDNA3 utilizado en la obtención de las construcciones
20 génicas pcDNA3-0.28 y pcDNA3-1.7, que incluyen segmentos de 0.28 kb y 1.7 kb de glutaminasa renal de rata subclonados en antisentido, respectivamente. El plásmido contiene un promotor de citomegalovirus CMV y un sitio de multiclonación flanqueado por los promotores T7 y Sp6. Entre otros constituyentes destacan además un gen que confiere resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y un gen de resistencia a neomicina o G418 para su selección en células de mamíferos.

Figura 2

Curvas de crecimiento de los clones 0.28AS que expresan segmentos de ARN de glutaminasa de rata en comparación con los controles.

EATC indica la línea celular parental; vector-control indica las células que fueron transfectadas con el vector pcDNA sin inserto. Cada punto en la línea parental es la media de tres experimentos diferentes $\pm$ S. D. Cada punto para las células vector-control y 0.28AS es la media de seis clones diferentes de cada tipo $\pm$ S. D. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado.

Figura 3

Análisis por Western blot que muestra la disminución de la proteína glutaminasa después de la expresión de segmentos de 0.28 kb de ADNc de glutaminasa en antisentido.

Línea 1, línea celular parental EATC; línea 2, línea celular vector-control; línea 3, células del clon 0.28AS-1; línea 4, células del clon 0.28AS-2; línea 5, células del clon 0.28AS-3. Las células 0.28AS-1, 0.28AS-2 y 0.28AS-3 expresan un segmento de 0.28 kb de ARN de glutaminasa en antisentido. PAG, indica glutaminasa activada por fosfato.

Figura 4

Actividades glutaminasa frente al tiempo de tres diferentes clones 0.28AS (0.28AS-1, 0.28AS-2 y 0.28AS-3) que expresan un segmento de 0.28 kb en antisentido de ARN de glutaminasa renal de rata, en
50 comparación con los controles. Cada punto es la media $\pm$ S. D. de tres experimentos diferentes.

Figura 5

Western blot que muestra la expresión de la mucina MUC-1 en la línea celular parental EATC y en
55 la línea 0.28AS-2. La marca correspondiente a 160 kDa indica la posición de la glicoproteína.

Figura 6

Imagen de microscopía óptica correspondientes a la línea parental EATC (A); vector-control (B) y
60 0.28AS-2 (C). Obsérvese que a consecuencia de la expresión de ARN antisentido de glutaminasa la línea celular 0.28AS-2 cambia su morfología en comparación a los controles. Las células se vuelven poligonales y crecen formando parches adheridos al soporte lo que contrasta con el patrón de crecimiento mucho más

anárquico de las células de las líneas control. Este aspecto morfológico puede relacionarse con los niveles de MUC-1 en estas células y son indicativos de un aumento de diferenciación celular.

Figura 7

5 Curvas que muestran la evolución del peso normalizado W_d/W_o (W_d , peso del animal al día d ; W_o , peso del animal al día 0) a lo largo del tiempo de grupos de animales inoculados con diferentes tipos de células. $\blacktriangle$, Ratones inoculados con 10^7 células parentales EATC. $\blacksquare$, Ratones inoculados con 10^7 células transfectadas con el vector sin inserto (vector-control). $\circ$, Ratones inoculados con 10^7 células 0.28AS-2.
10 $\bullet$, Ratones inoculados con 2.5×10^7 células 0.28AS-2. Cada punto es la media $\pm$ S. D. de seis animales. Las flechas verticales indican el día de la muerte de los animales a consecuencia del tumor ascítico. Las flechas horizontales indican supervivencia de los animales.

Figura 8

15 Análisis (% células positivas versus día) por citometría de flujo de las poblaciones celulares CD4, CD8, CD45R, CD18 y F4/80 encontradas en el bazo de animales que fueron inoculados con células EATC y 0.28AS-2.

20 Figura 9

Idem a la anterior pero referida a la cavidad peritoneal de animales inoculados con ambos tipos de células EATC y 0.28AS-2.

25 Figura 10

Descripción gráfica de la evolución seguida por la población de macrófagos en la cavidad peritoneal de animales inoculados con células 0.28AS-2. Estas células han de ser las responsables finales de la eliminación del tumor de la cavidad peritoneal. Obsérvese como dicha población va ascendiendo hasta alcanzar
30 un máximo en el día cuatro tras la inoculación celular para luego ir descendiendo hasta prácticamente desaparecer. A partir del día cuatro el número de células 0.28AS-2 en el peritoneo es muy reducido, desapareciendo completamente en el día siete.

