(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 230 954**

(21) Número de solicitud: 200201819

(51) Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **01.08.2002**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2005**

Fecha de la concesión: **13.01.2006**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2006**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **01.02.2006**

(73) Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

(72) Inventor/es: **Campos Sandoval, José Ángel;**
Aledo Ramos, Juan Carlos;
Olalla Martín, Lucía;
Gutiérrez Pérez, Antonia;
Alonso Carrión, Francisco José;
Segura Checa, Juan Antonio y
Márquez Gómez, Francisco Javier

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Anticuerpos isoenzima-específicos frente a la glutaminasa humana tipos K y L.**

(57) Resumen:
Anticuerpos isoenzima-específicos frente a la glutaminasa humana tipos K y L.
Anticuerpos isoenzima-específicos frente a la glutaminasa humana tipos K y L, útiles para descubrir qué tipo de isoenzima de glutaminasa (K-PAG o L-PAG) se expresa en un tejido o tipo celular mediante la puesta en contacto de muestra de tejido o células con una serie de anticuerpos policlonales (p.ej. anti K-PAG, anti L-PAG y anti-péptidos sintéticos de L-PAG), que reconocen epítopos específicos de cada isoenzima PAG. También son útiles para determinar la localización regional, celular y subcelular de ambas isoformas en muestras de tejidos y células de mamíferos, lo que permitiría su empleo como reactivos marcadores de poblaciones celulares específicas, con gran interés por ejemplo en el cerebro de mamíferos. Asimismo, son útiles para comparar el patrón isoenzimático en pacientes de cáncer con patrones de referencia y determinar cambios cualitativos o cuantitativos en la expresión de glutaminasa, con potencial incidencia en el pronóstico y evolución clínica del paciente.

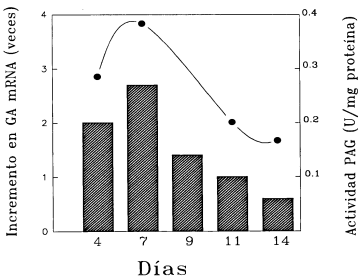

Fig. 1

ES 2 230 954 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos isoenzima-específicos frente a la glutaminasa humana tipos K y L.

Campo de la invención

Esta invención guarda relación con anticuerpos policlonales que reconocen con gran afinidad y especificidad dos isoenzimas de glutaminasa (denominada a partir de ahora PAG), útiles como sondas moleculares para discernir el tipo de isoenzima presente en un tejido o célula, su localización subcelular y como potencial herramienta de pronóstico y evolución clínica en pacientes de cáncer.

Estado de la técnica anterior

Un problema general de la detección de isoenzimas de glutaminasa activada por fosfato (PAG) es la carencia de anticuerpos de gran afinidad y que sean isoforma-específicos, esto es, que no presenten reacción cruzada entre ellos. No existen anticuerpos de PAG de mamíferos comercialmente disponibles y en la bibliografía científica sólo se han empleados anticuerpos frente a la glutaminasa de riñón e hígado de rata, tanto frente a la proteína nativa purificada como frente a péptidos sintéticos deducidos de la secuencia de ADN complementario. Estos anticuerpos pueden dar inmunorreactividad cruzada con otras isoformas de PAG.

La glutaminasa es una enzima mitocondrial que cataliza la conversión de glutamina en glutamato y amonio. Es una enzima esencial en el metabolismo energético y nitrogenado de muchos tipos celulares, especialmente en células de crecimiento rápido como las tumorales. Se ha encontrado una correlación entre expresión de PAG y malignidad en tumores humanos y cánceres experimentales. Además, PAG juega un papel fundamental en la homeostasis del pH en riñón, en el metabolismo proteico en hígado y en la síntesis del neurotransmisor glutamato en cerebro. En humanos, existen dos genes diferentes que codifican a dos isoenzimas, denominadas K (*kidney*, tipo riñón) y L (*liver*, tipo hígado). El gen K se encuentra en el cromosoma 2 y el gen L en el cromosoma 12. Aledo J.C., *et al.*, *Mammal. Genome* **2000**, 11, 1107-1110. Aunque originalmente descritas como presentes en riñón e hígado, ambas isoenzimas se ha descubierto posteriormente que se expresan en otros tejidos y tipos celulares. Así, en humanos, la isoenzima K se encuentra en cerebro, corazón, pulmón, placenta, pulmón y páncreas, aparte de riñón, mientras que la isoenzima L se encuentra en cerebro y páncreas, además de en hígado.

La presencia de ambas isoenzimas en cerebro humano podría aventurar que también ambas se expresen en cerebro de otros mamíferos, lo que aún no ha sido estudiado. La posibilidad existe que puedan realizar misiones fisiológicas diferentes, por lo que sería muy importante determinar su expresión diferencial en cerebro, a nivel regional, celular y subcelular. Un método inmunocitoquímico que permita caracterizar esa expresión diferencial en cerebro de mamíferos con anticuerpos isoenzima-específicos, supondría un avance cualitativo en numerosos estudios involucrados en diferentes aspectos de la neurotransmisión glutamatérgica y gabaérgica, lo que podría ser de potencial interés para muchos investigadores en neurociencias.

Otra área de investigación donde sería muy útil la existencia y disponibilidad de anticuerpos anti-PAG sería en la investigación en cáncer. La glutaminasa es la enzima principal en el catabolismo de la glutamina y ha sido implicada en el control del crecimiento y proliferación de células cancerosas y de células normales de crecimiento rápido. Medina, M.A., *et al.*, *Mol. Cell. Biochem*. **1992**, 113, 1-15. Desde hace mucho tiempo se conoce la correlación positiva existente entre niveles de actividad enzimática PAG y crecimiento y proliferación de tumores experimentales. Linder-Horowitz, M., *et al.*, *Cáncer Res*. **1969**, 29, 1195-1199. Inversamente, la capacidad de metástasis ha sido correlacionada consistentemente con una muy pequeña (o casi nula) concentración de glutamina (Gln) libre en los tumores de rata. Knox, W.E., *et al.*, *Cáncer Res*. **1970**, 30, 283-287. Estos primeros estudios, aunque limitados por necesidad a medidas enzimáticas, fueron la base para investigaciones clínicas posteriores que señalaron que la glutamina, y en algunos casos la asparragina, actúan como los principales vehículos transportadores del nitrógeno desde los tejidos del huésped hasta el tumor. Souba, W.W. *Ann. Surg*. **1993**, 218, 715-728. Por ello, las enzimas glutaminasa y asparraginasa, utilizadas para clarificar el plasma de Gln libre, han demostrado poseer una actividad antitumoral en leucemias infantiles y tumores experimentales, aunque su uso en la quimioterapia debe ser manejado con precaución, dado los efectos secundarios que producen.

La Gln es un aminoácido esencial para las células neoplásicas y es requerida para el crecimiento de muchos otros tipos celulares. Una reducción en la concentración de Gln en líneas celulares de cáncer humano provoca diferenciación; por el contrario, un aumento en el medio de cultivo promueve la aparición de un fenotipo más maligno. Los estudios pioneros ya mencionados sobre PAG en tumores, limitados a medidas enzimáticas, fueron ampliándose con el advenimiento de la Biología Molecular y la disponibilidad de sondas moleculares de PAG de mamíferos. Así, pudo demostrarse que la sobreexpresión de glutaminasa es una característica fenotípica exhibida por una amplia variedad de tumores, y que los máximos niveles de actividad catalítica y de abundancia de mRNA coinciden con la fase exponencial de crecimiento celular. Aledo, J.C., *et al.*, *FEBS Lett*. **1994**, 341, 39-42.

Nuestro grupo ha conseguido la clonación de la primera PAG humana y tumoral en células ZR-75 de cáncer de mama. Gómez-Fabre, P.M., *et al.*, *Biochem. J*. **2000**, 345, 365-375. El ADNc codificaba para una proteína de 602 aminoácidos casi idéntica a la isoenzima L de rata. La disponibilidad de este ADNc de la L-PAG, junto con el ADNc de la K-PAG humana cedido por el grupo japonés que efectuó su clonación, nos ha permitido la preparación de

anticuerpos policlonales frente a péptidos sintéticos, dominios individuales y proteínas completas, así como comprobar la expresión alterada de los niveles de ARNm de glutaminasa en células tumorales. Por consiguiente, son muy escasos los estudios a nivel molecular acerca de la expresión de PAG en cánceres humanos, que identifique la(s) isoenzima(s) expresada(s) y su correlación con malignidad, la existencia o no de una isoforma específica tumoral, y su regulación en relación al crecimiento y proliferación celular.

