

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 319 586**

21 Número de solicitud: 200600378

51 Int. Cl.:
C07K 16/40 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.02.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.05.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.05.2009

71 Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III
c/ Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES
Universidad de Málaga**

72 Inventor/es: **Domínguez Rodríguez, Mercedes;
Toraño García, Alfredo;
Moreno Iruela, Inmaculada;
Díez Lorenzo, Manuela;
Sánchez Jiménez, Francisca María y
Urdiales Ruiz, José Luis**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método de obtención de anticuerpos anti-hHDC y aplicaciones de los mismos.**

57 Resumen:

Método de obtención de anticuerpos anti-hHDC y aplicaciones de los mismos. La presente invención proporciona un método para la obtención de anticuerpos, mono y/o policlonales, que interaccionan frente a la histidina descarboxilasa humana (hHDC), así como los polinucleótidos y polipéptidos necesarios para llevarlo a cabo. Del mismo modo, los usos de los mencionados anticuerpos, así como los kits de diagnóstico de los que formen parte también son objeto de la presente invención.

ES 2 319 586 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de anticuerpos anti-hHDC y aplicaciones de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona un método para la obtención de anticuerpos específicos frente a la histidina descarboxilasa humana (hHDC), así como los polinucleótidos y polipéptidos necesarios para llevarlo a cabo. Del mismo modo, los usos de los mencionados anticuerpos, así como los kits de diagnóstico de los que formen parte también son objeto de la presente invención.

Estado de la técnica

En las células de mamíferos, la forma activa de la histidina descarboxilasa (HDC) (E.C. 4.1.1.22, según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica) es una proteína homodimérica de aproximadamente 110 kDa, muy minoritaria (menos de 0.001% del contenido proteico celular), cuya actividad depende de piridoxalfosfato o PLP. La HDC cataliza el paso de L-histidina a histamina mediante la descarboxilación de la primera, y se expresa con actividad apreciable en un reducido grupo de tipos celulares: algunas células del sistema nervioso central y periférico, algunos leucocitos - basófilos, mastocitos, macrófagos -, epitelios digestivos, y algunos tipos de neuronas y células cancerosas desdiferenciadas.

Estudios recientes con ratones que tienen anulada la expresión de la histidina descarboxilasa (ratones knock-out)(Hiroshi Ohtsu *et al.* 2003, Biochemical and Biophysical Research Communications 305 (2003) 443-447 New functions of histamine found in histidine decarboxylase) indican que la histamina está implicada en procesos tales como la maduración de los mastocitos, la reabsorción de la médula ósea, la transmisión sinóptica de los tipos neuronales, y la progresión e invasión de tejidos cancerosos (Schneider *et al.* (2002) Trends Immunol. 23: 255-263; Ohtsu & Watanebe (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 305: 443-447; Fitzpartick *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 6027-6032). La HDC está, por lo tanto, implicada en multitud de procesos inflamatorios, cancerosos y en diversas neuropatías.

Es bien sabido que la HDC, especialmente la HDC humana (hHDC), muestra una gran inestabilidad tanto *in vivo* como en extractos libres de células, lo cual dificulta considerablemente su purificación y caracterización. Hasta el momento, la única posibilidad que existe para caracterizar estructuralmente la enzima se basa en generar modelos tridimensionales mediante aproximaciones bioinformáticas (Moya-García *et al.* BioEssays (2005) 27: 57-63). La proteína nativa no se obtuvo a partir de tejidos de mamíferos hasta 1984, (Taguchi *et al.* (1984) J. Biochem, 259: 5214-5221), cuando se purificó parcialmente tras ocho pasos de purificación obteniéndose un total de 940 microgramos de HDC a partir de 400 g de hígado fetal de rata.

Años más tarde, Ohmori y colaboradores (Ohmori *et al.* (1990) J. Biochem. 107: 834-839) purificaron a homogeneidad la enzima HDC de ratón a partir de 9×10^{10} células mastocíticas de ratón P-815 recogidas del líquido ascítico de 250 ratones previamente inoculados con 4,5 millones de células/ratón. En este caso, y tras nueve pasos de purificación, sólo se obtuvieron 15 microgramos de HDC.

En 1991, Zahnow y colaboradores (Zahnow *et al.* (1991) DNA Seq. 1: 395-400) obtuvieron la secuencia del mensajero de la hHDC, y en 1994, Yatsunami y colaboradores (Yatsunami *et al.* (1994) J. Biol. Chem. 269: 1554-1559) aislaron 24 Kb del gen humano localizado en el cromosoma 15.