Figura 11

35 A y B: descripción gráfica de lo mostrado en la figura 7, donde se pone de manifiesto que si bien los animales inoculados con 10^7 células de la línea parental EATC mueren entorno al día 16 tras la inoculación, los que lo fueron con idéntica cantidad de células pero del tipo 0.28AS-2 consiguen sobrevivir. En C se muestra que estos animales sobreviven incluso a la inoculación de un número 2.5 veces superior
40 de células 0.28AS-2 y que tras esta los animales quedan inmunizados frente a la inoculación de la línea parental EATC. Todos estos experimentos fueron realizados con seis animales, obteniéndose en todos los casos los mismos resultados.

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Construcciones génicas de plásmidos que expresan ARN en antisentido del enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG).

5

2. Células tumorales viables modificadas genéticamente, para inhibir parcialmente la expresión del enzima glutaminasa activada por fosfato (PAG) y por consiguiente su proliferación, mediante transfección estable con construcciones génicas de plásmidos según reivindicación 1.

10

3. Vacuna antitumoral compuesta por células tumorales viables modificadas genéticamente según reivindicación 2.

15

4. Animales en los que se ha obtenido una respuesta inmunológica frente a tumores mediante la vacuna de la reivindicación 3, y su uso como modelos de experimentación animal para la realización de estudios sobre capacidad tumorigénica celular.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