La Figura 1 que se adjunta, reproducida de una publicación del laboratorio de los inventores (Aledo, J.C., *et al.*, *FEBS Lett*. **1994**, 341, 39-42), muestra los niveles de ARNm para K-PAG en células de tumor ascítico de Ehrlich junto con la curva de crecimiento y la actividad catalítica. Las cantidades relativas de ARNm de PAG fueron máximas durante la fase de crecimiento exponencial del tumor, coincidiendo con la máxima actividad catalítica.

La Figura 2 que se adjunta, reproducida de una publicación del laboratorio de los inventores (Gómez-Fabre, P.M., *et al.*, *Biochem. J*. **2000**, 345, 365-375), muestra los niveles de ARNm para L-PAG en células de cáncer mamario humano, línea ZR-75-1, durante los días de cultivo *in vitro*. De nuevo, se observa máxima expresión de PAG al inicio de la fase exponencial de crecimiento y una correlación positiva con la actividad catalítica. Sin embargo, es conocido que a veces las cantidades de ARNm o las actividades catalíticas no necesariamente reflejan los niveles de expresión de la proteína. También es evidente que los ensayos de hibridación permiten detectar el ARNm, pero no así el destino o localización final de la proteína. Así pues, las aproximaciones derivadas del estado de la técnica anterior, que todas conllevan la utilización de sondas ADNc (análisis de tipo Northern blot o hibridación *in situ*), no parecen adecuadas para resolver el problema de la distribución y localización de isoformas de PAG, que permitan averiguar su patrón de expresión diferencial en tejidos y células humanas, tanto normales como cancerosas, y su uso como herramienta potencial en el pronóstico y evolución clínica de los pacientes de cáncer.

Explicación de la invención

La presente invención soluciona el problema mencionado anteriormente, al aportar un método para reconocer las isoenzimas K y L PAG humanas y de otros mamíferos, con gran afinidad y especificidad, permitiendo el tipaje de células tumorales y caracterizar qué isoenzima se expresa a nivel regional, celular y subcelular en el cerebro de mamíferos. Dicho método comprende los siguientes pasos:

(a) la puesta en contacto de una muestra de tejido o extracto de mamíferos (humano, mono, rata, ratón, etc...) o células de cáncer humano cultivadas *in vitro*, con una serie de anticuerpos policlonales, siendo cada uno de ellos capaz de reconocer un epítopo específico de una de las dos isoenzimas de glutaminasa, K o L, durante el tiempo y bajo las condiciones suficientes para la formación del complejo antígeno-anticuerpo y la detección de la formación de los complejos.

(b) la determinación cualitativa y cuantitativa del patrón de expresión y de la localización regional, celular y subcelular de las isoenzimas K y L de glutaminasa en dicha muestra;

(c) la comparación del patrón de expresión de las muestras procedentes de pacientes con cáncer con un conjunto de patrones de referencia de tejidos sanos y líneas celulares cancerosas, para los cuales se conoce el patrón de expresión de glutaminasa:

y (d) la predicción de la posible evolución clínica del paciente en función de los niveles de expresión de ambas isoenzimas.

En una realización preferida, la detección de la formación del complejo en el paso (a) se lleva a cabo mediante una técnica seleccionada de entre el grupo formado por el ensayo inmunoenzimático y la inmunofluorescencia. Particularmente adecuado es el ensayo inmunocitoquímico sobre cortes de tejido.

En una realización preferida del anterior método de tipaje, el establecimiento del patrón de expresión en el paso (b) se lleva a cabo cualitativamente por simple inspección ocular.

Cuando se realizó esta invención, los únicos anticuerpos disponibles contra glutaminasa eran frente a las isoformas K y L de riñón e hígado de rata, respectivamente. Así, en una realización preferida, el método comporta una serie de anticuerpos incluyendo los anti K-PAG y anti L-PAG, éstos últimos frente a la proteína recombinante completa o frente a una serie de péptidos sintéticos de distintas regiones de la proteína. Tan pronto como otros anticuerpos de este tipo estén disponibles, la serie será incrementada o modificada apropiadamente.

En otra realización preferida, el método proporciona un protocolo para establecer, cualitativa o cuantitativamente, el patrón de expresión de glutaminasas en una muestra de tejido o extracto de humano, mono, rata, ratón o células de cáncer humano cultivadas *in vitro*.

Tal y como se ilustra en los ejemplos que se adjuntan, el método de la presente invención puede utilizar anticuerpos policlonales contra las isoformas de glutaminasa como herramienta para analizar la expresión de glutaminasa en células tumorales humanas. De hecho, los ejemplos de la presente invención constituyen la primera demostración de la utilización de anticuerpos contra glutaminasa para elucidar el patrón de expresión de la enzima en tumores y su potencial uso en el pronóstico y evolución clínica del paciente.

El razonamiento que subyace en la invención es que, una vez establecido el patrón de expresión de glutaminasa en células y tejidos sanos de mamíferos, el análisis del patrón de expresión de una biopsia tumoral, realizado preferentemente -aunque no exclusivamente- mediante inmunocitoquímica, facilitará una pauta de actuación para poder realizar el pronóstico y evaluar la evolución clínica de los pacientes con cáncer.

Esta invención también proporciona varios anticuerpos policlonales anti L-PAG, los cuales se obtienen por inmunización convencional de mamíferos, preferentemente conejos, con una proteína conjugada con los péptidos de las secuencias SEQ ID NO 3 y 4. En una realización preferida, la proteína conjugada es hemocianina de lapa (KLH, "keyhole limpet hemocyanin"). También se describen los anticuerpos obtenidos frente a la proteína recombinante L-PAG humana, SEQ ID NO 2, y frente a la proteína recombinante K-PAG humana, en concreto frente a una porción del extremo COOH-terminal, SEQ ID NO 1; ambos anticuerpos obtenidos por inmunización convencional de conejos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 (cf. Aledo *et al.*, *ibid*.) muestra los niveles de ARNm y actividad PAG para la isoenzima K presente en células de tumor ascítico de Ehrlich, creciendo en la cavidad peritoneal de ratones Swiss. Las transferencias Northern fueron analizadas por densitometría: las barras representan las intensidades relativas de la banda obtenida para el ARNm de PAG a diferentes días del desarrollo tumoral y normalizadas frente al gen constitutivo gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). El nivel relativo de mensajero se expresa en relación al presente al día 11 del desarrollo tumoral, al que se le asignó el valor relativo de 1. La curva representa la actividad específica glutaminasa durante el progreso del tumor.

La Figura 2 (cf. Gómez-Fabre *et al.*, *ibid*) muestra el análisis de tipo "Northern blot" correspondiente a la L-PAG de células de cáncer de mama humano ZR-75 creciendo en cultivo *in vitro*. Como control de la carga de ARN y de la transferencia se muestran también los niveles de ARNm del gen constitutivo GAPDH a los diferentes días de cultivo. La cantidad relativa de ARNm de L-PAG aumenta considerablemente durante la fase exponencial de crecimiento de las células tumorales (días 2 y 3), en relación con la fase estacionaria (días 5 y 7).

La Figura 3 muestra el análisis de tipo "Western blot" correspondiente a los anticuerpos K-PAG, L-PAG_{1-602}, L-$PAG_{462-485}$ Y L-$PAG_{583-602}$ frente a las proteínas recombinates humanas GST-KPAG, GST-LPAG y mitocondrias de hígado y riñón de rata (panel A). En (B) se muestra el efecto de la preabsorción de los anticuerpos L-PAG_{1-602} con su propio antígeno (L-PAG) o con la isoforma K (GST-KPAG) sobre la capacidad de reconocimiento de la isoenzima L.

La Figura 4 muestra la tinción inmunocitoquímica de cortes de cerebro de rata y mono empleando los anticuerpos K-PAG y L-PAG_{1-602}. La inmunotinción de la región de corteza cerebral de mono (A) y rata (B) con anticuerpos anti L-PAG_{1-602}; la proteína L-PAG se concentró en el núcleo celular de todas las capas corticales en ambas especies. (C) La inmunoreactividad frente a K-PAG en la corteza cerebral de rata se localizó en la perikaria neuronal. (D) Vista con mayor aumento del núcleo de las neuronas corticales (capa II) inmunoteñidas con anti L-PAG_{1-602}. (E) Corteza prefrontal de mono (capas III-IV) inmunoteñidas con anticuerpos anti K-PAG mostrando una fuerte tinción en la perikaria neuronal. (F) Vista con mayor aumento de neuronas corticales de mono mostrando depósitos citoplásmicos particulados por inmunorreacción con los anticuerpos anti K-PAG.

