



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 322 422**

② Número de solicitud: 200701552

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/25 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **05.06.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.2009**

Fecha de la concesión: **17.03.2010**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **06.04.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
06.04.2010

⑦ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid

⑦ Inventor/es: **Mérida San Román, Isabel;**
Merino Plaza, Ernesto;
Saito, Naokai;
Shiriai, Yasuhito;
Takehi, Tomoko;
Matsubara, Takehiro y
Ávila Flores, Juana Antonia

⑦ Agente: **Pons Ariño Ángel**

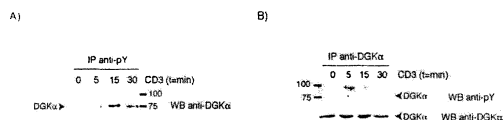
⑤ Título: **Procedimiento de diagnóstico de enfermedades del sistema inmune.**

⑦ Resumen:

Procedimiento de diagnóstico de enfermedades del sistema inmune.

La presente invención describe un procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune basado en la determinación *in vitro* del nivel de fosforilación de la DGK α en el residuo tirosina Y335 en células del sistema inmune, así como un anticuerpo específico de dicha proteína. Además, se describen nucleótidos que inhiben la expresión de dicha proteína y que pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de cánceres del sistema inmune.

Figura 1



ES 2 322 422 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de diagnóstico de enfermedades del sistema inmune.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina, y más concretamente en la aplicación de herramientas biotecnológicas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas, y más concretamente de enfermedades con alteración de la respuesta inmune.

10 **Estado de la técnica**

Durante la activación de los linfocitos T, en respuesta a la estimulación del receptor de células T (TCR), se producen una serie de eventos ordenados que llevan al desarrollo de la respuesta inmune (Berridge 1997). Dentro de estos eventos juegan un papel primordial las tirosinas quininas, entre las que destaca p56lck como eje de toda la respuesta desencadenada. La proteína p56lck es una tirosina quinasa de la familia *Src* que se recluta al TCR tras la estimulación del receptor. En este complejo, p56lck fosforila las moléculas adaptadoras LAT y SPL76 proporcionando sitios de anclaje para otras proteínas como PLC γ y ZAP 70. La proteína PLC γ hidroliza el fosfatidil inositol (4,5) bi-fosfato (PI (4,5)P₂) y genera dos importantes mensajeros: Inositol tri-fosfato (IP₃), el cual provoca la salida de Ca²⁺ del retículo endoplásmico dando lugar a la activación del factor de transcripción NFAT, y diacilglicerol (DAG), segundo mensajero lipídico involucrado en la activación de la vía PKC/Ras/MAPK, y que da lugar a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NFKB. La acción del complejo NFAT-AP1 junto con NFKB permite la expresión de genes necesarios para que se produzca una respuesta inmune correcta. La activación de NFAT en ausencia de activación de AP-1 da lugar a la regulación diferencial de una serie de genes que provocan en las células un estado de no respuesta llamado anergia (Macian, Garcia-Cozar *et al.* 2002). El mantenimiento de la tolerancia inmunológica de las células T efectoras en la periferia está mediado por la inducción de anergia en aquellas células T que son capaces de reconocer los antígenos propios, es decir, los antígenos generados a partir de proteínas procedentes del propio organismo, evitando con ello procesos auto-inmunes.

El metabolismo del DAG está implicado en los mecanismos de inducción de procesos anérgicos donde se ha descrito la disminución de PLC γ (Heissmeyer, Macian *et al.* 2004) y el aumento de DGK α (Macian, Garcia-Cozar *et al.* 2002) (Zha, Marks *et al.* 2006). Este aumento de DGK α provoca una disminución en la localización de RasGRP y con ello se ve disminuida la activación de la ruta Ras/Raf/Erk1-2 (Zha, Marks *et al.* 2006). Por el contrario, la ausencia de DGK α en un modelo de ratón da lugar a un aumento en la activación de la ruta Ras/Raf/Erk1-2, interfiriendo con ello en los procesos de inducción de anergia (Olenchok, Guo *et al.* 2006).

El control del DAG producido por la PLC γ es esencial para modular la respuesta inmune desencadenada por el TCR. Las diacilglicerolquininas (DGKs) forman una familia de enzimas que fosforilan el DAG para dar lugar a ácido fosfatídico (PA), modulando el balance entre ambos segundos mensajeros. La familia de las DGKs de mamíferos está compuesta de diez isoformas clasificadas a su vez en cinco subgrupos atendiendo a sus dominios de regulación y de expresión tisular/celular (Sakane and Kanoh 1997; Topham and Prescott 1999; van Blitterswijk and Houssa 2000; Imai, Kai *et al.* 2005). Todas las DGKs comparten un dominio catalítico muy conservado, dentro del cual destaca la secuencia aminoacídica GGDG. La alteración de esta secuencia da lugar a la pérdida de actividad de la proteína (Sanjuan, Jones *et al.* 2001). Todas las DGKs presentan al menos dos dominios ricos en cisteína (C1), denominados C1A y C1B según el orden que ocupan dentro de la secuencia de aminoácidos. La función original de los dominios C1 descrita en las PKCs es la de responder al DAG. En el caso de las DGK, los dominios C1 son atípicos, y excepto el C1A de DGK β y γ (Shindo, Irie *et al.* 2003), el resto de dominios C1 de las DGKs no son capaces de unir DAG. Además, el dominio C1B presenta una extensión de quince aminoácidos que ha servido para postular que su función es la de presentar el DAG al dominio catalítico (van Blitterswijk and Houssa 1999), si bien otros trabajos demuestran que estos dominios son dispensables para la actividad de la DGK (Abe, Lu *et al.* 2003).