En mamíferos, los cDNAs aislados que codifican para HDC dan lugar a un péptido primario de entre 74 y 77 KDa muy inestable, que está presente en un porcentaje muy minoritario en las células productoras de histamina. Este péptido primario sufre un proceso de proteólisis parcial, a partir del cual se genera el monómero nativo de HDC de 53-57 KDa que forma parte de la proteína activa. Péptidos de menor tamaño que suelen detectarse en extractos de células de mamíferos, son productos de la digestión de la enzima activa que posee una vida media muy corta (2-4 horas) y es sustrato de distintos sistemas proteolíticos (Moya-García *et al.* (2005) BioEssays 27: 57-63).

Se sabe que el producto primario de la traducción de la HDC no es activo, ya que el extremo carboxilo impide la recepción del sustrato, por lo que la enzima debe perder, al menos, 5-10 KDa de su extremo carboxilo para poder ser activa. Con versiones recombinantes del enzima purificada, la máxima actividad se obtiene con HDC de mamíferos que conservan su secuencia primaria desde el residuo 69 al 515, y poseen un peso molecular aproximado de 50 KDa (Engel *et al.* (1996) Biochem. J. 320: 365-368; Olmo *et al.* (2000) Eur. J. Biochem. 267: 1527-1531; Fleming *et al.* (2004) Biochem. J. 381: 769-778).

A los inconvenientes derivados de las propiedades bioquímicas de HDC (inestabilidad, adhesión, etc.) hay que añadir que las células que expresan la enzima se encuentran generalmente dispersas y en minoría entre otros tipos celulares productores de histamina (médula ósea, sangre, epitelios, estómago, cerebro). En el caso de la hHDC, se suman las dificultades de accesibilidad a tejidos frescos, por lo que la obtención de anticuerpos frente a dicha enzima se convierte en una empresa extremadamente ardua.

ES 2 319 586 A1

En la solicitud de patente española ES 2 135 350 se desarrolla un método para obtener anticuerpos anti-HDC frente a proteínas recombinantes, que reconocen la HDC de ratón pero no lo hacen con la versión humana de la enzima.

La solicitud de PCT de número de publicación WO-98/30593, detalla la obtención de anticuerpos policlonales específicos contra hHDC que han sido utilizados en el desarrollo de ensayo de detección de cáncer; dicha publicación, detalla un método para obtener anticuerpos que reaccionan frente a regiones de hHDC distintas a las que son reconocidas por los anticuerpos cuya obtención describe la presente solicitud.

Por último, cabe mencionar que en 1995 Kimio Yatsunami y colaboradores (Yatsunami *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270 (51): 30813-30817) desarrollaron anticuerpos monoclonales (AcM) frente a hHDC usando como inmunógeno un péptido conservado en las secuencias de HDC de humano (residuos 218-232), ratón (residuos 225-239), y rata (residuos 221-235). Dicho AcM sólo reconocía HDC en estado desnaturalizado.

Los anticuerpos anti-HDC comerciales, en general, sólo detectan HDC de rata (ES 2 135 350, Dartsch *et al.* (1999) Histochem J. 31: 507-14), y si reconocen a la hHDC, lo hacen en su estado desnaturalizado. Por estas razones, es imprescindible poseer AcM que reconozcan a la hHDC en su conformación activa para estudiar al enzima y analizar su participación en procesos patológicos en los que pudiera estar implicada, tales como degeneraciones neurológicas (esquizofrenia, trastornos de la memoria, etc.), procesos alérgicos, degeneración de epitelios digestivos (ulcera gástrica, síndrome de Crohn, etc), algunos tipos de cáncer (cáncer de colon, leucemias blastocíticas y mastocítica), etc.

Descripción de la invención

Definiciones

Anticuerpo: a lo largo de la descripción, este término hará referencia tanto a anticuerpos monoclonales como policlonales.

Fragmentos del polinucleótido: a lo largo de la descripción, este término hará referencia todos aquellos fragmentos de SEQ ID 1 capaces de codificar para un polipéptido para la generación de anticuerpos específicos frente a hHDC.

Fragmentos del polipéptido: a lo largo de la descripción este término, hará referencia todos aquellos fragmentos de SEQ ID 2 capaces de producir anticuerpos específicos frente a hHDC.

Fragmentos de anticuerpos: a lo largo de la descripción, este término hará referencia a todos aquellos fragmentos de anticuerpos capaces interaccionar frente a SEQ ID 2 y fragmentos de la misma, donde dichos fragmentos comprenden las regiones variables Vh y/o Vl.