La Figura 5 muestra la microscopía confocal por láser de secciones de cerebro de rata. Se muestra la doble tinción inmunofluorescente con anticuerpos anti-mitocondria (rojo, I) y anti K-PAG (verde, J) que demostró una localización mitocondrial para esta isoforma (amarillo, K). (L-N) El doble marcaje con ioduro de propidio (rojo, L) y anticuerpos anti L-PAG_{1-602} (verde, M) demostró que muchas células, pero no todas, expresan la proteína L-PAG en núcleo (N, flechas blancas muestran las células doblemente marcadas). BV significa vaso sanguíneo; barras de escala = 100 μm (A-C), 20 μm (D), 70 μm (E), 25 μm (F), 50 μm (G), 10 μm (H), 40 μm (I-N).

La Figura 6 muestra la microscopía confocal por láser para la K-PAG en regiones de cerebro de mono y rata. Se muestra la doble inmunofluorescencia para K-PAG (A1-4) y parvalbúmina (PV,B1-4) en corteza de mono (A1-C1; corteza prefrontal, capa III), hipocampo de mono (A2-C2, CA2 subcapa piramidal; A3-C3 giro dentado) e hipocampo de rata (A4-C4, giro dentado). (H) significa hilo; (G) significa células granulares; (sp) significa capa piramidal.

La Figura 7 muestra la inmunorreactividad perivascular cerebral de K-PAG. (A), se muestra el marcaje con inmunoperoxidasa en cerebro de rata donde se observa una tinción intensa en forma de puntos alrededor de los vasos sanguíneos. (C), se muestra la inmunotinción perivascular de K-PAG alrededor de algunos vasos sanguíneos pero no todos (la flecha roja señala los vasos sanguíneos positivos, y las flechas verdes los negativos). La microscopía confocal por láser de doble inmunofluorescencia para la K-PAG (B1 y D1) y para la proteína específica de astrocitos GFAP (B2 y D2) muestra inmunotinción positiva en forma de puntos para K-PAG que no está asociada con astrocitos perivasculares (B3). (BV) significa vaso sanguíneo.

La Figura 8 muestra el análisis de tipo "Western blot" de tejidos de ratón revelados con los anticuerpos anti L-PAG_{1-602}. En la calle 1 se muestra un extracto de riñón; en la calle 2 un extracto de hígado y; en la calle 3 un extracto de cerebro. En el margen izquierdo se indican las posiciones relativas de los marcadores de masa molecular.

La Figura 9 muestra el análisis de tipo "Western blot" correspondiente a las proteínas K-PAG (panel A, izquierda) y L-PAG (panel B, derecha) en varias líneas celulares de cáncer humano. El panel A fue revelado con anticuerpos

anti K-PAG y contiene: calle 1, células KU812-F de leucemia humana; calle 2, células MCF-7 de cáncer de mama humano; calle 3, células ZR-75 de cáncer de mama humano. El panel B fue revelado con anticuerpos anti L-PAG_{1-602} y contiene: calle 1, células MCF-7 de cáncer mamario humano; calle 2, células ZR-75 de cáncer de mama humano.

Exposición detallada de un modo de realización

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

1.1) *Anticuerpos anti K-$PAG_{551-669}$, anti L-PAG_{1-602}, anti L-$PAG_{462-485}$ y anti L-$PAG_{583-602}$. Análisis de Western blot*

Anticuerpos específicos de isoformas anti K-PAG y anti L-PAG se obtuvieron de conejos inyectados con proteínas recombinantes o bien oligopéptidos acoplados a KLH. El anticuerpo anti K-PAG se obtuvo por expresión en bacterias de los 119 últimos aminoácidos (SEQ ID NO 1) en el vector pQE-31, de forma que se obtiene una proteína recombinante K-$PAG_{551-669}$ con un motivo de seis histidinas adicionales que permiten su purificación por afinidad en cromatografía de quelación por metales. La secuencia codificante completa de la L-PAG humana (SEQ ID NO 2) se subclonó en el vector bacteriano pET-3c y se expresó como una proteína recombinante en *Escherichia coli* para obtener la proteína recombinante L-PAG_{1-602}. La proteína se solubilizó de los cuerpos de inclusión y se purificó por electroforesis SDS-PAGE en gradiente; tras teñir levemente con azul de Coomassie, la banda fue cortada y usada para la inmunización de los conejos. Dos péptidos no solapantes de 20-24 residuos de largo, correspondientes a los residuos 462-485 y 583-602 de la L-PAG humana (SEQ ID NO 3 y 4, respectivamente), fueron acoplados a KLH y empleados para la inmunización de conejos. Para análisis por Western blot de células en cultivo, las células se lavan con tampón PBS, se tratan con tripsina y se eluyen de las placas Petri con 10 ml de PBS. Después de contarles en un Coulter Counter, las células se centrifugan y el precipitado se lava con PBS y se resuspende en tampón TES (25 mM Tris/HCl, 0.2 mM EDTA, 0.33 M sacarosa, pH 8.0) conteniendo inhibidores de proteasas. Las células se homogenizan en un Potter de vidrio-teflón y se centrifuga a 1,000 x g. El sobrenadante se centrifuga a 12,000 x *g*, obteniéndose una fracción cruda mitocondrial como precipitado, que se resuspende en un pequeño volumen de tampón TES y se guarda a -80°C. Se determinaba el contenido en proteínas de estas fracciones antes de SDS-PAGE. Los tejidos se extrajeron de ratones sanos y se homogenizaron manualmente con un Potter de vidrio en 5 volúmenes de tampón TES, suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche, Barcelona). El extracto crudo se usó directamente para SDS/PAGE añadiéndole tampón de carga de proteínas. Muestras de 20 microgramos de proteína eran calentadas durante 5 min a 100°C y eran corridas en un gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas eran transferidas a filtros de nitrocelulosa, y éstos eran bloqueados, previamente a la inmunorreacción, en tampón TBS ("Tris buffer salive"), suplementado con un 3% de albúmina sérica bovina (BSA) y un 0.2% de Tween-20. Los filtros eran posteriormente incubados durante 1 h en el antisuero diluido (1/10 a 1/100, dependiendo del anticuerpo, en TBS suplementado con 0.2% Tween-20 y 1% BSA. Se utilizó como segundo anticuerpo una IgG de cabra anti-conejo, acoplada a peroxidasa del rábano, y diluida 1/2000 en TBS suplementado con BSA y 0.2% Tween-20. Para visualizar las proteínas K-PAG y L-PAG se utilizó la técnica de ECL (Amersham).

1.2) *Inmunocitoquímica de las proteínas K-PAG y L-PAG*

Los anticuerpos contra las proteínas K-PAG y L-PAG fueron utilizados en inmunocitoquímica de cerebro de rata y mono. Previamente, fueron purificados por afinidad. De 5 a 10 mg de las proteínas recombinantes K-$PAG_{551-669}$ y L-PAG_{1-602} 0 3 a 5 mg del péptido L-$PAG_{583-602}$, fueron acoplados a una columna de Sepharose 6MB activada con BrCN (Amersham) y empleada para purificar por afinidad los respectivos antisueros. El antisuero frente a L-$PAG_{462-485}$ fue empleado en inmunocitoquímica sin purificar. Ratas adultas macho (*Sprague-Dawley*) y monos macacos (*Macaca mulatta*) fueron anestesiados y perfundidos transcardialmente con PBS seguido por fijación con p-folmaldehido al 4%. Estas preparaciones fueron lavadas con PBS y la actividad peroxidasa endógena fue bloqueada mediante la incubación durante 30 min en metanol-H_2O_2 0.3%. También se bloquearon la avidina, la biotina y las proteínas que unen biotina endógenas. Las secciones fijadas fueron incubadas con uno de los anticuerpos anti-PAG purificados por afinidad (anti K-PAG 1:500 o anti L-PAG 1:10) durante 48 h a temperatura ambiente y se procesaron por el método de biotina-avidina usando anticuerpos secundarios biotinilados (Vector Labs, 1:500) y conjugados con peroxidasa/avidina (ExtraAvidin-peroxidase conjugated, Sigma, St. Louis, MO, USA, 1:2000). Los complejos antígeno-anticuerpo eran visualizados con 0.05% diaminobenzidina, 0.03% sulfato de amonio y níquel y 0.01% H_2O_2. Para la tinción doble inmunofluorescente, las secciones fueron incubadas con anti K-PAG y un anticuerpo monoclonal anti-mitocondria (Biotrend, Colonia, Alemania), y fueron visualizadas con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Alexa 488 IgG y de cabra anti-ratón Alexa 568 IgG (1:1000, Molecular Probes, Amsterdam, Holanda), respectivamente. Además, se realizó un marcaje doble fluorescente con anti L-PAG y usando como anticuerpo secundario IgG anti-conejo Alexa 488 y ioduro de propidio (4 μg/ml) durante 10 min, para visualizar núcleos.