La DGK α pertenece a las DGKs de tipo I (DGK α , β y γ) que se caracterizan por tener dos dominios de unión a Ca²⁺ (EF-hands) que les permiten responder al incremento de Ca²⁺, siendo la afinidad por el Ca²⁺ dependiente de la isoforma (Yamada, Sakane *et al.* 1997). La DGK α ejerce diferentes funciones durante la respuesta inmune desencadenada en las células T, por un lado, actúa como regulador negativo de la activación mediada por el TCR de la ruta RasGRP/PKC θ (Sanjuan, Jones *et al.* 2001; Sanjuan, Pradet-Balade *et al.* 2003) y, por el otro, tiene una función positiva en respuesta al receptor de IL2 (Flores, Casaseca *et al.* 1996; Flores, Jones *et al.* 1999), donde el PA generado es necesario para la proliferación. Además, el mecanismo de activación de la DGK α es también diferente en función del receptor. En el caso del TCR, la acción coordinada del Ca²⁺ y de las tirosinas quininas es la responsable de la localización de la DGK α en la membrana (Sanjuan, Jones *et al.* 2001). Por el contrario, en respuesta al receptor de IL2, donde no se produce ningún incremento de Ca²⁺, la acción de la PI3K, que da lugar a lípidos fosforilados en la posición 3 del anillo de inositol, es la encargada de modular la función la DGK α (Cipres, Carrasco *et al.* 2003).

Las tirosinas quininas juegan un papel fundamental en la activación de la DGK α , no sólo a través de la activación del TCR en el sistema inmune, sino, además, fuera de él, ya que se ha asociado con la respuesta al factor de crecimiento hepático (HGF) (Cutrupi, Baldanzi *et al.* 2000) y α -D-tocoferol (Fukunaga-Takenaka, Shirai *et al.* 2005), así como a la actividad tirosina quinasa de la proteína NPM-ALK en ciertos tumores (Bacchiocchi, Baldanzi *et al.* 2005). Todo ello sugiere que esta mediación puede ser común y necesaria en respuesta a diferentes receptores. Por otro lado, la

activación de la DGK α en estos sistemas pone de manifiesto la importancia de la familia de tirosinas quinasas Src en la activación y función de las DGK α , y señala a la tirosina 335 como un aminoácido importante para la movilización de la DGK α desde el citosol a la membrana aunque no se muestran pruebas directas de su acción o que esta translocación se deba únicamente a la acción de la DGK α , siendo además el estímulo distinto de la activación a través de TCR (Fukunaga-Takenaka, Shirai *et al.* 2005).

Esta tirosina 335 se encuentra en una región muy conservada dentro de la DGK α de todas las especies conocidas, pero no así DGK β o DGK γ , lo que sugiere cierta especificidad funcional de la tirosina 335. Por otro lado, la DGK α no es la única isoforma presente en linfocitos T. La DGK ζ , que se expresa de forma ubicua en numerosos tejidos, se expresa en linfocitos T y B. La DGK ζ , es una DGK de tipo IV que se caracterizó originalmente como una proteína nuclear (Goto *et al.* 1996) y que presenta unas características estructurales únicas. Además del dominio catalítico y los dos dominios C1 atípicos, comunes a todas las DGKs, esta proteína posee un dominio tipo MARKS próximo a su dominio de localización nuclear. La regulación por fosforilación de este dominio en la DGK ζ , regula su localización nuclear, lo que a su vez resulta fundamental en el control de la proliferación celular (Topham M, 1998).

Como se ha comentado anteriormente la DGK ζ es muy abundante en linfocitos T y la reciente generación de ratones deficientes en esta isoforma ha confirmado su función como un modulador negativo de la respuesta inmune (Zhong, 2003). Los linfocitos T de ratones deficientes en DGK ζ mostraron una hiperrespuesta a la estimulación y una respuesta inmune mucho más robusta frente a la infección por virus o frente a tumores. El análisis del fenotipo de ratones deficientes para DGK α y ζ sugiere la importancia de ambas isoformas en el control de la respuesta inmune (Olenchok BA, Guo R, Carpenter JH, Jordan M, Topham MK, Koretzky GA, Zhong XP. Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell energy. Nat Immunol. 2006 Nov; 7(11):1174-81. Epub 2006 Oct 8).

Sin embargo, estos estudios no permiten evaluar la posible redundancia en la función de cada una de estas isoformas, lo que resulta esencial a la hora de definir el posible interés diagnóstico o terapéutico de inhibidores específicos de cada una de estas isoformas.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune, en adelante procedimiento de diagnóstico de la invención, basado en la determinación *in vitro* del nivel de fosforilación de la DGK α en el residuo tirosina Y335 en células del sistema inmune, en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

a) identificación o determinación del nivel de fosforilación de la proteína DGK α en el residuo tirosina Y335, en una muestra biológica de origen inmune, y

b) comparación de dicha determinación observada en a) con una muestra control, y donde su presencia incrementada es indicativa de la existencia de una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune.

Otro objeto de la invención lo constituye un anticuerpo, ya sea monoclonal o policlonal, en adelante anticuerpo de la invención, específico de la proteína DGK α fosforilada en el residuo tirosina Y335, preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido de SEQ ID NO3, como el anticuerpo anti pY335 (anti-pTyr335DGK α).

Otro objeto de la invención lo constituye una proteína DGK α fosforilada, en adelante proteína fosforilada de la invención, que contiene el residuo tirosina 335 fosforilado o similar, o un fragmento o péptido de la misma que comprenda dicha tirosina 335 fosforilada.

Otro objeto particular de la invención lo constituye una proteína DGK α fosforilada de un mamífero perteneciente, título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: ratón, cerdo, rata y ser humano, preferentemente de origen humano, y más preferentemente, la proteína humana DGK α fosforilada en la tirosina 335 de SEQ ID NO2.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína DGK α fosforilada, en adelante compuesto inhibidor de la presente invención, útil para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de un proceso que cursa con estimulación de las células del sistema inmune.

Otro objeto particular de la invención lo constituye un compuesto inhibidor de la proteína DGK α en el que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína DGK α humana (SEQ ID NO1) y que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína DGK α ,

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína DGK α ,

- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína DGK α ,
- d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α , y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α .