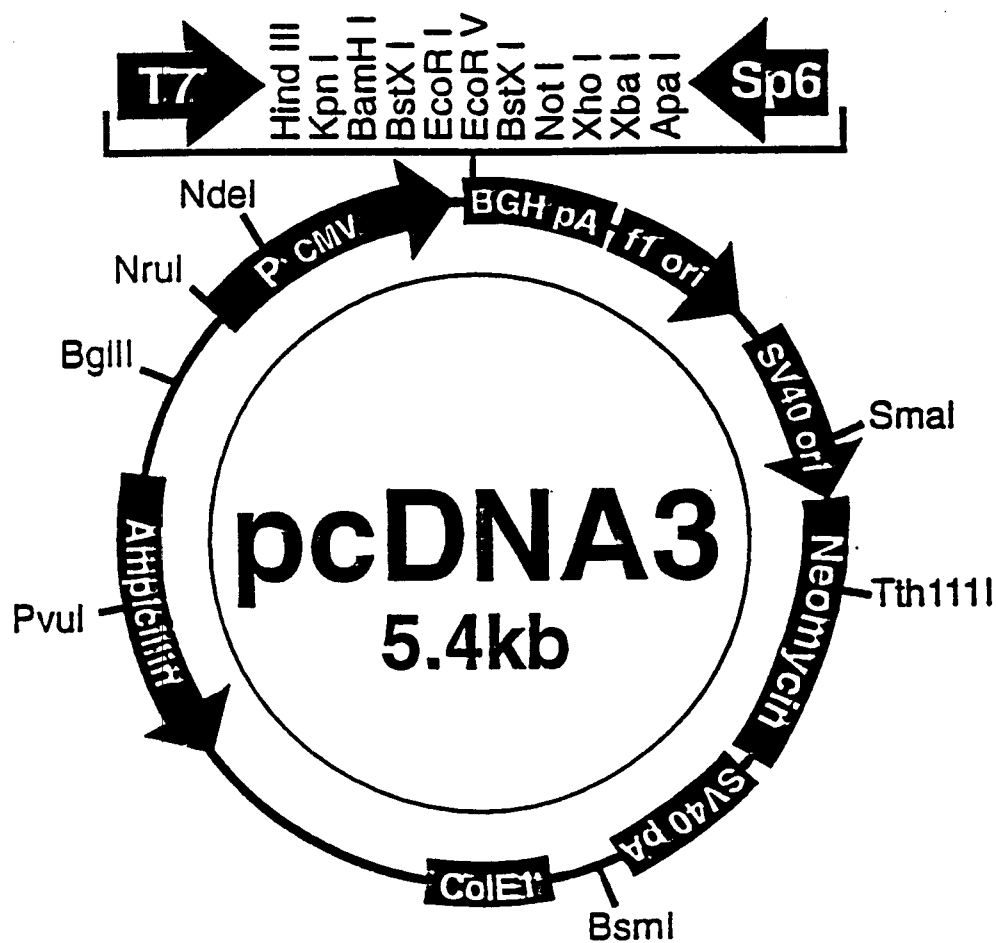


FIGURA 1

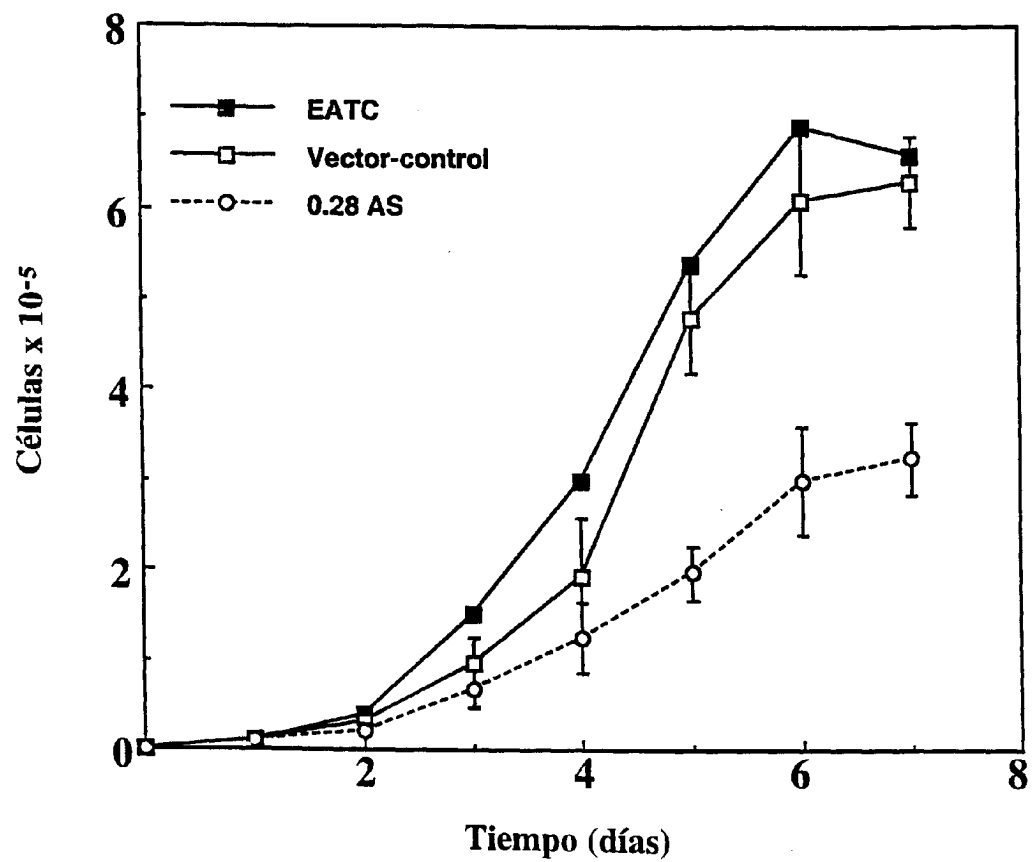


FIGURA 2

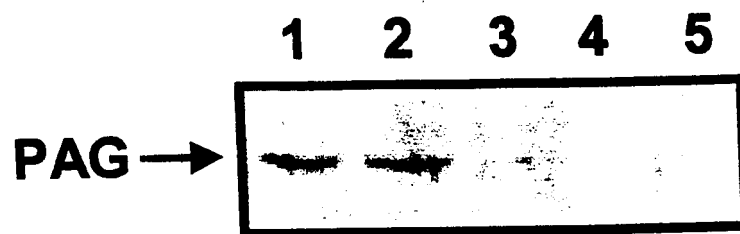


FIGURA 3

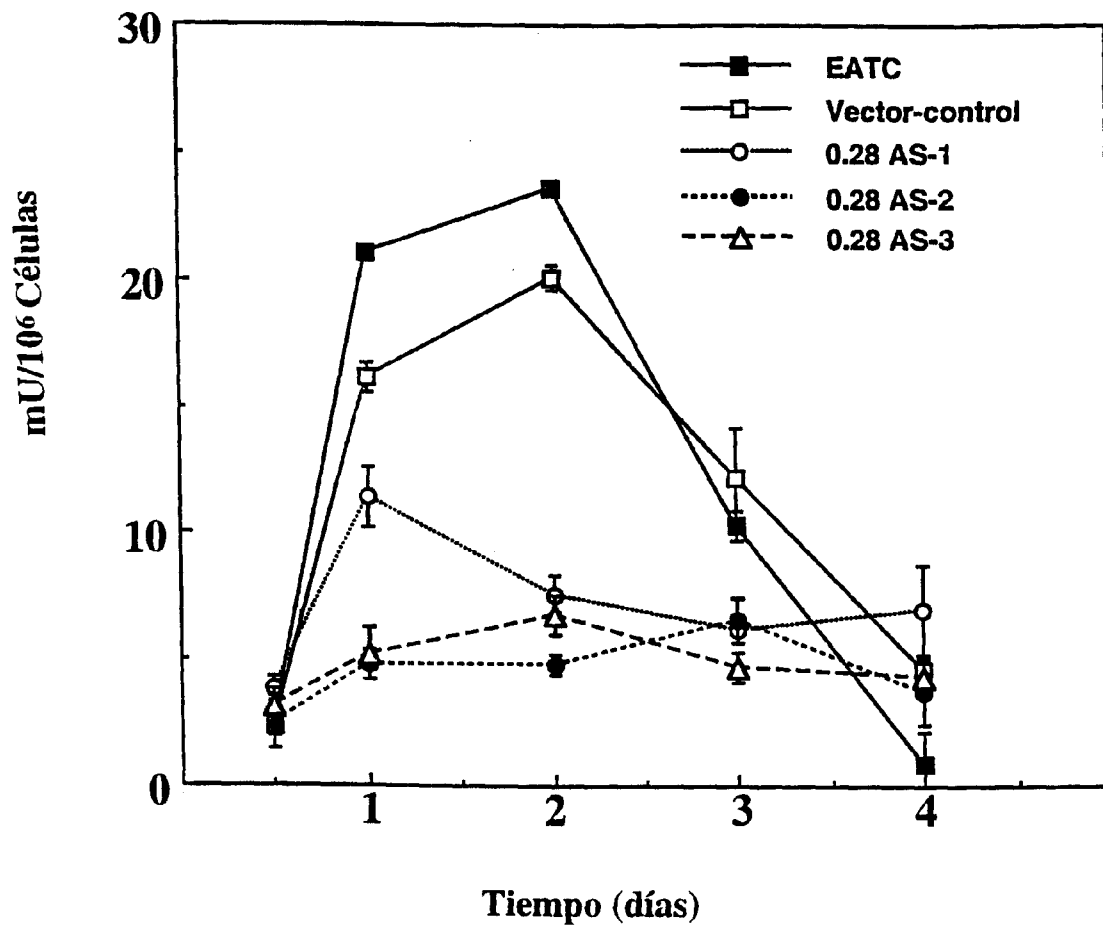


FIGURA 4