Ejemplo 2

Análisis de tipo Western blot para determinar la especificidad de los anticuerpos

El análisis de tipo Western blot se realizó para evaluar la potencial especificidad y la ausencia o no de reacciones cruzadas de nuestros antisueros anti L-PAG frente a la proteína K-PAG y viceversa. Para ello, muestras de proteínas recombinantes de fusión glutatión S-transferasa (GST)-LPAG y GST-KPAG, purificadas por afinidad, así como extractos proteicos de mitocondrias aisladas de hígado y riñón de rata, fueron analizadas por SDS-PAGE, transferencia e inmunodetección con los distintos antisueros. La capacidad para reconocer el antígeno L pero no el K fue empleado como criterio para designar un suero como L-PAG específico, y viceversa. En la Figura 3 se recogen estos resultados: se muestra que los anticuerpos anti L-PAG_{1-602} reconocen específicamente a la isoforma L, con o sin GST, y al extracto de mitocondrias de hígado de rata. Por el contrario, no reconocen a la GST-KPAG ni al extracto de mitocondrias de riñón de rata; además, la preabsorción con el antígeno elimina el reconocimiento. De forma análoga, los anticuerpos anti K-$PAG_{551-669}$ reconocen a la K-PAG recombinante y al extracto de riñón de rata, pero no a las L-PAG recombinantes ni al extracto de hígado de rata. De forma similar, los anticuerpos anti L-$PAG_{462-485}$ y anti L-$PAG_{583-602}$ reconocieron únicamente la proteína L-PAG y no la K-PAG. Estos cuatro anticuerpos K-$PAG_{551-669}$, L-PAG_{1-602}, L-$PAG_{462-485}$ y L-$PAG_{583-602}$ fueron pues escogidos como anticuerpos isoenzima-específicos y poseían las mejores relaciones señal/ruido.

Ejemplo 3

Utilización de la inmunocitoquímica para determinar la expresión regional, celular y subcelular de isoformas PAG

Los resultados de este ejemplo, que se ilustran en las Figuras 4-7, muestran que los anticuerpos permiten la localización regional de ambas proteínas en cerebro de rata y mono, donde abundan sobre todo en la corteza cerebral, estriado, hipocampo y cerebelo (Fig. 4 y Fig. 6). Ambas proteínas se localizaron preferentemente en neuronas, si bien la localización subcelular fue completamente diferente: así, mientras que la L-PAG localiza en el núcleo, la K-PAG se encuentra en mitocondria (Fig. 5). Estos resultados se repitieron consistentemente en cerebro de ambas especies. El resultado para la L-PAG es totalmente novedoso, pues glutaminasa siempre se ha descrito como una enzima mitocondrial: el mismo patrón de tinción nuclear se obtuvo utilizando los anticuerpos anti L-$PAG_{462-485}$ Y anti L-$PAG_{583-602}$ (resultados no mostrados). Además, las tinciones desaparecieron cuando se incubaron previamente los anticuerpos con los respectivos antígenos (proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, resultados no mostrados). Por último, en la Figura 7 también se muestra una inmunorreactividad de K-PAG en zonas perivasculares, alrededor de algunos vasos sanguíneos. Sin embargo, también se observa que esta reactividad no está asociada con astrocitos ni con células endoteliales, por lo que pudiera deberse a terminales axónicos en contacto con los vasos sanguíneos. Los resultados contenidos en este ejemplo demuestran la gran afinidad y especificidad de los anticuerpos para realizar inmunocitoquímica en muestras de tejidos de mamíferos, constituyendo una poderosa herramienta para elucidar la localización celular y subcelular de ambas isoformas.

Ejemplo 4

Análisis de tipo Western blot para determinar la expresión de isoformas de PAG en tejidos de mamíferos y células de cánceres humanos

La Figura 8 ilustra la capacidad de los anticuerpos para discernir qué tejidos de mamíferos poseen una u otra isoforma de glutaminasa, mediante ensayo tipo Western blot. Se muestra el ensayo con tres tejidos de ratón: riñón, hígado y cerebro, empleando los anticuerpos L-PAG_{1-602}. Mientras que una señal casi indetectable se obtuvo en riñón -lo que de nuevo demuestra la especificad de los anticuerpos-, dos señales muy fuertes se detectan en hígado y cerebro, a los tamaños teóricos estimados para ambas proteínas. Por lo tanto, cerebro e hígado de ratón, pero no riñón, poseen la isoforma L-PAG. Similares inmunotinciones se obtienen con los otros anticuerpos (resultados no mostrados). En la Figura 9 se demuestra la capacidad de los anticuerpos para detectar ambas isoenzimas en células cancerosas. La isoenzima K fue ubicua en las tres líneas de cáncer humano evaluadas: una leucemia y dos cáncer de mama, mientras que la isoforma L también lo estuvo en las líneas de cáncer mamario. El conocimiento del patrón isoenzimático en células tumorales y su comparación con el de tejidos y células normales, podría tener incidencia en el pronóstico y evolución clínica de los pacientes si se detectaran cambios asociados con la transformación maligna.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo policlonal **caracterizado** porque es anti K-PAG humano, obtenible mediante la inmunización de mamíferos con la proteína recombinante expresada en bacterias con la secuencia SEQ ID NO 1, a la que se le han añadido 6 residuos de Histidina en el extremo amino terminal para poder ser purificada por afinidad.

2. Anticuerpo policlonal **caracterizado** porque es anti L-PAG humano, obtenible mediante la inmunización de mamíferos con la proteína recombinante de la secuencia SEQ ID NO 2, tras ser expresada en bacterias, aislada de los cuerpos de inclusión y purificada por SDS-PAGE.

3. Anticuerpo policlonal monespecífico **caracterizado** porque es anti L-PAG humano, obtenible mediante la inmunización de mamíferos con una proteína conjugada con el péptido de la secuencia SEQ ID NO 3.

4. Anticuerpo policlonal monespecífico **caracterizado** porque es anti L-PAG humano, obtenible mediante la inmunización de mamíferos con una proteína conjugada con el péptido de la secuencia SEQ ID NO 4.

5. Anticuerpo policlonal según las reivindicaciones 3 y 4, donde la proteína conjugada es hemocianina de lapa (KLH, "Keyhole Limpet Hemocyanin").

6. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dichos mamíferos son conejos.

7. Método de determinación del patrón isoenzimático y la localización regional, celular y subcelular de glutaminasa en tejidos y células en cultivo de mamíferos, **caracterizado** porque comprende los pasos siguientes:

(a) la puesta en contacto de una muestra de tejido, células o de un extracto tisular o celular con una serie de anticuerpos policlonales, elegidos entre el conjunto de anticuerpos disponibles en el momento de la determinación, siendo cada uno de ellos capaz de reconocer un epítopo específico de una de las isoenzimas de glutaminasa, durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para garantizar la formación de complejos antígeno-anticuerpo, y la detección de la formación de los complejos;

(b) la determinación cualitativa o cuantitativa del patrón de expresión de las isoenzimas de glutaminasa en dicha muestra o extracto, para la serie de anticuerpos seleccionada;

(c) la determinación de la localización regional, celular y subcelular de las isoenzimas de glutaminasa en tejidos o células de mamíferos, para la serie de anticuerpos seleccionada.

8. Método según la reivindicación 7, donde la detección de la formación del complejo en el paso (a) se realiza mediante una técnica seleccionada de entre un grupo que incluye el ensayo inmunoenzimático y ensayo inmunofluorescente.

9. Método según la reivindicación 8, donde la técnica de detección es ensayo inmunoenzimático.

10. Método según la reivindicación 8, donde la técnica de detección es ensayo inmunofluorescente.

11. Método según las reivindicaciones 7-10, donde en el paso (b) el establecimiento del patrón se realiza cualitativamente mediante inspección ocular.

12. Método según las reivindicaciones 7-10, donde en el paso (c) el establecimiento de la localización regional, celular y subcelular se realiza mediante microscopía óptica, electrónica o confocal.

13. Método según las reivindicaciones 7-12, donde la serie de anticuerpos disponibles comprende los anticuerpos policlonales siguientes: anti K-$PAG_{551-669}$, anti L-PAG_{1-602}, anti L-$PAG_{462-485}$ Y anti L-$PAG_{583-602}$.