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con estimulación del sistema inmune, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína DGK α , junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la estimulación del sistema inmune.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han demostrado que la activación de células T, llevada a cabo mediante la estimulación del TCR, induce la fosforilación de DGK α en la tirosina 335 (Y335) por un mecanismo que depende de la tirosina quinasa p56Lck. Este residuo de Y335 está conservado en otros ortólogos de DGK α como ratón, cerdo y rata y en la presente invención se ha examinado su fosforilación empleando un anticuerpo específico. El uso de un mutante no fosforilable reveló que esta tirosina es esencial para la localización de la DGK α en la membrana plasmática del linfocito tras la estimulación inmune. El análisis mediante fraccionamiento subcelular demuestra que esta forma fosforilada de DGK α se localiza de forma específica en la membrana, sugiriendo que la fosforilación de la Y335 estabiliza su localización en la membrana (Ejemplo 3). Esta es la primera descripción de la fosforilación en tirosina de la DGK α endógena en linfocitos T e identifica la Y335 como un residuo esencial para la localización y estabilización en la membrana de la enzima donde ejerce su acción terminando las señales reguladas por el DAG generado por el TCR al metabolizarlo, constituyéndose de esta manera e un marcador de proliferación de linfocitos T, proceso que tiene lugar en procesos autoinmunes o alteraciones linfoproliferativas como leucemias y linfomas Hodking y non-Hodking. La activación de DGK α permite la inactivación de la ruta de Ras/ERK y al mismo tiempo su propia inactivación a través de fosfatasas sensibles a PA.

Además, se ha observado que la fosforilación de esta tirosina 335 (Y335) está regulada por la generación de [Ca²⁺] intracelular, sugiriendo que la movilización de Ca²⁺, probablemente mediante la interacción directa con los dominios EF, es responsable de un cambio conformacional que favorece la fosforilación de la enzima (Ejemplo 4).

Finalmente, se observó que empleando sRNAi humanos específicos de DGK α se obtiene una eficaz atenuación de la expresión DGK α , demostrándose además una acción diferencial de esta isoforma frente a DGK ζ (Ejemplo 5). Estos experimentos indican el potencial uso de esta herramienta para atenuar la expresión de DGK α en aquellas células o tejidos donde su expresión pueda originar patologías. Estos polinucleótidos mencionados pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en dichas células afectadas de un paciente humano.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune, en adelante procedimiento de diagnóstico de la invención, basado en la determinación *in vitro* del nivel de fosforilación de la DGK α en el residuo tirosina Y335 en células del sistema inmune, en una muestra biológica y que comprende las siguientes etapas:

a) identificación o determinación del nivel de fosforilación de la proteína DGK α en el residuo tirosina Y335, en una muestra biológica de origen inmune, y

b) comparación de dicha determinación observada en a) con una muestra control, y donde su presencia incrementada es indicativa de la existencia de una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “enfermedades que cursan con estimulación del sistema inmune” se refiere a una enfermedad en la que se produce la estimulación y proliferación de células del sistema inmune, preferentemente linfocitos T, y perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedades autoinmunes, alérgicas, inflamatorias, alteraciones linfoproliferativas como leucemias y linfomas Hodking y non-Hodking. Esta identificación de nivel de fosforilación de la proteína DGK α en el residuo tirosina Y335 en una muestra biológica de un sujeto humano puede ser extraída del mismo y posteriormente *ex vivo* identificarse sobre la misma la presencia o no dicha fosforilación, que se correlacionaría con el diagnóstico de una alteración inmune en dicho sujeto, lo que permitiría la definición y la ejecución de una aproximación terapéutica o de diagnóstico y/o pronóstico.

La determinación de dichos niveles de dicha muestra biológica se lleva a cabo, preferentemente, en linfocitos T, los cuales pueden ser purificados o no previamente a su análisis. Dicha purificación puede llevarse a cabo fácilmente por un experto en la materia.

ES 2 322 422 B1

Un objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de diagnóstico de la invención donde la determinación se realiza con un anticuerpo específico de la tirosina fosforilada (pY335) de la proteína DGK α , más preferentemente, un anticuerpo policlonal, y más preferentemente, con un anticuerpo policlonal específico del péptido sintético de SEQ ID NO3, como el anticuerpo anti pY335 (anti-pTyr335DGK α) desarrollado en la presente invención (ver Ejemplo 2).

Otro objeto de la invención lo constituye un anticuerpo, ya sea monoclonal o policlonal, en adelante anticuerpo de la invención, específico de la proteína DGK α fosforilada en el residuo tirosina Y335, preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido de SEQ ID NO3, como el anticuerpo anti pY335 desarrollado en la presente invención (anti-pTyr335DGK α).

El anticuerpo de la invención puede ser utilizado, además del anterior uso como herramienta de diagnóstico, en otros procedimientos biotecnológicos de identificación de la proteína DGK α fosforilada pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

i) procedimiento de identificación de compuestos que alteran, activadores o inhibidores, la actividad kinasa de la proteína DGK α ,

ii) procedimiento de identificación de compuestos que alteran, activadores o inhibidores, la fosforilación de la proteína DGK α , y

iii) procedimiento de elaboración de una composición terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades que cursen con un incremento de la respuesta inmune.

Por otro lado, esta proteína DGK α fosforilada o un fragmento de la misma que comprenda este residuo fosforilado tirosina Y335, ya sea de origen sintético o aislado de eucariotas, puede ser utilizado en distintos ámbitos como herramienta biotecnológica con aplicaciones biomédicas.

Así, otro objeto de la invención lo constituye una proteína DGK α fosforilada, en adelante proteína fosforilada de la invención, que contiene el residuo tirosina 335 fosforilado o similar, o un fragmento o péptido de la misma que comprenda dicha tirosina 335 fosforilada.

Otro objeto particular de la invención lo constituye una proteína DGK α fosforilada de un mamífero perteneciente, título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: ratón, cerdo, rata y ser humano, preferentemente de origen humano, y más preferentemente, la proteína humana DGK α fosforilada en la tirosina 335 de SEQ ID NO2.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “proteína DGK α fosforilada en el residuo tirosina 335” se refiere también a una proteína, de distinto origen animal, preferentemente humana, así como a cualquier secuencia de aminoácidos (aás.) análoga a la proteína de SEQ ID NO2. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a las secuencias de aminoácidos mostradas en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aminoácidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya una secuencia peptídica con actividad similar a la secuencia SEQ ID NO2 de la invención.