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia de hHDC se conoce desde hace una década, y como resultado de los estudios realizados para llevar a cabo la presente invención, se han podido deducir fragmentos polipeptídicos que ha de conservar la enzima para mantener su actividad; este hecho ha permitido realizar análisis bioinformáticos de comparación entre las secuencias codificantes de HDC de rata y humana, y predecir qué epítopos de la proteína activa poseían mayor potencial inmunogénico para desarrollar anticuerpos frente a hHDC. A partir de este estudio se eligió como inmunógeno el polipéptido constituido por los residuos aminoacídicos 492-506 (SEQ ID 2) de hHDC, codificado por el polinucleótido de SEQ ID 1, y se desarrolló un método para la obtención de anticuerpos anti-hHDC y/o fragmentos de los mismos que reaccionan frente al polipéptido seleccionado.

En este sentido, un primer aspecto de la invención se relaciona un polinucleótido, en adelante “polinucleótido de la invención”, capaz de codificar un polipéptido capaz de anticuerpos específicos frente a hHDC, donde la secuencia de dicho polinucleótido es elegida del grupo: a) Secuencia que comprende SEQ ID 1, b) Secuencia que consiste en SEQ ID 1 o comprende fragmentos de ésta, c) Secuencia que difiera de cualquiera de las secuencias a o b debido a la degeneración del código genético, o d) Secuencias que compartan al menos un 80%, 90%, 95% ó 98% de homología con a, b o c.

Un segundo aspecto de la invención se relaciona con un polipéptido, en adelante “polipéptido de la invención”, capaz de generar anticuerpos específicos frente a hHDC, donde la secuencia de dicho polipéptido es elegida del grupo: a) Secuencia que comprende SEQ ID 2, b) Secuencia que consiste en SEQ ID 2 o comprende fragmentos de ésta, c) Secuencia que comparta al menos un 80%, 90%, 95% ó 98% de homología con la secuencia a o b.

Un tercer aspecto de la invención se relaciona con un método, en adelante “método de la invención”, para la obtención de anticuerpos y/o fragmentos de los mismos frente a hHDC, que comprende la utilización del polipéptido de la invención y/o fragmentos del mismo. Dicho polipéptido y sus fragmentos pueden ser obtenidos mediante síntesis química y/o transformación bacteriana con el polinucleótido de la invención o fragmentos del mismo. Preferentemente, dicha transformación comprende la unión mediante técnicas de ADN recombinante del polinucleótido de la invención o fragmentos del mismo a vectores que comprenden pero no se limitan a plásmidos, cósmidos, derivados del fago lambda, fagémidos, entre otros. En una realización preferida de este aspecto de la invención el método de obtención de anticuerpos y/o fragmentos de los mismos está basado en técnicas que comprenden pero no se limitan a: técnicas de inmunización de mamíferos no humanos, generación de hibridomas por fusión celular, métodos de “phage display”, etc. En una realización más preferida de este aspecto de la invención éste comprende el uso del polipéptido de la

invención o fragmentos del mismo en combinación con al menos una proteína transportadora, que comprende pero no se limita a albúmina de huevo de pollo (OVA), albúmina sérica bovina (BSA), hemocianina de la lapa californiana *Megatura cranulatus* (KLH, Pierce), etc.

5 Un cuarto aspecto de la invención se relaciona con anticuerpos, en adelante “anticuerpos de la invención”, y/o fragmentos de los mismos específicos frente a hHDC que interactúan específicamente frente a cualquiera de los polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos. Preferentemente, dichos fragmentos de anticuerpos comprenden las regiones variables Vc y/o VI.

10 Un quinto aspecto de la invención está relacionado con el uso de los anticuerpos de la invención y/o fragmentos de los mismos para el diagnóstico *in vitro* y/o *in vivo*.

15 Un sexto aspecto de la invención está relacionado con el uso de los anticuerpos de la invención y/o fragmentos de los mismos para la fabricación de un medicamento para su uso en terapia. Dicho medicamento puede ser empleado para el tratamiento de enfermedades, que comprenden pero no se limitan a patologías relacionadas con la degeneración neurológica (Alzheimer, Parkinson, trastornos de la memoria), anafilaxis y procesos alérgicos, degeneración de epitelios digestivos (úlceras gástricas, síndrome de Crohn, etc), procesos infecciosos (salmonelosis, campilobacteriosis, enterotoxemia, etc.), diferentes tipos de cáncer (cáncer de colon, mieloma, melanoma, leucemias blastocíticas y mastocítica, linfoma, etc), etc.