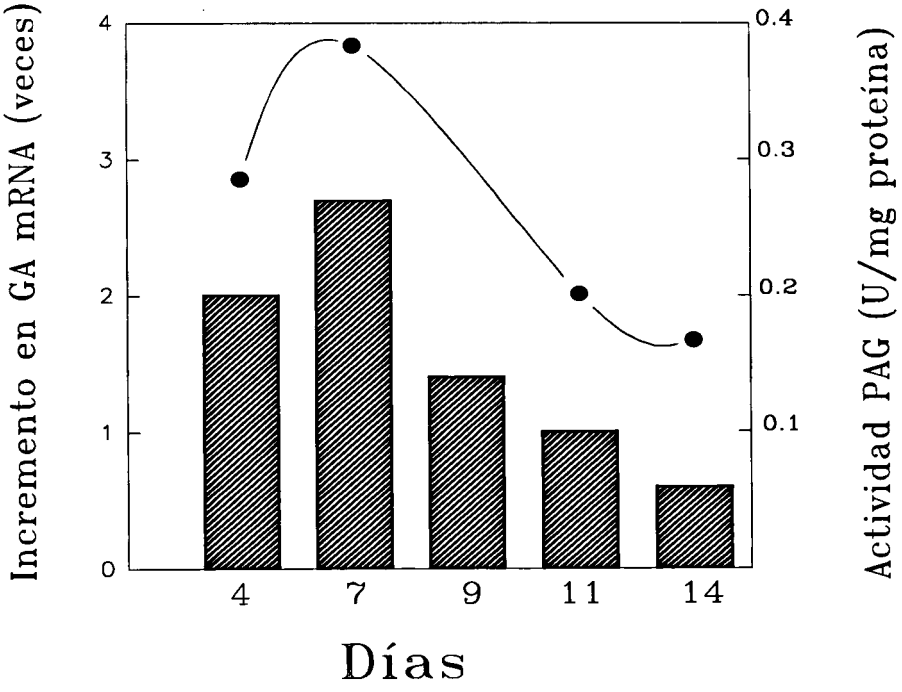
Incremento en GA mRNA (veces)
Actividad PAG (U/mg proteína)
0
1
2
3
4
0.1
0.2
0.3
0.4
4
7
9
11
14
Días

Fig. 1

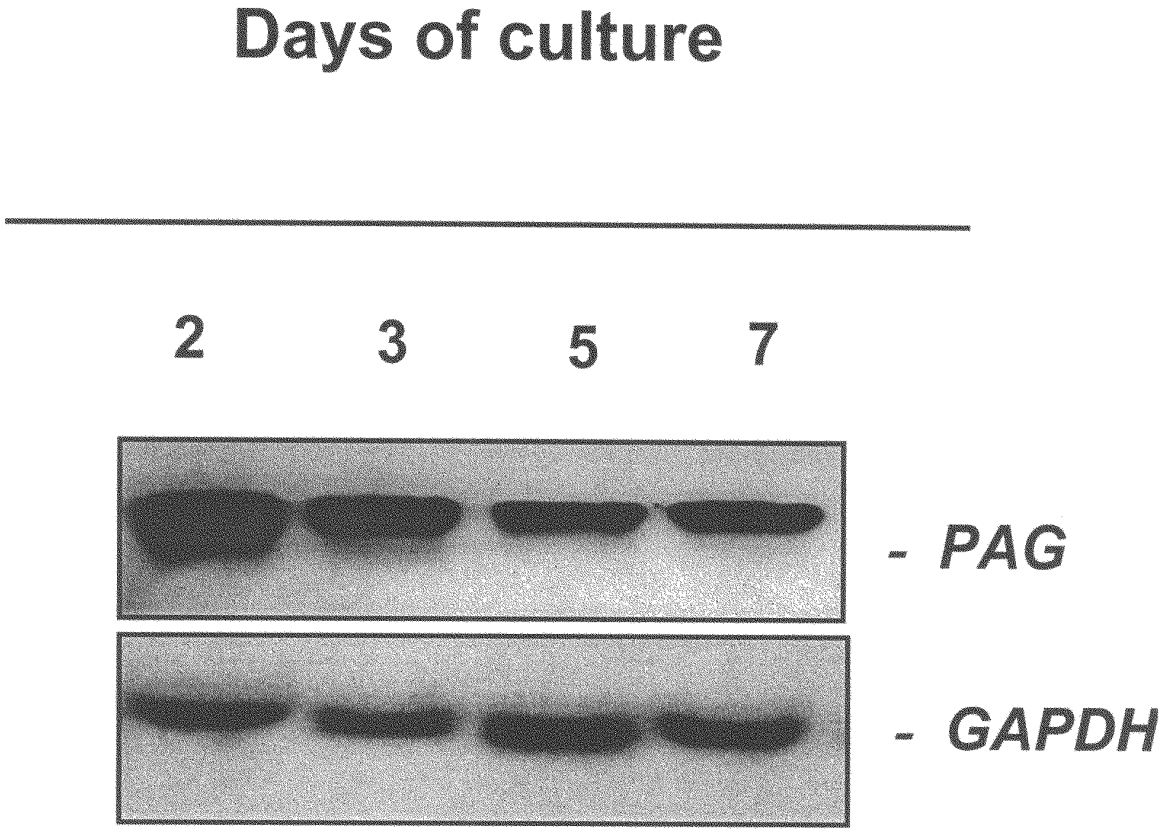

Fig. 2

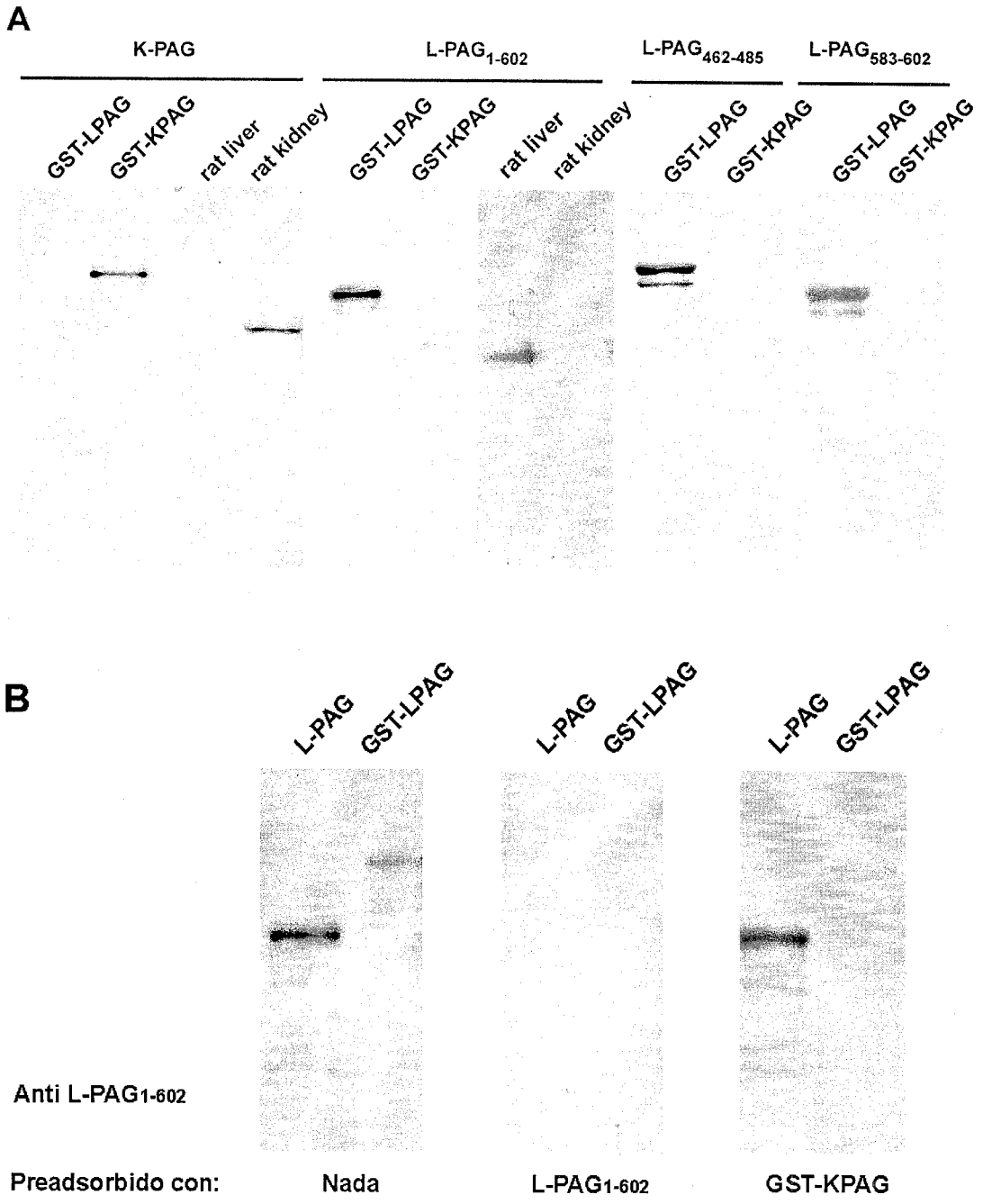
A
K-PAG
L-PAG1-602
L-PAG462-485
L-PAG583-602
GST-LPAG
GST-KPAG
rat liver
rat kidney
GST-LPAG
GST-KPAG
rat liver
rat kidney
GST-LPAG
GST-KPAG
GST-LPAG
GST-KPAG
B
L-PAG
GST-LPAG
L-PAG
GST-LPAG
L-PAG
GST-LPAG
Anti L-PAG1-602
Preadsorbido con:
Nada
L-PAG1-602
GST-KPAG