En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Otra realización particular de la invención lo constituye la proteína DGK α fosforilada de la invención que está constituida por un péptido o fragmento, por ejemplo sintético o aislado, de la DGK α que comprenda el aminoácido Y335 fosforilado, por ejemplo un fragmento correspondiente a la secuencia de la proteína humana DGK α P329-A339, NH₂-CPPSS(fosfoY)PSVLA-OOOH (SEQ ID NO3), que contiene una tirosina fosforilada en una posición similar a la tirosina 335 de la proteína DGK α humana. La obtención de distintos fragmentos o péptidos que contengan esta secuencia SEQ ID NO3 o secuencia similar, representativa de este dominio de la DGK α con la tirosina fosforilada, pueden ser fácilmente llevada a cabo por un experto en la materia.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la proteína DGK α fosforilada en el residuo tirosina 335 de la invención en un procedimiento biotecnológico perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

i) procedimiento de elaboración de anticuerpos monoclonales y/o policlonales y/o recombinantes anti DGK α fosforilada,

ii) procedimiento de identificación de compuestos que alteren su fosforilación,

iii) procedimiento de identificación de compuestos activadores o inhibidores de la propia actividad kinasa de la proteína DGK α .

Otra realización particular de la invención lo constituye el uso de un fragmento o péptido, sintético o aislado, de la proteína DGK α de SEQ ID NO2 que contenga dicha tirosina 335 fosforilada, preferentemente, el péptido sintético correspondiente a la secuencia de DGK α P329-A339, NH₂-CPPSS(fosfoY)PSVLA-COOH de SEQ ID NO3 para la elaboración de anticuerpos monoclonales y/o policlonales y/o recombinantes anti proteína DGK α . Estos péptidos pueden ser aislados o sintetizados y usados posteriormente por un experto en la materia para producir un anticuerpo específico contra una forma DGK α fosforilada, preferentemente humana.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína DGK α fosforilada, en adelante compuesto inhibidor de la presente invención, útil para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de un proceso que cursa con estimulación de las células del sistema inmune.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto o agente inhibidor o antagonista” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína DGK α fosforilada (por ejemplo, SEQ ID NO2), o con fragmentos funcionales de la misma, disminuye o elimina la intensidad o la duración de la actividad biológica de dicha proteína. En esta definición se incluye además aquellos compuestos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína DGK α (por ejemplo, SEQ ID NO1), es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traducciona. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimine el efecto y/o la función de la proteína DGK α .

A modo ilustrativo, dicho polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína DGK α , o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA de la proteína DGK α , o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA de la proteína DGK α , bien polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA o un shRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α o bien un microRNA (miRNA).

Estos polinucleótidos mencionados pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en las células de un paciente humano. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a estas células del sistema inmune, *in vivo* o *ex vivo*, de una construcción génica que comprende uno de los polinucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células permitiendo su expresión en el interior de las mismas de manera que se inhiba la expresión de la proteína DGK α . Ventajosamente, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “vector” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculización de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales (Pfeifer y Verma, 2001) y su administración puede ser preparada por un experto en la materia en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

Por tanto, otro objeto particular de la invención lo constituye un compuesto inhibidor de la proteína DGK α en el que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante (SEQ ID NO1) de la proteína DGK α humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína DGK α ,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína DGK α ,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína DGK α ,
- d) un RNA de interferencia (siRNA o shRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α , y
- e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α .

Por otro lado, estas técnicas de inhibición génica, y más concretamente la vehiculización de los compuestos - oligonucleótidos antisentido, iRNA, ribozimas o aptámeros- puede llevarse a cabo mediante el uso de liposomas, nanopartículas u otros vehiculizantes que incrementan el éxito de dicha transferencia al interior de la célula, preferentemente al núcleo celular (Lu y Woodle, 2005; Hawker y Wooley, 2005). En principio, pueden utilizarse inhibidores de la traducción del RNAm de DGK α que se unen tanto a su región codificante como a la no codificante, por ejemplo frente a la zona 3' no codificante.

ES 2 322 422 B1

Así, una realización particular de la invención lo constituye un siRNA de d) en el que el RNAi se une preferentemente a la secuencia fragmento del RNAm de DGK α AAGCCAGAAGACCATGGATGA (SEQ ID NO4) o a otra secuencia que comprenda a ésta o a un fragmento más corto de la misma.

5 Otra realización particular de la invención lo constituye un RNAi de d) en el que el siRNA está constituido por un oligonucleótido de doble cadena de DNA que comprende una secuencia de interferencia, por ejemplo, la secuencia SEQ ID NO4 y una secuencia complementaria a ésta (por ejemplo, TCATCCATGGTCTTCTGGC (SEQ ID NO5) para el caso de la SEQ ID NO4) (Figura 10), originándose una pareja de secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, respectivamente (para el caso anterior, SEQ ID NO6 y 7, respectivamente). Además, estas secuencias RNAi de doble
10 cadena comprenden otras secuencias para la actividad de las mismas (a título ilustrativo, secuencias adaptadoras, horquilla o de polidiminas, ver ejemplo 5).

Las secuencias de nucleótidos a)-e) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína DGK α , y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector
15 de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, 2002; Patente US20020128220; Miyake y cols., 2000; Puerta-Ferández y cols., 2003; Kikuchi y cols., 2003; Reynolds y cols., 2004).

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento útil para el
20 tratamiento de enfermedades que cursen con estimulación del sistema inmune, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína DGK α , junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica en la que el compuesto
25 inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína DGK α humana (SEQ ID NO1) y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína DGK α ,
- 30 b) una ribozima específica del mRNA de la proteína DGK α ,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína DGK α ,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α , y
- 35 e) un microRNA (miRNA) específico del mRNA de la proteína DGK α .

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que
40 el compuesto inhibidor de DGK α es un siRNA que se une preferentemente a la secuencia fragmento del RNAm de DGK α AAGCCAGAAGACCATGGATGA (SEQ ID NO4) o a otra secuencia que comprenda a ésta o a un fragmento más corto de la misma (ver Ejemplo 5).