20 Un séptimo aspecto de la invención se relaciona con un kit de análisis que comprenda los “anticuerpos de la invención” y/o fragmentos de los mismos. Del mismo modo, el kit puede incluir todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo la puesta a punto del kit, esto incluye, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado, el kit también puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

Descripción de las figuras

30 Figura 1. Inmunotransferencia (“Western blot”) con los anticuerpos de la invención. En las calles 1 se muestra la detección de GST-1/152hHDC purificada y en las calles 2 se muestra la detección de extractos de células HMC-1. Las calles 3 se corresponde con el patrón de pesos moleculares. En el panel A, el revelado fue realizado con un anticuerpo monoclonal antifactor H de conejo (IgG2a), que es empleado como control negativo del ensayo, no apareciendo señal de interacción de la proteína con el antifactor H. El panel B es revelado con el anticuerpo AcM SIM 216-12.1 (IgG2a), apareciendo en este caso claras bandas de interacción anticuerpo-proteína.

35 Figura 2. Inmunotransferencia (“Western blot”) que muestra la detección de inmunoprecipitados, de las líneas de leucémicas basófilas HMC-1 y KU-812F productoras de hHDC. El inmunoreconocimiento se realizó con el anticuerpo monoclonal SIM 216-12.1. En ambas calles se muestra la detección de hHDC, observándose 3 bandas mayoritarias. La mayor de las bandas se corresponde con el tamaño esperado para el monómero maduro de hHDC y las dos inferiores con las formas degradadas de la proteína.

40 Figura 3. Inmunotransferencia (“Western blot”) de extractos celulares de HEK-293 transfectados transitoriamente con pcDNA3-1/512hHDC (calle 1), pcDNA3-1/512 (calle 2) o pEGFP (calle 3, control negativo). La detección hHDC para los diferentes extractos celulares es llevada a cabo con AcM SIM 216-12.1, encontrándose bandas claramente diferenciadas en las calles 1 y 2 correspondientes la interacción anticuerpo-hHDC. Las bandas superiores se corresponden con el tamaño esperado para el monómero maduro de hHDC y las inferiores a las formas degradadas de éste.

45 Figura 4. Conocimiento de hHDC en células HEK-293 transfectadas con pcDNA3-1/512hHDC, que expresan transitoriamente dicha proteína, mediante el empleo de AcM SIM 216-12.1. El panel A muestra la no emisión de fluorescencia por células no transfectadas y el panel B muestra la emisión de fluorescencia procedente del citoplasma de células transfectadas.

Explicación detallada de la invención

55 Los siguientes ejemplos de realización no pretenden limitar la invención sino ilustrarla para su mejor comprensión.

Ejemplo 1

60 Obtención de anticuerpos frente a hHDC

1.1. Inmunización

65 El péptido elegido como inmunógeno (SEQ ID 2) que comprende los aminoácidos 492 a 506 de hHDC se acopla mediante el reactivo entrecruzante, sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate; Pierce, No 22322), a una proteína portadora, preferentemente OVA, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

ES 2 319 586 A1

Para la inmunización se eligen mamíferos no humanos, preferentemente ratones y más preferentemente hembras de la cepa BALB/c. Los mamíferos no humanos son inmunizados vía intraperitoneal para la obtención de anticuerpos policlonales o monoclonales anti-hHDC. A la semana de la segunda inmunización, se realiza una sangría para la determinación título y reactividad de anticuerpos presente en el suero del ratón. Esta determinación puede ser llevada a cabo mediante diferentes técnicas sobradamente conocidas en el estado de la técnica, tales como inmunoensayo tipo ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) indirecto frente al péptido de la invención conjugado con otra proteína distinta de OVA. A partir de estos ensayos, el ratón con un suero de mayor título de anticuerpos es elegido como donante de linfocitos B, para la obtención de anticuerpos monoclonales, o para la obtención de anticuerpos policlonales a partir del suero.

1.2. Fusión de linfocitos B

Los linfocitos B son fusionados con células de mieloma, preferentemente las células de mieloma Sp2/0-Ag-14 según los procedimientos descritos en Galfré y Milstein (1981) *Method Enzymol* 73:3-47 y J. Goding (1980) *J. Immunol. Methods* 30: 285-308, con el fin de obtener híbridos productores de anticuerpos anti-hHDC.

1.3. Selección de Hibridomas productores y ensayos de especificidad

La selección de hibridomas productores de los anticuerpos de la invención se lleva a cabo mediante diferentes técnicas. Preferentemente, las técnicas elegidas para la realización de esta selección son: a) ELISA, empleando como antígeno el conjugado del “péptido de la invención” con BSA, b) citometría de flujo con células de la línea HMC-1, y c) inmunotransferencia “Western-blot” con extractos de células HMC-1 o de la proteína de fusión GTS-1/512hHDC. Finalmente, los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, con el fin de estabilizarlos, se clonan dos veces por dilución límite en medio líquido, se determina el isotipo, y se almacenan en nitrógeno líquido.

Mediante estas pruebas se eligieron diferentes anticuerpos monoclonales, y a partir de los mismos se seleccionó el anticuerpo monoclonal que, en adelante, denominaremos como AcM SIM 216-12.1, que es el utilizado en los siguientes ensayos.