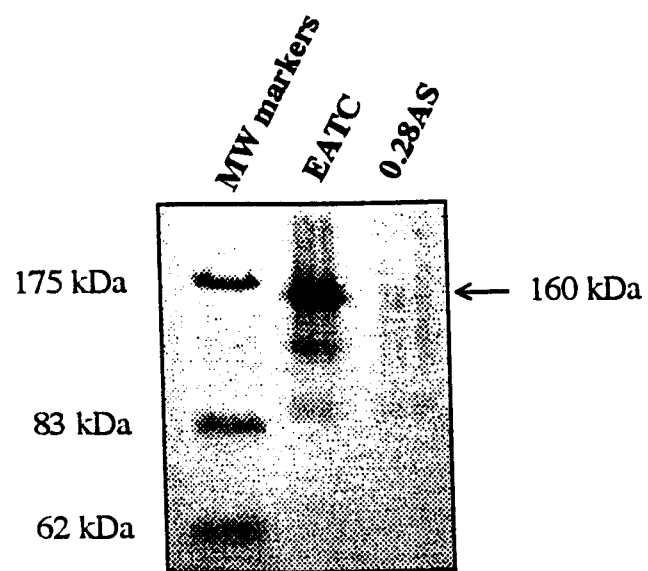


FIGURA 5

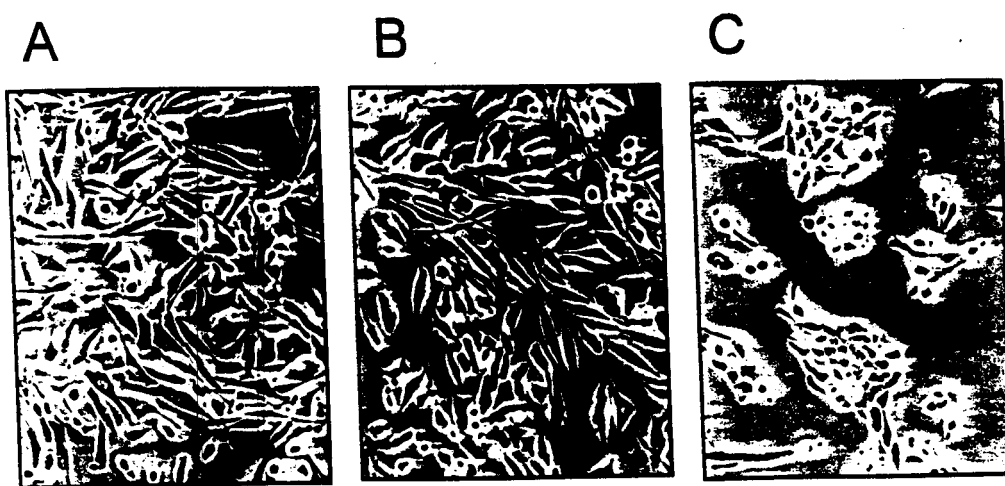


FIGURA 6

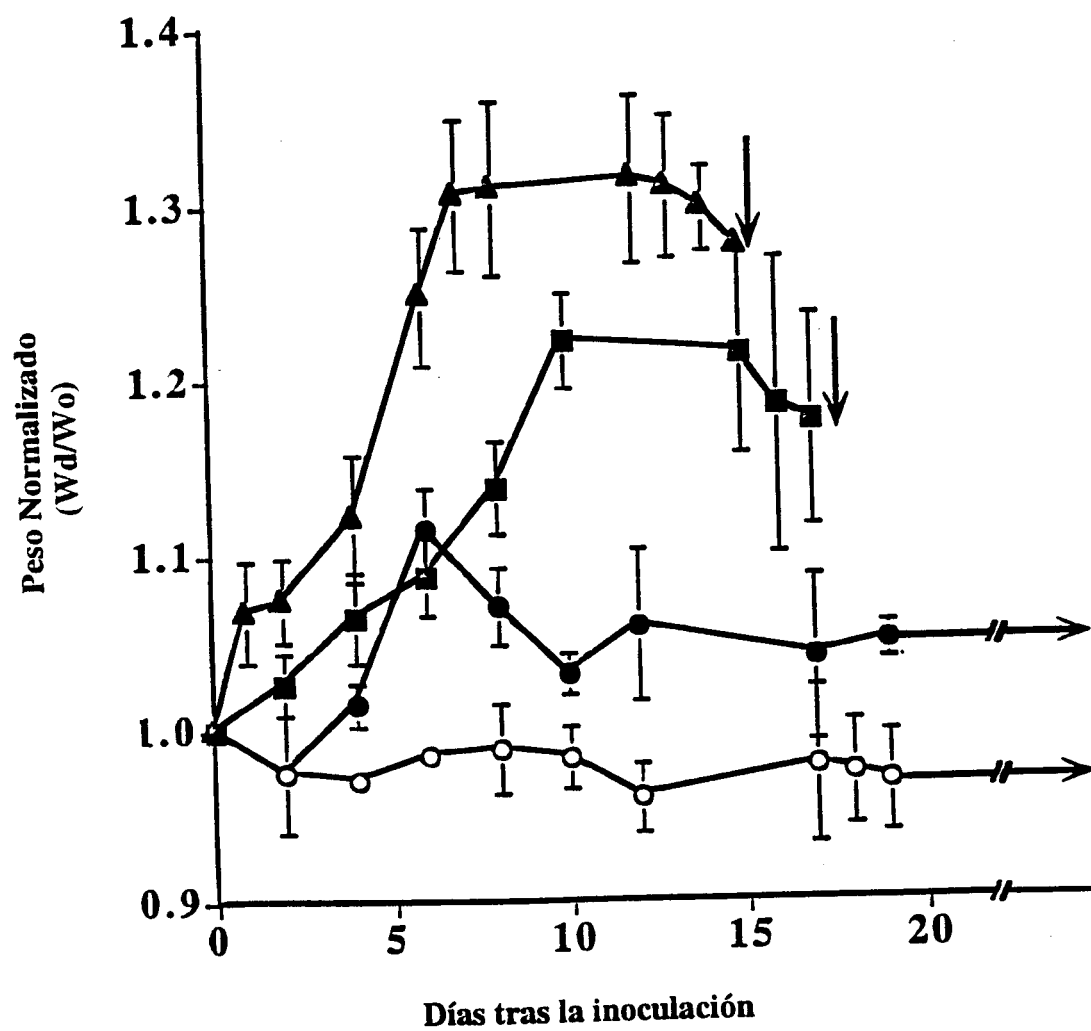


FIGURA 7

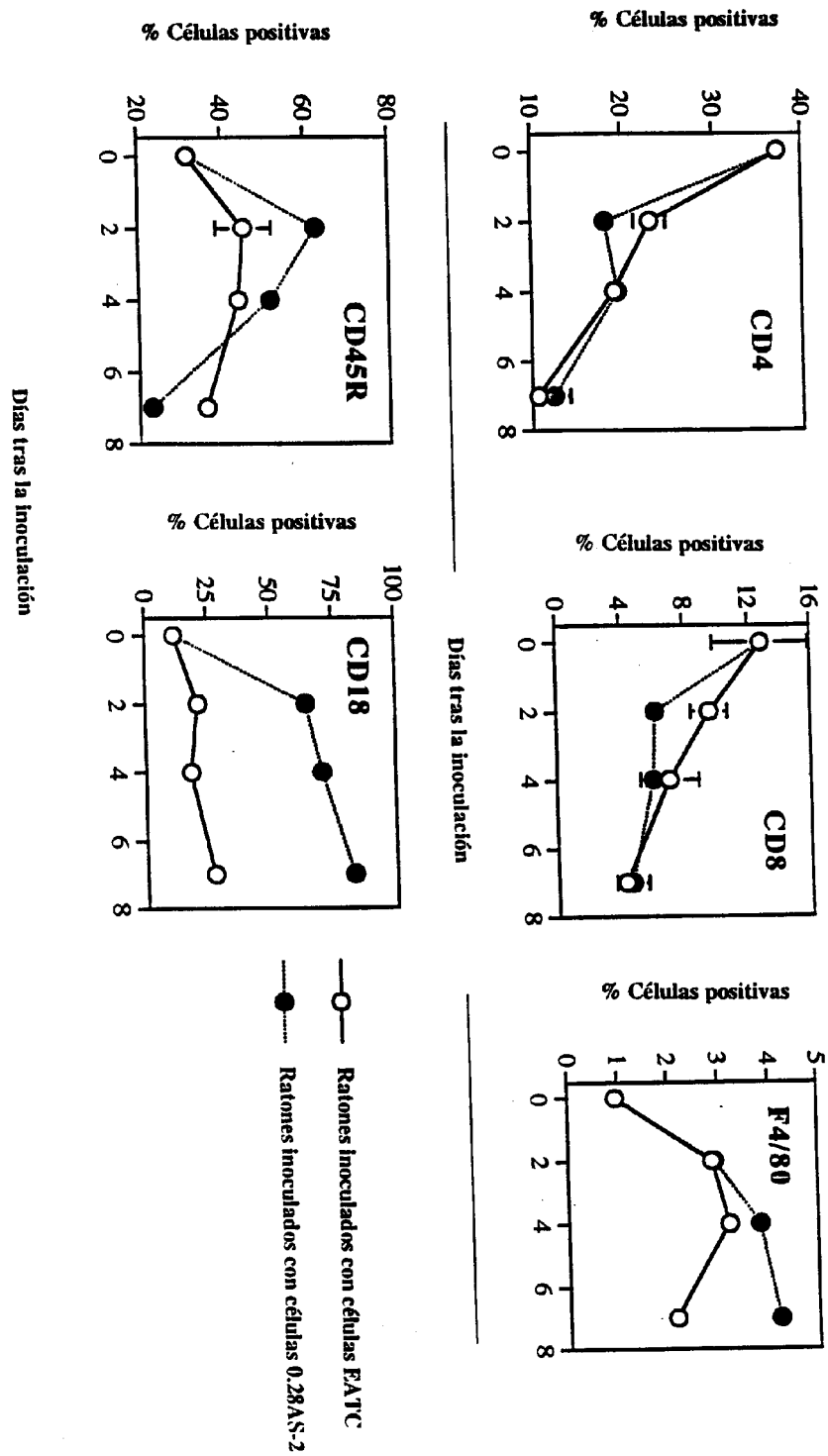


FIGURA 8

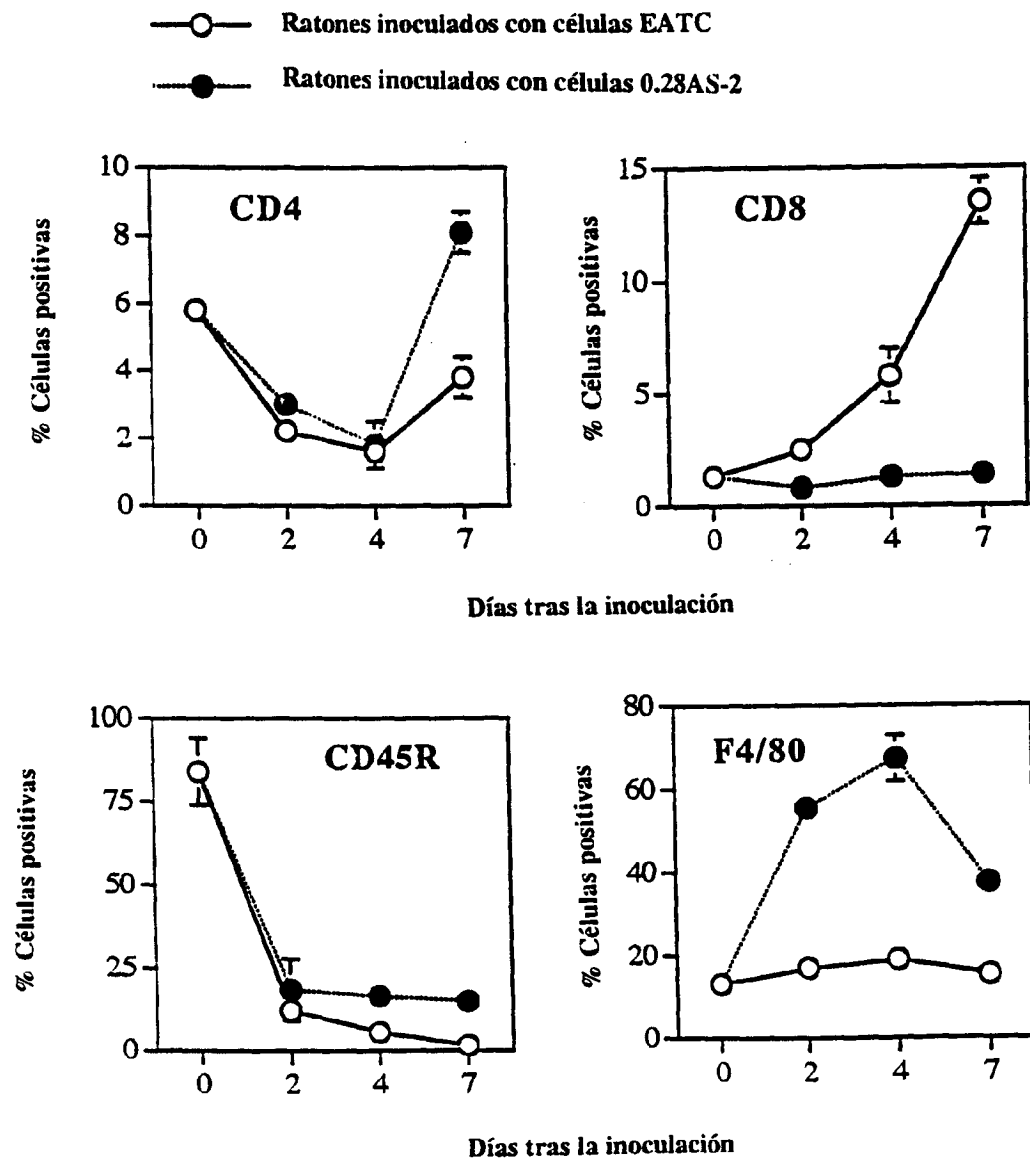