Otra realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el
45 compuesto inhibidor de DGK α es un RNAi constituido por un oligonucleótido de doble cadena de DNA que comprende una secuencia de interferencia, por ejemplo, la secuencia SEQ ID NO4 y una secuencia complementaria a ésta (por ejemplo, TCATCCATGGTCTTCTGGC (SEQ ID NO5) para el caso de la SEQ ID NO4) (Figura 10), originándose una pareja de secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, respectivamente (para el caso anterior, SEQ ID NO6 y 7, respectivamente). Además, estas secuencias RNAi de doble cadena comprenden otras secuencias necesarias para la actividad de las mismas (a título ilustrativo, secuencias adaptadoras, horquilla o de polidiminas, ver ejemplo 5) y
50 pueden ser elaboradas por un experto en la materia.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica en la que el compuesto
55 inhibidor es un anticuerpo, ya sea monoclonal o policlonal, específico de la proteína DGK α fosforilada en el residuo tirosina Y335, o de un péptido o fragmento que lo contenga, preferentemente un anticuerpo policlonal específico del péptido o fragmento de secuencia SEQ ID NO3, más preferentemente el anticuerpo anti-pTyr335DGK α desarrollado en la invención.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son
60 los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad
del agente o compuesto inhibidor de la actividad de la proteína DGK α , calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad,
65 estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención

puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en Faulí i Trillo, 1993.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe la estimulación del sistema inmune.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en el que enfermedad que cursa con estimulación del sistema inmune pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: enfermedades autoinmunes, alérgicas, inflamatorias, alteraciones linfoproliferativas como leucemias y linfomas Hodking y non-Hodking.

Descripción de las figuras

Figura 1.- *DGK α se fosforila en tirosina en respuesta a la estimulación del TCR.* A) Las células Jurkat se estimularon durante los tiempos indicados con un anticuerpo anti-CD3. Las células se lisaron y las proteínas se inmunoprecipitaron empleando un anticuerpo anti-fosfotirosina (anti-PY) y la membrana se reveló con un anticuerpo anti-DGK α . B) Las células se trataron como en A. DGK α se inmunoprecipitó empleando un anticuerpo específico y la membrana se reveló con un anticuerpo anti PY y después con anti-DGK α .

Figura 2.- A) *Comparación de secuencias en las DGK α de Tipo I.* En color verde se indica una secuencia rica en Pro conservadas en todos los miembros de la familia de DGKs. La Y335 conservada en los diferentes ortólogos de DGK α se indica con una flecha. B) *p56Lck fosforila DGK α en la Y335.* Las células Jurkat se transfectaron con plásmidos codificando GFP-DGK α silvestre (wt) y GFP-DGK α mutada Y335F junto con un plásmido vacío o un plásmido codificando p56Lck (505). A las 24 horas, las células se lisaron y la GFP-DGK α se inmunoprecipitó empleando anticuerpos anti-GFP. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot. La fosforilación de DGK α se determinó con anticuerpos monoclonales anti-pY, y el nivel de expresión con anti-DGK α .

Figura 3.- *La fosforilación de DGK α en Y335 es esencial para su translocación a la membrana plasmática.* Las células Jurkat se transfectaron con DGK α silvestre (wt) o el mutante Y335F fusionado a GFP. 24 horas tras la transfección las células se plaquearon en placas recubiertas de anticuerpos antiCD3/antiCD28 y se determinó la localización subcelular de la enzima mediante microscopía confocal.

Figura 4.- *El anticuerpo anti pTyr335 DGK α de la invención reconoce la DGK α fosforilada en Y335.* A) Células HEK293 se transfectaron con diferentes concentraciones de un plásmido codificante de DGK α humana fusionada a un epítipo de myc junto con plásmido control o un plásmido codificante de Lck. 24 horas después las células se recogieron, lisaron y los niveles de pDGK α Y335, DGK α y Lck se determinaron empleando los anticuerpos correspondientes. B) myc-DGK α se inmunoprecipitó empleando anticuerpo anti-myc y el estado de fosforilación se determinó con el anticuerpo anti-pDGK Y335. C) Mismo experimento que en A pero empleando un plásmido que codifica la DGK α de ratón fusionada a un epítipo HA. D) Las células HEK293 se transfectaron con plásmidos codificantes de HA-DGK α o del mutante HA-DGK α Y335F junto con Lck. A las 24 horas post-transfección se determinó la fosforilación de DGK α empleando el anticuerpo anti-pTyr335.

Figura 5.- A) *La fosforilación de DGK α es dependiente de Src quinasas.* Células Jurkat se incubaron con el inhibidor de Src quinasas PP2 a las concentraciones indicadas durante 1 hora. Las células se recogieron y se lisaron. Las proteínas se separaron por SDS PAGE y la fosforilación de DGK α se determinó con el anticuerpo anti pTyr335 DGK α de la invención. B) *La fosforilación de DGK en linfocitos T depende de Lck.* Lisados celulares obtenidos a partir de células HEK293, Jurkat, JcaM and Molt4 se analizaron por SDS PAGE e inmunoblot. La fosforilación de DGK α se determinó empleando el anticuerpo anti-pTyr335 DGK α . La expresión de DGK α y Lck se determinó empleando anticuerpos específicos.

Figura 6.- *Distribución subcelular de la DGK α fosforilada en Y335.* Fracciones subcelulares obtenidas a partir de células Jurkat se analizaron mediante SDS PAGE y Western Blot con los anticuerpos indicados.

Figura 7.- *Cinéticas de fosforilación de la Y335 en DGK α en respuesta a TCR.* Las células Jurkat se estimularon con anti-CD3 o anti-CD3/-CD28 durante los tiempos indicados. Donde se indica, las células se incubaron con el inhibidor farmacológico de DGK durante 30 minutos antes de la estimulación con anticuerpos. La fosforilación de DGK α se determinó empleando el anticuerpo anti pDGK α -Y335 de la invención como se ha descrito en experimentos anteriores. Las membranas fueron re-incubadas con anticuerpos anti-DGK α para detectar la proteína total. Muestras procedentes del mismo lisado se analizaron para determinar la fosforilación de Erk1/2. El nivel de fosforilación se cuantificó empleando el software Image J software.