Fig. 3

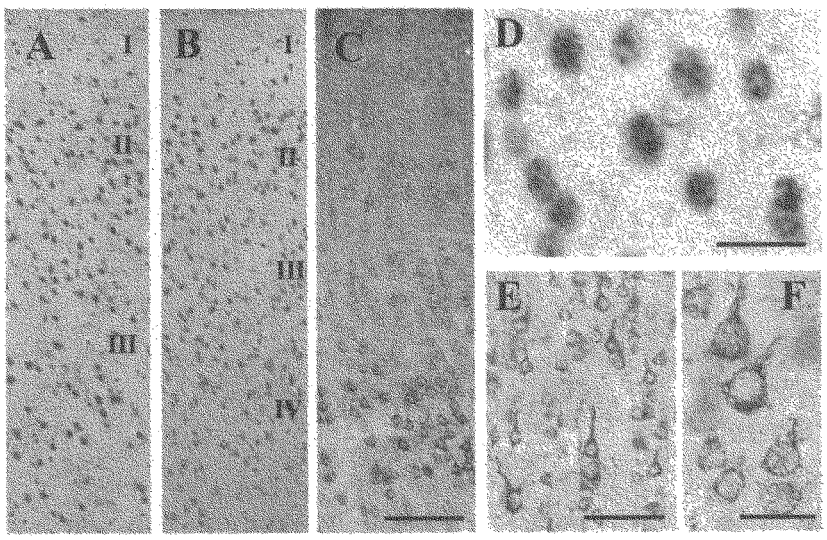

Fig. 4

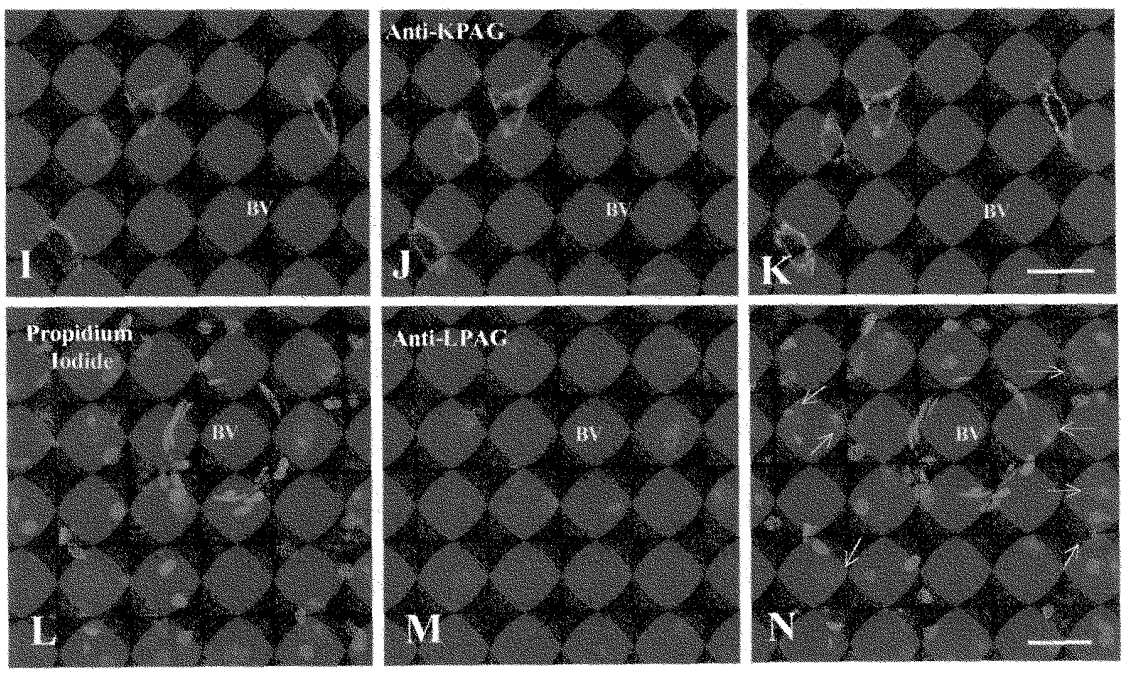

Fig. 5

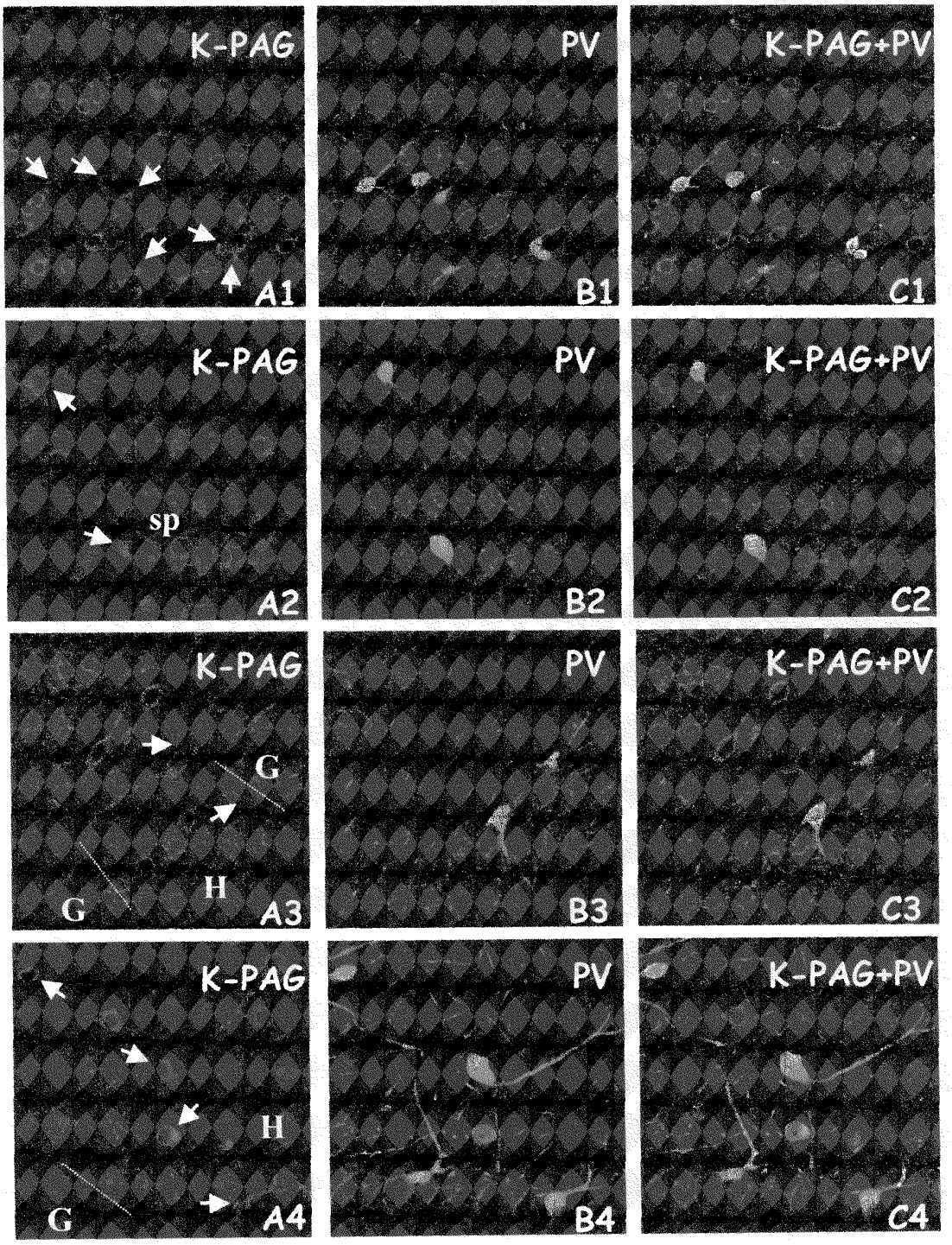
K-PAG
PV
K-PAG+PV
A1
B1
C1
K-PAG
PV
K-PAG+PV
sp
A2
B2
C2
K-PAG
PV
K-PAG+PV
G
H
G
A3
B3
C3
K-PAG
PV
K-PAG+PV
H
G
A4
B4
C4