FIGURA 9

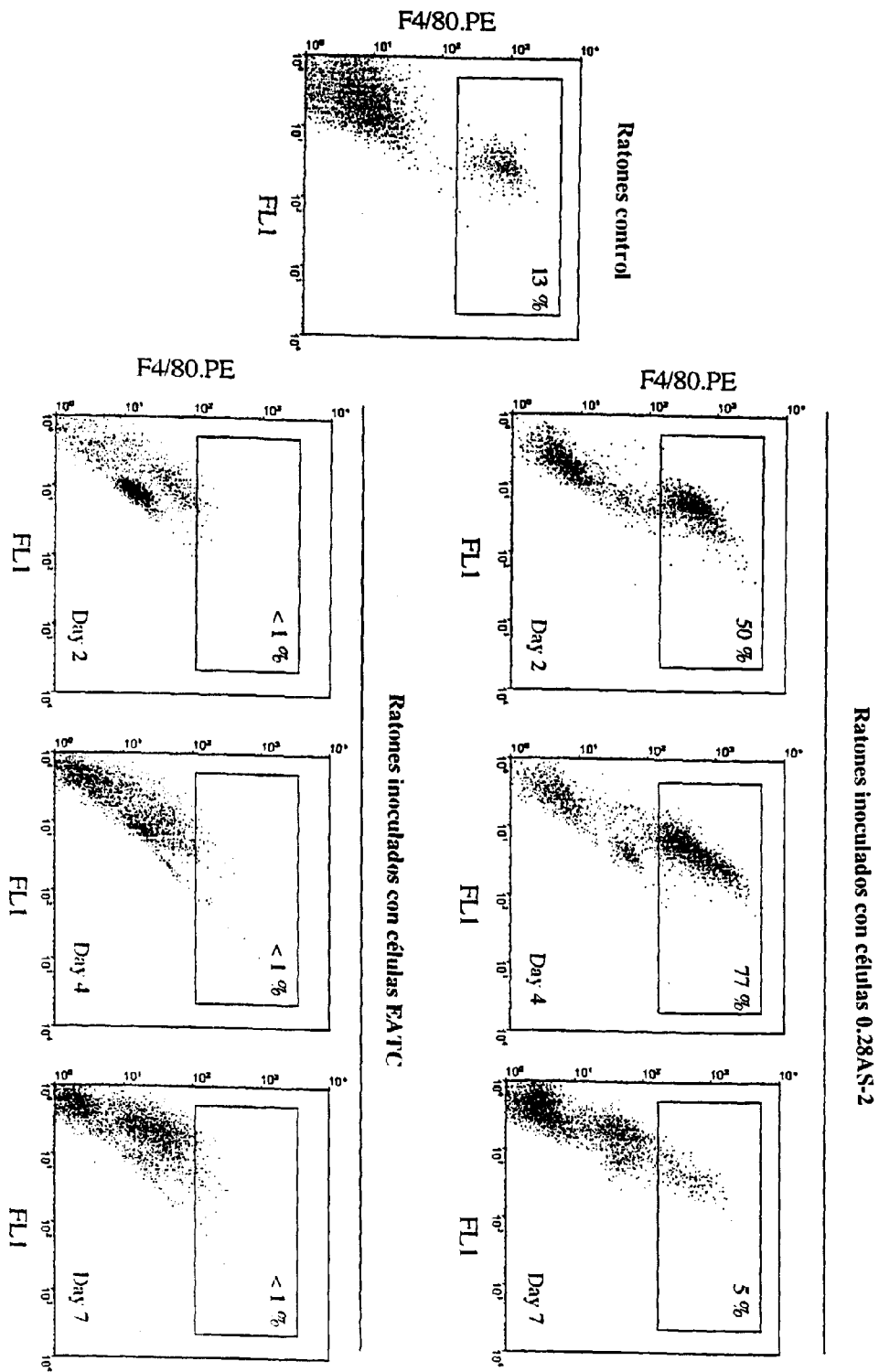
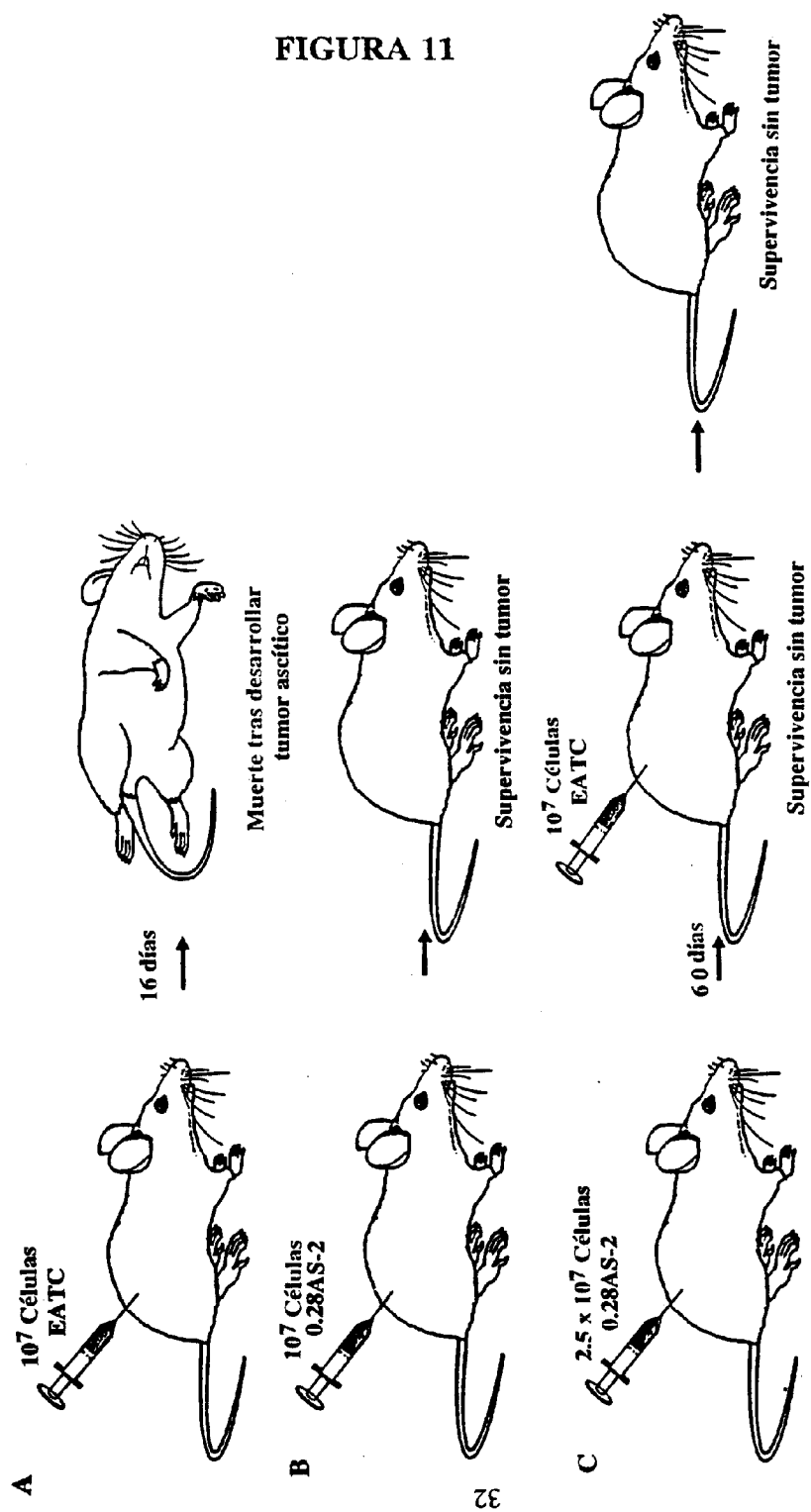


FIGURA 10

FIGURA 11





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 186 469
⑫ N.º solicitud: 200000990
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.04.2000
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/85, 5/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	R.A. SHAPIRO et al. "Isolation, Characterization, and in Vitro Expression of a cDNA that Encodes the Kidney Isoenzyme of the Mitochondrial Glutaminase". J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, páginas 18792-18796.	1-4
Y	MURRAY J.A.H. "Antisense RNA and DNA". Modern Cell Biology, 1992, Inst. Biotechnol. Univ. Cambridge, Cambridge, UK, Vol. 11.	1-4

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

03.04.2003

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1