1.3.a) Ensayo de especificidad por Inmunotransferencia (“Western-blot”)

En primer lugar se obtuvo un plásmido recombinante fusionando los 512 residuos de la proteína hHDC, que denominaremos 1/512hHDC, con un vector - preferentemente el vector pGEX de Pharmacia - que permite la obtención en masa del fragmento recombinante de 512 aminoácidos de la hHDC; la proteína de fusión expresada a partir de dicho plásmido se denominará GTS- 1/512hHDC. Los procedimientos de extracción, manipulación, recombinación *in vitro* de ADN y transformación bacteriana para la obtención en masa del producto recombinante son descritos en la solicitud de patente española 9800019, empleándose como fuente principal de ARN mensajero de hHDC células de la línea basófila HMC-1. A partir de los cultivos de *E. Coli* BL21(DE3)pLysS transformados con pGEX recombinado con el fragmento de 1/512hHDC, en los que se había inducido la expresión de la proteína de fusión GTS-1/512hHDC por adición de IPTG al medio, se preparan extractos bacterianos, y éstos se someten a cromatografía de afinidad en columna de glutation-sepharosa (Amersham Biosciences) para aislar la proteína GTS-1/512hHDC.

La proteína GTS-1/512hHDC aislada y un extracto celular de células HMC-1 que expresan hHDC, se sometieron a electroforesis desnaturante (SDS/PAGE) seguida de transferencia a nitrocelulosa y análisis por “Western blot” con los anticuerpos de la invención y con un anticuerpo inespecífico que no reconoce a hHDC y sirve de control negativo (Fig 1).

El resultado del análisis (Panel A) muestra que el anticuerpo inespecífico no muestra señales de reconocimiento ni con hHDC (calle 1) ni con GTS-1/512hHDC (calle 2); en el Panel B, se observa que el AcM SIM 216-12.1 detecta tanto GTS-1/512hHDC como hHDC procedente de las células HMC-1, ésta última con menor intensidad.

Ejemplo 2

Especificidad de los anticuerpos frente a hHDC

2.1. Ensayos de Inmunotransferencia (“Western-blot”)

Para corroborar la especificidad del AcM SIM 216-12.1 aislado frente hHDC, se procedió a realizar distintas pruebas.

Recolección de inmunoprecipitados: en primer lugar se obtuvieron extractos celulares de las líneas HMC-1 y KU-182F, ambas productoras de hHDC, con un tampón de lisis denominado “tampón de lisis II” de composición Tris 20 mM, NaCl 137 mM, glicerol 10%, Nonidet P40 1% y EDTA 2 mM.

Para la inmunoprecipitación, se empleó un antisuero de conejo (denominado anti-GST-1/187hHDC) obtenido inmunizando, según el protocolo descrito en la solicitud de patente P9800019, con la proteína de fusión GST-1/187hHDC (denominada GST-1/187hHDC) aislada de la banda de un gel de SDS-PAGE. Una vez obtenidos los extractos celulares y el antisuero, se procedió a realizar la inmunoprecipitación tal y como se describe a continuación. Para reducir

ES 2 319 586 A1

la adsorción inespecífica de las esferas del inmuoadsorbente Proteína A-Sepharosa (Pharmacia) con la que se aíslan los anticuerpos de los conejos inmunizados con la proteína de GST-1/187hHDC, se incuban durante 30 min a 4°C con una solución de BSA (15 mg/ml) en un tampón de lisis (tampón de lisis I) de composición Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 2,5 mM, DTT 1 mM, Tween-20 0,1%, Glicerol 10%, ph 7,5; tras la incubación, las esferas se lavan tres veces con el tampón de lisis I sin BSA. Reducida la adsorción de las esferas de Proteína A-Sepharosa, 20 microlitros de una suspensión (50% v/v) de las mismas se incuban durante 2 horas con 1 mililitro de suero anti-GST-1/187hHDC diluido 1: 500 en tampón de lisis I. Finalizada la incubación, las esferas de proteína A-Sepharosa con los anticuerpos anti-GST-1/187hHDC fijados se lavan con tampón de lisis I, y se ajustan al 50% (v/v).

Un microlitro de cada uno de los extractos de células HMC-1 y KU-182F (equivalente a 9 millones de células) se incuban durante 3 horas a 4°C con la esferas de Proteína A-Sepharosa que tienen unido el anticuerpo anti-GST-1/187hHDC. Tras sucesivos lavados, las esferas se recogen por centrifugación y se eluyen con tampón de conteniendo 2,3% SDS; los eluidos desnaturalizados se separan por electroforesis en gel de SDS-PAGE seguida de una electrotransferencia a filtros de nylon. Dichos filtros se incuban con el AcM SIM 216-12.1 (dilución 1/2500) y los complejos formados por el AcM y la hHDC se localizan mediante una reacción de quimioluminiscencia incubando el filtro con antiinmoglobulina de ratón conjugada con peroxidasa (fig 2).