ES 2 322 422 B1

Figura 8.- *El flujo de Ca^{2+} aumenta la fosforilación de $DGK\alpha$ en la Tyr335.* Las células Jurkat se trataron con los estímulos indicados durante 5 min. El estado de fosforilación de DGK se determinó como en experimentos anteriores. Como controles se determinó la defosforilación de NFAT así como la fosforilación de ERK1/2.

5 Figura 9.- *Modelo de activación de $DGK\alpha$.* En respuesta a la estimulación del TCR, Lck se activa e inicia una cascada de señales que conducen a la activación de $PLC\gamma$ que genera DAG e IP_3 . Este último favorece el flujo de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico que promueve un cambio conformacional que “abre” la $DGK\alpha$. Esto permite su interacción con Lck en la membrana plasmática y su fosforilación en la Tyr335, lo que permite su estabilización en la membrana y su rápida disociación de Lck. La proteína pY335 $DGK\alpha$ es activa y, dado que localiza en la membrana
10 puede metabolizar el DAG generado por el TCR. La activación de $DGK\alpha$ permite la inactivación de la ruta de Ras/ERK y al mismo tiempo su propia inactivación a través de fosfatasa sensibles a PA.

Figura 10.- *Esquema de cada una de las $DGKs$ indicando la secuencia de oligonucleótidos empleada para generación de los sRNAi humanos de la invención.*

15 Figura 11.- *Niveles de expresión de $DGKs$ tras la expresión de sRNAi humanos específicos.* Análisis por Western Blot de la expresión de $DGK\alpha$ (arriba), $DGK\zeta$ en medio, y tubulina (abajo) en lisados de células transfectadas con shRNAi control (C), y específicos para cada una de las isoformas.

20 Figura 12.- *Análisis del efecto de atenuar la expresión de $DGKs$ sobre la ruta de Ras/ERK.* Las células se transfectaron con los sRNAi humanos correspondientes y la activación de la ruta de Ras tras la estimulación del TCR se determinó mediante análisis de la fosforilación de ERK empleando anticuerpos antifosforesiduo (pERK, arriba), el nivel total de Erk en las muestras se determinó como control (abajo) a distintos tiempos.

25 Figura 13.- *Efecto de la atenuación de $DGKs$ en la translocación de PKCs.* Las células Jurkat, transfectadas con los sRNAi humanos indicados se estimularon con anticuerpos antiCD3/antiCD28 durante los tiempos indicados. Las células se homogenizaron y se aislaron membranas mediante ultracentrifugación. La localización de las isoformas indicadas de PKC se determinó mediante análisis de Western Blot con los anticuerpos correspondientes.

30 Figura 14.- *Análisis del efecto de atenuar la expresión de $DGKs$ sobre la ruta de PI3K/AKT.* Las células se transfectaron con los sRNAi humanos correspondientes y la fosforilación de AKT se determinó mediante el empleo de los anticuerpos antifosforesiduo correspondientes.

Ejemplos de la invención

35 Ejemplo 1

La $DGK\alpha$ endógena se fosforila en tirosinas en respuesta a la estimulación del receptor TCR, y más concretamente en el residuo Y335, siendo necesario este residuo Y335 para la movilización de la $DGK\alpha$ desde el citosol a la membrana

40 Dada la importancia de las tirosinas quinasas en la activación de la $DGK\alpha$ en respuesta a la señal desencadenada por el TCR, se comprobó la fosforilación en tirosina de la $DGK\alpha$ endógena en respuesta a la estimulación del TCR. Para este fin, se mimetizó la estimulación del TCR mediante anticuerpos específicos del CD3 (anti-CD3) de la células Jurkat y se inmunoprecipitaron las proteínas fosforiladas en tirosina del lisado de estas células, mediante un anticuerpo específico de dichas proteínas. Se separaron las proteínas del inmunoprecipitado en geles de poli(acrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) y se transfirieron las mismas a una membrana de nitrocelulosa por técnicas de Western blot. El análisis de la membrana con un anticuerpo específico de $DGK\alpha$ permitió detectar la presencia de la proteína, entre todas las proteínas del inmunoprecipitado, sólo en respuesta a la estimulación del TCR y de una manera rápida, cinco minutos después de la estimulación, que fue el tiempo más corto analizado (Figura 1A). Sin embargo,
45 este resultado no permitió discriminar entre fosforilación directa de la proteína y/o asociación a proteínas fosforiladas en tirosina. Para discriminar entre fosforilación directa de la $DGK\alpha$ y asociación a proteínas fosforiladas en respuesta al TCR, se estimuló el TCR de las células Jurkat con anticuerpos anti-CD3 y se inmunoprecipitó la $DGK\alpha$ mediante una mezcla de tres anticuerpos monoclonales que reconocen tres epítopos diferentes de la proteína. Se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por Western blot. El análisis de la membrana mediante el uso de un anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en tirosina (anti-pY) reveló que la proteína $DGK\alpha$ se fosforila en tirosina en respuesta a la estimulación del TCR y que esta fosforilación, además de ser estequiométricamente baja, era rápida y transitoria, al comprobarse que el nivel de fosforilación alcanza su máximo entre los cinco y los quince minutos para después decaer a los treinta minutos (Figura 1B).

60 El alineamiento de la secuencia correspondiente a los ortólogos de $DGK\alpha$ humanos, de cerdo, de rata y ratón (Figura 2A) demuestra el alto grado de conservación de la Y335 (numeración según la secuencia humana), localizada entre el segundo dominio C1 y el dominio catalítico. Este residuo que no está presente en otras isoformas del tipo I se ha propuesto que se fosforila por Src en respuesta a factores de crecimiento (Baldanzi, Cutrupi *et al.* 2002) o α -tocopherol (Fukunaga-Takenalk, Shirai *et al.* 2003). Para definir el posible papel de la Tyr 335 en el mecanismo de activación de $DGK\alpha$ por Lck, se realizó un mutante de sustitución de la Tyr 335 por Phe sobre la proteína de fusión GFP- $DGK\alpha$ (Figura 2A). Lo primero que se analizó fue el nivel de fosforilación en presencia de Lck, para lo cual se usaron las células de la línea Ba/F3, que es una línea proB que no expresa ni Fyn ni Lck, aunque sí otros miembros de Src como Lyn o Blk. En estas células, se transfectaron las construcciones GFP- $DGK\alpha$ silvestre (wt) y el mutante

Y335F y se analizó la fosforilación de las proteínas expresadas en el lisado total, detectándose un menor nivel de fosforilación del mutante GFP-DGK α Y335F respecto a la forma silvestre (Figura 2B). Este resultado indica que la Tyr 335 es accesible a la tirosina quinasa Lck.