Fig. 6

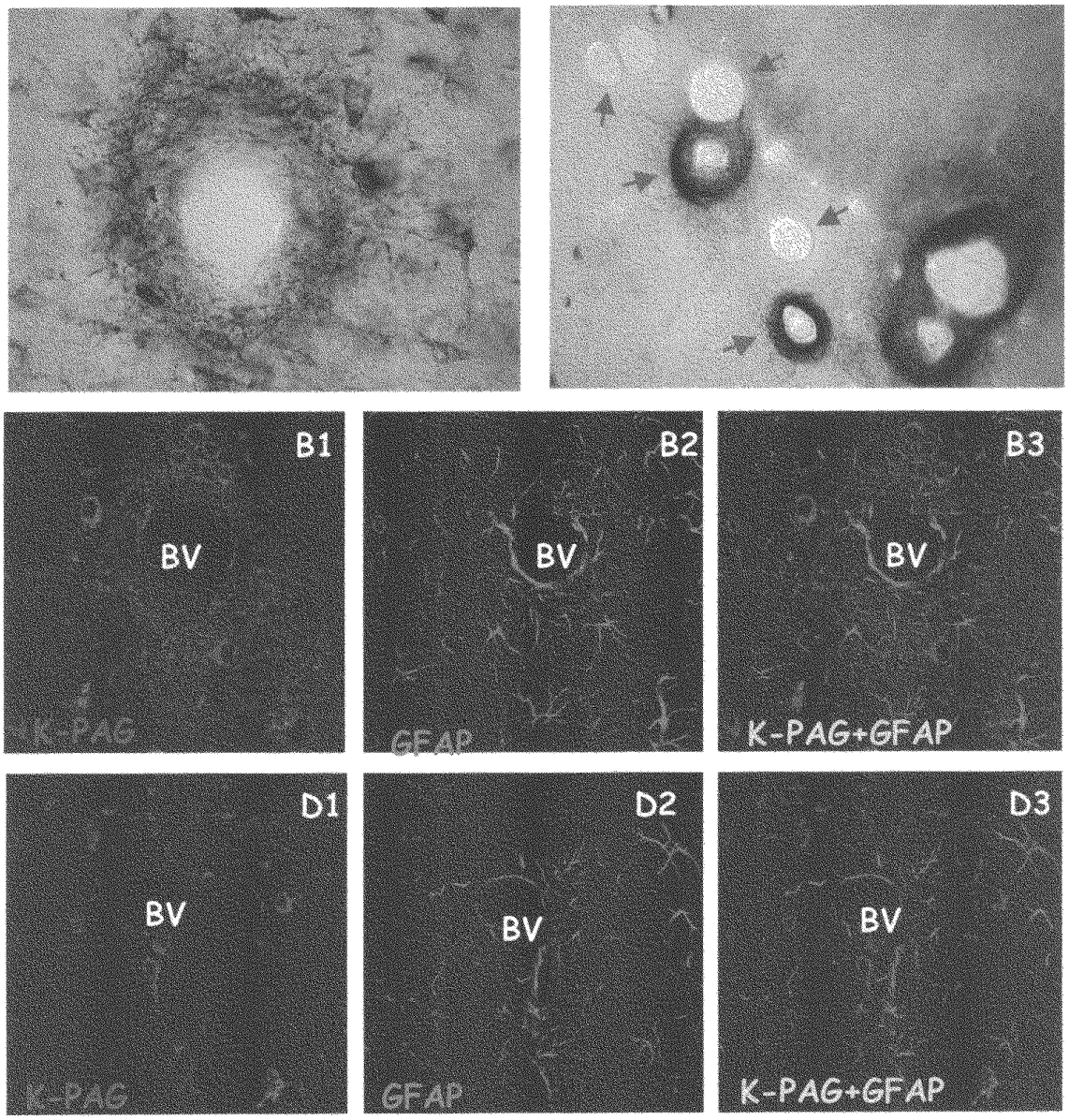
B1
BV
K-PAG
B2
BV
GFAP
B3
BV
K-PAG+GFAP
D1
BV
K-PAG
D2
BV
GFAP
D3
BV
K-PAG+GFAP

Fig. 7

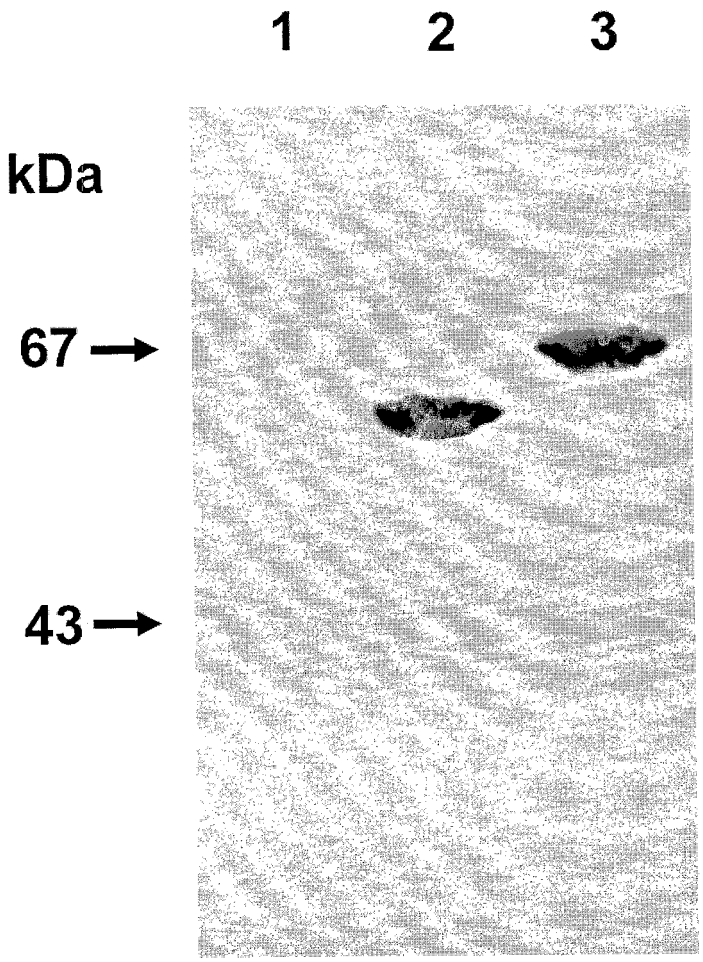

Fig. 8

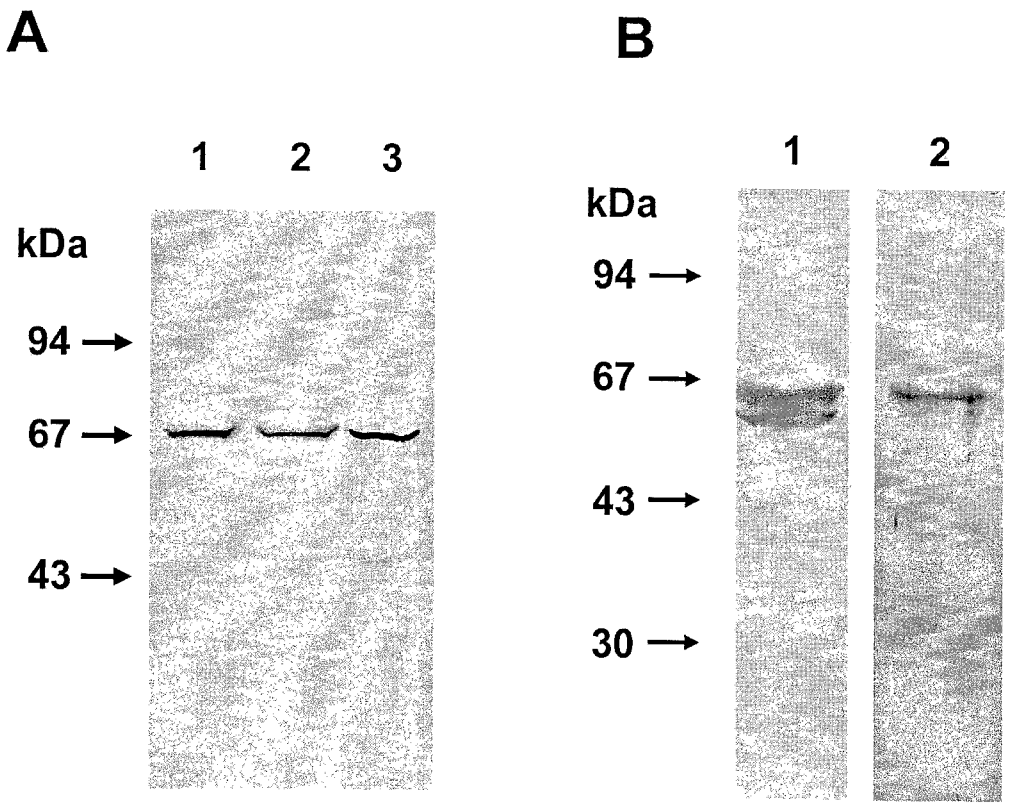

Fig. 9

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Málaga
<120> Anticuerpos isoenzima-específicos frente a la glutaminasa humana tipos K y L
<160> 4
<170> PatentIn versión 2.1

<210> 1

<211> 119
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Val Lys Ser Val Ile Asn Leu Leu Phe Ala Ala Tyr Thr Gly Asp Val
 1               5                  10                  15

Ser Ala Leu Arg Arg Phe Ala Leu Ser Ala Met Asp Met Glu Gln Arg
            20                  25                  30

Asp Tyr Asp Ser Arg Thr Ala Leu His Val Ala Ala Ala Glu Gly His
        35                  40                  45

Val Glu Val Val Lys Phe Leu Leu Glu Ala Cys Lys Val Asn Pro Phe
    50                  55                  60

Pro Lys Asp Arg Trp Asn Asn Thr Pro Met Asp Glu Ala Leu His Phe
65                  70                  75                  80

Gly His His Asp Val Phe Lys Ile Leu Gln Glu Tyr Gln Val Gln Tyr
                85                  90                  95

Thr Pro Gln Gly Asp Ser Asp Asn Gly Lys Glu Asn Gln Thr Val His
            100                 105                 110

Lys Asn Leu Asp Gly Leu Leu
        115
```

<210> 2
<211> 602
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Met Arg Ser Met Lys Ala Leu Gln Lys Ala Leu Ser Arg Ala Gly Ser
 1               5                  10                  15

His Cys Gly Arg Gly Gly Trp Gly His Pro Ser Arg Ser Pro Leu Leu
            20                  25                  30

Gly Gly Gly Val Arg His His Leu Ser Glu Ala Ala Ala Gln Gly Arg
        35                  40                  45

Glu Thr Pro His Ser His Gln Pro Gln His Gln Asp His Asp Ser Ser
    50                  55                  60

Glu Ser Gly Met Leu Ser Arg Leu Gly Asp Leu Leu Phe Tyr Thr Ile
65                  70                  75                  80

Ala Glu Gly Gln Glu Arg Thr Pro Ile His Lys Phe Thr Thr Ala Leu
                85                  90                  95

Lys Ala Thr Gly Leu Gln Thr Ser Asp Pro Arg Leu Arg Asp Cys Met
            100                 105                 110

Ser Glu Met His Arg Val Val Gln Glu Ser Ser Ser Gly Gly Leu Leu
        115                 120                 125
```

Asp Arg Asp Leu Phe Arg Lys Cys Val Ser Ser Ser Ile Val Leu Leu
130 135 140

Thr Gln Ala Phe Arg Lys Lys Phe Val Ile Pro Asp Phe Glu Glu Phe
145 150 155 160

Thr Gly His Val Asp Arg Ile Phe Glu Asp Val Lys Glu Leu Thr Gly
165 170 175

Gly Lys Val Ala Ala Tyr Ile Pro Gln Leu Ala Lys Ser Asn Pro Asp
180 185 190

Leu Trp Gly Val Ser Leu Cys Thr Val Asp Gly Gln Arg His Ser Val
195 200 205

Gly His Thr Lys Ile Pro Phe Cys Leu Gln Ser Cys Val Lys Pro Leu
210 215 220

Thr Tyr Ala Ile Ser Ile Ser Thr Leu Gly Thr Asp Tyr Val His Lys