2.2. Ensayo de Inmunorreconocimiento ("Western-blot")

Para realizar este ensayo se transfectan células HEK-293 con el plásmido de expresión pcDNA 3 (Invitrogen) que contiene la secuencia 1/512hHDC insertada bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). La transfección se facilita utilizando el sistema FuGENE (Roche) así como distintas cantidades de plásmidos de expresión (Fig. 3: 1,5 microgramos, calle 1, y 1 microgramo, calle 2). Como control negativo se emplea un extracto de células HEK-293 transfectadas en paralelo con el plásmido de expresión comercial pEGFP-N1 (Clontech) en su forma original, que carece de secuencias codificantes de hHDC.

El AcM SIM 216-12.1 se incuban con el extracto de células HEK-293 transfectadas, al tercer día de la transfección. Los precipitados formados se separan mediante electroforesis y se transfieren a filtros de nylon. La detección se lleva a cabo utilizando como anticuerpo primario el AcM SIM 216-12.1 (dilución 1/2500), y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1/5000). La posición y abundancia de las bandas se visualiza por quimioluminiscencia (Fig 3). En la calle 1, que corresponde al extracto celular de células transfectadas con la mayor cantidad de plásmido, se observa una banda de reacción principal más intensa, que corresponde a la Mr prevista para la proteína hHDC, y otra banda de menor tamaño que probablemente representa productos de degradación de dicha proteína. Cuando la transfección se realiza a partir de un microgramo de plásmido (calle 2) la intensidad de las bandas es débil, y apenas se detecta la banda de degradación. La calle 3, no muestra banda alguna puesto que las células de las que proceden los extractos empleados únicamente expresan la proteína verde fluorescente del plásmido pEGFP-N1.

2.3. Ensayos de inmunofluorescencia celular

Se transfectan transitoriamente células HEK-293 con 1,5 microgramos de plásmido pcDNA3-hHDC1/512 según se describe en el ejemplo anterior, para expresar de manera transitoria la proteína 1/152hHDC de las células HEK-293. Las células se incuban en placas de 24 pocillos sobre cubre-objetos recubiertos con polilisina durante 8 horas. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo y las células se fijan con formaldehído al 3,7% durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavan con una solución de fosfato-salino isotónico (PBS) y se permeabilizan con PBS/Tritón X-100 0,2% durante 5 minutos en hielo. La preparación se bloquea durante 90 min a 4°C con PBS/Tween-20 al 0,05%-suero fetal bovino al 5%, y subsecuentemente, se incuban con el AcM SIM 216-12.1 (dilución 1: 500) durante 45 minutos a 20°C. Tras lavados sucesivos con PBS/Tween-20 al 0,05%, la preparación se incuban durante 45 minutos con un anticuerpo anti-ratón (dilución 1:500) marcado con rodamina (Jackson ImmunoResearch). Finalmente la preparación se lava con PBS/Tween-20 al 0,05% y se visualiza en el microscopio de fluorescencia (Fig 4). Las células HEK-293 transformadas incubadas con el anticuerpo AcM SIM 216-216-12.1 emiten fluorescencia, a diferencia de las células transfectadas con el plásmido control.

ES 2 319 586 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido, capaz de codificar un polipéptido capaz de generar de anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a hHDC, cuya secuencia es elegida del grupo:
- a. Secuencia que comprende SEQ ID 1
 - b. Secuencia que consiste en SEQ ID 1 o comprende fragmentos de ésta.
 - 10 c. Secuencia que difiera de las secuencias a o b debido a la degeneración del código genético.
 - d. Secuencias que compartan al menos un 80%, 90%, 95% ó 98% de homología con cualquiera de las secuencias anteriores.
- 15 2. Polipéptido, según la reivindicación 1, capaz de generar anticuerpos específicos frente a hHDC y cuya secuencia es elegida del grupo:
- a. Secuencia que comprende SEQ ID 2
 - 20 b. Secuencia que consiste en SEQ ID 2 o comprende fragmentos de ésta.
 - c. Secuencia que comparta al menos un 80%, 90%, 95% ó 98% de homología la secuencia a o b.
- 25 3. Anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a hHDC, en donde dichos anticuerpos interactúan específicamente frente cualquiera de los polipéptidos de la reivindicación 2.
4. Uso de cualquiera de los polipéptidos según la reivindicación 2 para la generación de anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos frente a hHDC.
- 30 5. Uso según la reivindicación 4 en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos son obtenidos por técnicas de generación de hibridomas.
6. Uso según la reivindicación 4 en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos son obtenidos por la tecnología de "phage display".
- 35 7. Uso según la reivindicación 4 en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos son obtenidos por inmunización de mamíferos no humanos.
8. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3, para la elaboración de un medicamento.
- 40 9. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la degeneración neurológica.
- 45 10. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la anafilaxis y/o procesos alérgicos.
11. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento la degeneración de epitelios digestivos.
- 50 12. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.
13. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de procesos infecciosos.
- 55 14. Uso de los anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3 para el diagnóstico *in vitro* de enfermedades.
- 60 15. Kit de diagnóstico que comprende la utilización de anticuerpos o fragmentos de los mismos según la reivindicación 3.