5 Para determinar la importancia de la Tyr 335 en la movilización de la DGK α en respuesta al TCR, se estudió la movilización de la GFP-DGK α salvaje (wt) y el mutante en respuesta a dicho receptor. Con este fin, se transfectaron células de la línea Jurkat con vectores de expresión para ambas proteínas y se analizó por microscopía confocal la movilización de la proteína en respuesta a la estimulación del TCR mimetizada con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 pegados placa. El resultado mostró que, a diferencia de la GFP-DGK α silvestre (wt), el mutante GFP-DGK α Y335F era incapaz de moverse a la membrana plasmática en respuesta al estímulo del TCR (Figura 3). Estos resultados demuestran que la Y335 es esencial para el mecanismo de movilización de la DGK α desde el citosol a la membrana en respuesta al TCR.

Ejemplo 2

15 *Generación de un anticuerpo que reconoce de forma específica el residuo Y335 fosforilado (anticuerpo anti-fosfotirosina 335; pTyr335)*

20 Para analizar mejor el papel de la tirosina 335 en la fosforilación directa de la DGK α , se desarrolló un anticuerpo específico capaz de reconocer esta tirosina fosforilada (anticuerpo anti-pTyr335). Para valorar la especificidad del nuevo anticuerpo, se co-transfectó, en la línea celular HEK293, un vector de expresión para la DGK α de origen humano acoplada a un marcador de myc (myc-DGK α), junto con otro para la expresión de p56Lck. Veinticuatro horas después de la transfección, se inmunoprecipitó la DGK α del lisado celular mediante un anticuerpo específico del marcador de myc (anti-myc), y tanto este inmunoprecipitado como una muestra del lisado fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa por Western blot. El análisis de la membrana, tanto del lisado total (Figura 4A), como del inmunoprecipitado anti-myc (Figura 4B), mostró que el nuevo anticuerpo anti-fosfotirosina 335 (pTyr335) sólo reconoce la DGK α cuando se expresa junto con la p56Lck. El anticuerpo también reconoce la forma silvestre de DGK α de ratón marcada con HA (HA-DGK α salvaje, wt) cuando se sobreexpresa con Lck (Figura 4C). El anticuerpo reconoce una señal más débil en ausencia de Lck en exposiciones más largas. Dado que las células HEK293 expresan otras TK de la familia de Src, esa señal puede corresponder a fosforilación por Tk endógenas.

30 Para comprobar si el anticuerpo anti-pTyr335 era capaz de reconocer específicamente a la tirosina 335 fosforilada y no una fosforilación inespecífica de la proteína, se co-transfectó, en unas células de la línea HEK293, un vector de expresión que codifica para la p56Lck junto con otro que expresa la forma silvestre de DGK α de ratón marcada con HA (HA-DGK α silvestre, wt) o la forma mutante en tirosina 335 sustituida por fenilalanina (HA-DGK α Y335F) de la misma especie. Veinticuatro horas después, se separaron las proteínas de los lisados celulares por técnicas de SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por Western blot. El análisis de la membrana con el anticuerpo anti-pTyr335 mostró que el anticuerpo es capaz de reconocer la fosforilación directa por p56Lck sólo cuando la tirosina 335 está presente en la DGK α demostrando la especificidad y la capacidad de discriminación del anticuerpo anti-pTyr335 (Figura 4D).

Ejemplo 3

45 *La fosforilación de DGK α en Y335 es dependiente de p56Lck, localizándose mayoritariamente en la membrana plasmática, siendo inducida por la estimulación de TCR y regulada por la propia actividad quinasa de la DGK α*

50 La proteína p56Lck fosforila a la DGK α en la tirosina 335 cuando ambas son expresadas de manera ectópica en células HEK293. Para corroborar si ocurría lo mismo con las proteínas expresadas de forma endógena, se usó la línea celular Jurkat que expresa tanto la DGK α como la p56Lck, y se inhibió, durante una hora, la actividad tirosina quinasa de los miembros de la familia Src mediante un inhibidor específico, PP2, usado a diferentes concentraciones. El análisis de las proteínas de los lisados celulares, a través de su separación por SDS-PAGE y posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa por Western blot, por medio del anticuerpo anti-pTyr335 y del anticuerpo anti-pY, mostró que el nivel de fosforilación es inversamente proporcional a la dosis de inhibidor de Src, PP2, utilizado, tanto en la fosforilación de la tirosina 335 de la DGK α como en la fosforilación del resto de las proteínas de lisado (Figura 4A). Sin embargo, este resultado no descartó que otros miembros de la familia Src como p59Fyn pudieran estar fosforilando a la DGK α en la tirosina 335. Para descartarlo, se usó la línea celular JCaM que deriva de Jurkat pero que no expresa p56Lck y la línea celular Molt4 que, al igual que Jurkat, expresa la p56Lck y la DGK α . Se separaron las proteínas celulares de Jurkat, JCaM y Molt4 igual que en la Figura 5A y se llevó a cabo el análisis de la fosforilación en la tirosina 335 por medio del anticuerpo anti-pTyr335. El resultado mostró que, aun expresando los mismos niveles de la DGK α , la fosforilación en la tirosina 335 sólo se puede detectar cuando las células expresan la p56Lck (Figura 5B).