225 230 235 240

Phe Val Gly Lys Glu Pro Ser Gly Leu Arg Tyr Asn Lys Leu Ser Leu
245 250 255

Asp Glu Glu Gly Ile Pro His Asn Pro Met Val Asn Ala Gly Ala Ile
260 265 270

Val Val Ser Ser Leu Ile Lys Met Asp Cys Asn Lys Ala Glu Lys Phe
275 280 285

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

Gly Phe Ser Asn Ala Thr Phe Gln Ser Glu Lys Glu Thr Gly Asp Arg
305 310 315 320

Asn Tyr Ala Ile Gly Tyr Tyr His Glu Glu Lys Lys Cys Phe Pro Lys
325 330 335

Gly Val Asp Met Met Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Phe Gln Leu Cys Ser
340 345 350

Val Glu Val Thr Cys Glu Ser Gly Ser Val Met Ala Ala Thr Leu Ala
355 360 365

Asn Gly Gly Ile Cys Pro Ile Thr Gly Glu Ser Val Leu Ser Ala Glu
370 375 380

Ala Val Arg Asn Thr Leu Ser Leu Met His Ser Cys Gly Met Tyr Asp
385 390 395 400

Phe Ser Gly Gln Phe Ala Phe His Val Gly Leu Pro Ala Lys Ser Ala
405 410 415

Val Ser Gly Ala Ile Leu Leu Val Val Pro Asn Val Met Gly Met Met
420 425 430

Cys Leu Ser Pro Pro Leu Asp Lys Leu Gly Asn Ser His Arg Gly Thr
435 440 445

Ser Phe Cys Gln Lys Leu Val Ser Leu Phe Asn Phe His Asn Tyr Asp
450 455 460

Asn Leu Arg His Cys Ala Arg Lys Leu Asp Pro Arg Arg Glu Gly Ala
465 470 475 480

Glu Ile Arg Asn Lys Thr Val Val Asn Leu Leu Phe Ala Ala Tyr Ser
485 490 495

Gly Asp Val Ser Ala Leu Arg Arg Phe Ala Leu Ser Ala Met Asp Met
500 505 510

Glu Gln Lys Asp Tyr Asp Ser Arg Thr Ala Leu His Val Ala Ala Ala
515 520 525

Glu Gly His Ile Glu Val Val Lys Phe Leu Ile Glu Ala Cys Lys Val
530 535 540

Asn Pro Phe Ala Lys Asp Arg Trp Gly Asn Ile Pro Leu Asp Asp Ala
545 550 555 560

Val Gln Phe Asn His Leu Glu Val Val Lys Leu Leu Gln Asp Tyr Gln
565 570 575

Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Glu Thr Gln Ala Glu Ala Ala Ala Glu Ala
580 585 590

Leu Ser Lys Glu Asn Leu Glu Ser Met Val
595 600

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 3

Asn Tyr Asp Asn Leu Arg His Cys Ala Arg Lys Leu Asp Pro Arg Arg
1 5 10 15

Glu Gly Ala Glu Ile Arg Asn Lys
20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 4

Glu Thr Gln Ala Glu Ala Ala Ala Glu Ala Leu Ser Lys Glu Asn Leu
1 5 10 15

Glu Ser Met Val
20

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 230 954

(21) Nº de solicitud: 200201819

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **01.08.2002**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.[7]:** C07K 16/30, G01N 33/573, 33/574

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	OLALLA, L. et al. "The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins". FEBS LETTERS. 2001. Vol. 488, páginas 116-122, todo el documento.	2,5-13
X	GÓMEZ-FABRE, P.M. et al. "Molecular cloning, sequencing and expression studies of the human breast cancer cell glutaminase". BIOCHEMICAL JOURNAL. 2000. Vol. 345, páginas 365-375, todo el documento.	7-13

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	Examinador	Página
30.03.2005	M. Novoa Sanjurjo	1/1