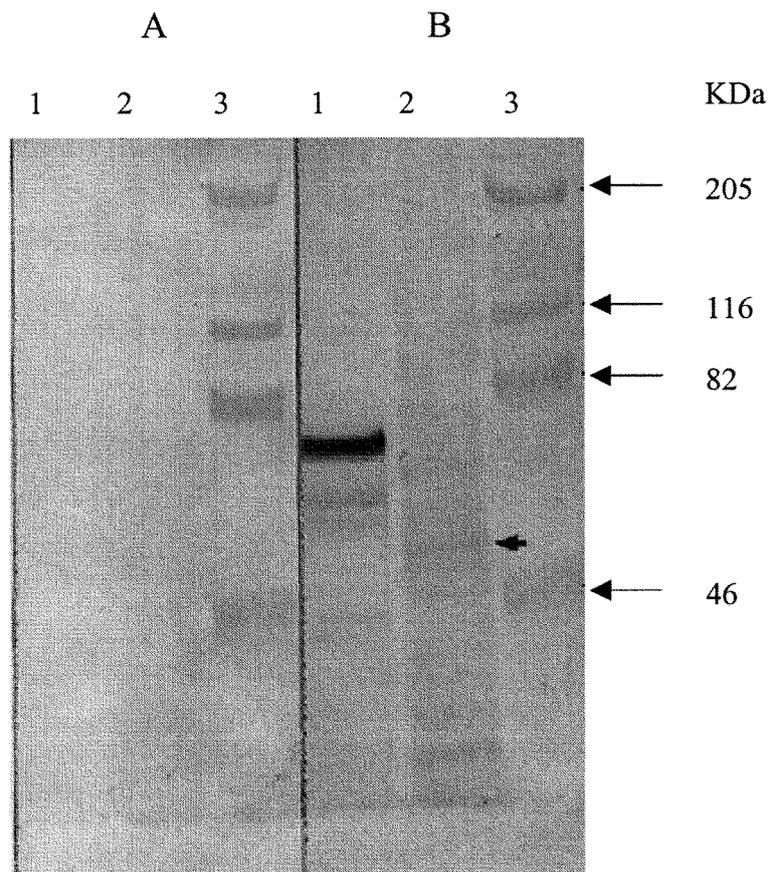


FIG. 1

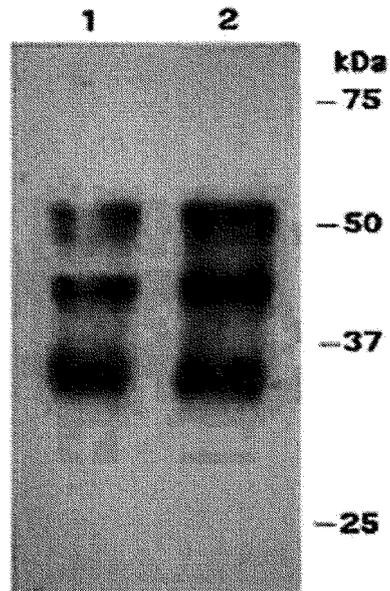


FIG. 2

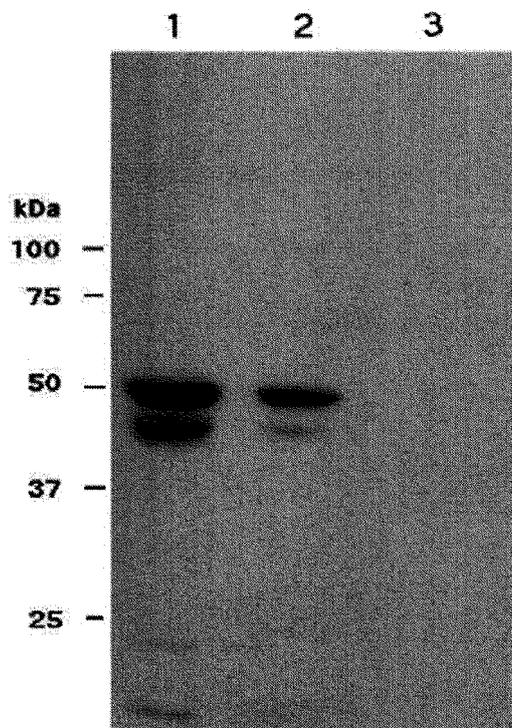


FIG. 3

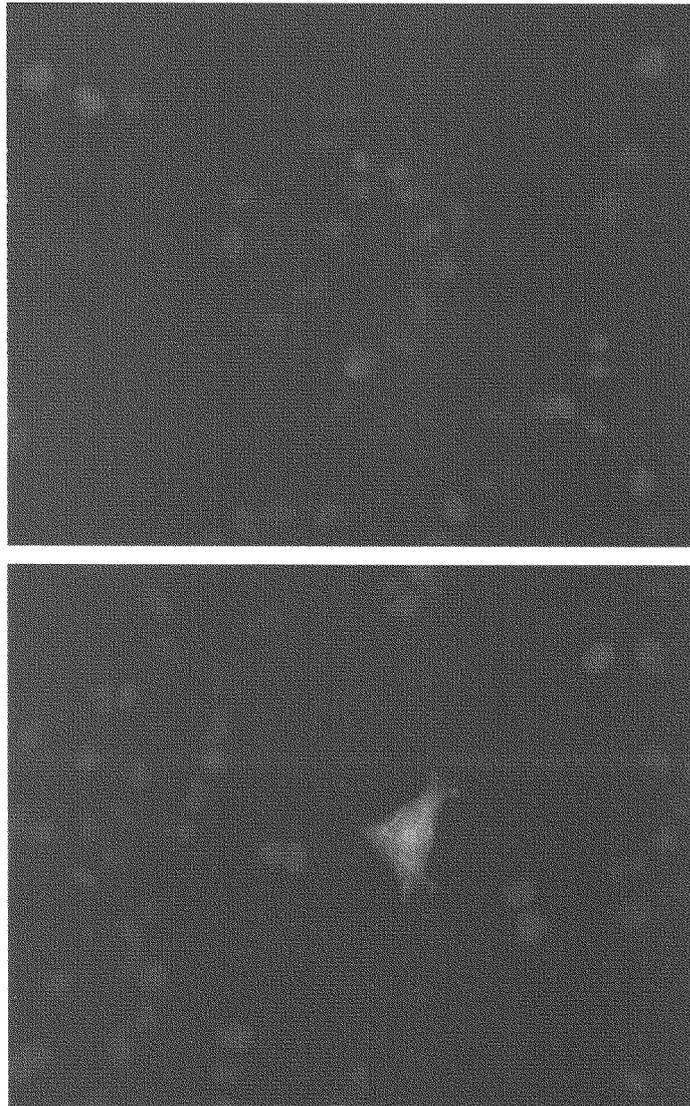


FIG. 4

ES 2 319 586 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO DE SALUD CARLOS III y UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

5 <120> MÉTODO DE OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-hHDC Y APLICACIONES DE
LOS MISMOS

10 <130> ES.1610

<160> 2

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 45

20 <212> DNA

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL (ARTIFICIAL SEQUENCE)

<400> 1

25 **tcctcaaatca ggggtgccag agcctgggcc tgtggaacgt ccctt**

45

<210> 2

<211> 15

30 <212> PRT

<213> SECUENCIA ARTIFICIAL (ARTIFICIAL SEQUENCE)

<400> 2

35 **Ser Gln Ile Arg Gly Ala Arg Ala Trp Ala Cys Gly Thr Ser Leu**
1 5 10 15

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 586

② Nº de solicitud: 200600378

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.02.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07K 16/40 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9830593 A2 (PROMEGA CORPORATION) 16.07.1998 (Citado por el solicitante)	1-15
A	YATSUNAMI K., et al., "Comparative studies of human recombinant 74 and 54 kDa l-histidine decarboxylases". The Journal of Biological Chemistry (1995), 270, 22, 30813-30817. (Citado por el solicitante)	1-15
A	FLEMING J.V., et al., "Mapping of catalytically important residues in the rat l-histidine decarboxylase enzyme using bioinformatic and site-directed mutagenesis approaches". Biochem. J. (2004) 379, 253-261.	1-15
A	POLLARD H. et al., "Monoclonal antibody against l-histidine decarboxylase for localization of histaminergic cells". Neuroscience Letters, (1985) Vol. 54, No. 1, pp. 53-58.	1-15

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

22.04.2009

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1