65 La movilización de la proteína DGK α desde el citosol a la membrana depende del flujo de calcio y la activación de tirosinas quinasas (Sanjuan, Jones *et al.* 2001). Para determinar como influía en la localización subcelular de la DGK α la fosforilación de la tirosina 335 por parte de la p56Lck, se realizó un fraccionamiento subcelular de células Jurkat. Tras el fraccionamiento, se separaron las proteínas celulares por técnicas de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por técnicas de Western blot. Para los controles del fraccionamiento se usaron los anticuerpos anti-p56Lck, control de membrana, anti-IkBa, control de citosol y anti-vimentina, control de citoesqueleto. El resultado del fraccionamiento permitió corroborar los datos ya descritos de que la mayor parte de la DGK α era citosólica

frente a una pequeña fracción que está presente en la membrana plasmática (Sanjuan, Pradet-Balade *et al.* 2003), y, además, determinar que parte de la proteína está en el citoesqueleto (Figura 6). La visualización de la fosforilación de la DGK α en la tirosina 335 por medio del anticuerpo anti-pTyr335 mostró que la proteína fosforilada está presente exclusivamente en las fracciones de membrana plasmática, mayoritariamente, y de citoesqueleto, coincidiendo, en las mismas, con la presencia de la p56Lck.

Los resultados de la fosforilación de la proteína DGK α endógena proponían que la fosforilación era rápida y transitoria. Para estudiar la posible fosforilación de la DGK α en la tirosina 335 en respuesta al TCR, se mimetizó la estimulación del TCR mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3/-CD28 en células Jurkat. Tras la separación de las proteínas del lisado celular por SDS-PAGE y la posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa por Western blot, se analizó el estado fosforilado de DGK α utilizando el anticuerpo anti-pTyr335. El resultado mostró que la fosforilación aumenta de una manera rápida, a los cinco minutos ya se ve aumento de la fosforilación, transitoria, a los quince minutos la fosforilación vuelve a sus niveles basales, y estequiométricamente baja (Figura 7). Además, la señal de co-estimulación procedente del CD28 provocó un ligero aumento del nivel de fosforilación de la tirosina 335 respecto a la señal del CD3 ejerciendo, por tanto, un papel positivo en la fosforilación.

Ejemplo 4

La fosforilación de DGK α en Y335 está regulada por su propia actividad quinasa y se incrementa por un aumento del flujo de Ca²⁺

La inhibición de la actividad quinasa de la DGK α provoca que la localización de la proteína, en respuesta al TCR, en lugar de ser transitoria sea sostenida (Sanjuan, Jones *et al.* 2001), poniendo de manifiesto la relación entre la actividad de la proteína y su localización en la membrana. Puesto que la DGK α se fosforila en tirosina también con un cinética rápida y transitoria en respuesta al TCR, se determinó si había alguna relación entre el aumento del estado fosforilado de la tirosina 335 y la actividad quinasa de la DGK α , para lo cual se inhibió la misma durante treinta minutos por medio del inhibidor de las DGKs de tipo I, R59949, y antes de la estimulación con anticuerpos anti-CD3. Las proteínas del lisado celular se separaron por técnicas de SDS-PAGE y Western blot. Se analizó la fosforilación en la tirosina 335 con el anticuerpo anti-pTyr335 lo que mostró que la actividad DGK α era importante para disminuir el estado fosforilado de la DGK α durante la activación del TCR (Figura 7). Esto sugiere que, a través de su actividad quinasa, la DGK α regula su nivel de fosforilación tras la estimulación del TCR.

Por otro lado, la DGK α posee dos dominios tipo manos EF, característicos de la unión a Ca²⁺ y resulta activada por Ca²⁺ *in vitro*. La delección de los dominios EF induce la localización constitutiva de la enzima en la membrana lo que sugiere que es necesario un cambio conformacional dependiente de EF para permitir la localización en la membrana de la enzima. Se evaluó el efecto tanto del Ca²⁺ como del DAG en la fosforilación de DGK α en la Y335. Los niveles de Ca²⁺ intracelulares se aumentaron empleando el ionóforo ionomicina mientras que los efectos de DAG se mimetizaron empleando PMA. Como se observa en la Figura 8, el tratamiento con ionomicina promovió la fosforilación de DGK α en la Y335. Aunque la adición de PMA potenciaba la fosforilación de Erk no tuvo efecto en la fosforilación de la Y335. Finalmente, la máxima fosforilación se observó empleando los dos estímulos de forma conjunta. Estos resultados demuestran que la acción concertada de las señales reguladas por DAG α y Ca²⁺ induce la máxima fosforilación en el residuo Y335. La movilización de Ca²⁺, probablemente mediante la interacción directa con los dominios EF, es responsable de un cambio conformacional que favorece la fosforilación de la enzima.

Ejemplo 5

Validación del empleo de RNA de interferencia humanos (hRNAi) para inhibir la expresión de DGK α como herramienta para definir su función en la respuesta inmune

Para evaluar la relevancia de cada una de las isoformas de la proteína DGK presentes en linfocitos T se decidió atenuar de forma independiente la expresión de cada una de estas isoformas empleando la técnica de silenciamiento génico mediante RNA interferente. La interferencia de RNA (RNAi) representa la tecnología más reciente y prometedora para silenciamiento génico. Dicha tecnología se basa en el uso de un mecanismo conservado de defensa innata, mediante el que RNAs de doble cadena silencian la expresión de genes específicos, catalizando la degradación del mRNA homólogo (Fire A *et al.* 1998 Nature 391, 806-811; Elbashir SM *et al.* 2001 Nature 411; 494-498). La interferencia de RNA puede realizarse, bien introduciendo en las células dúplex de hRNAi presintetizados o mediante la expresión intracelular de hRNAi a partir de moldes de DNAs subclonados en plásmidos. El uso de plásmidos es mucho más versátil, además de que el silenciamiento puede prolongarse por mucho más tiempo, incluso silenciarse de forma estable empleando vectores retrovirales y/o lentivirales (Hemann MT *et al.* 2003, 33; 396-400). Tanto los RNAi sintetizados como expresados intracelularmente convergen en el complejo RISC y son capaces de inducir silenciamiento génico.

La generación de RNAi humanos frente a cada una de las isoformas de la proteína DGK se realizó mediante la síntesis de dos oligonucleótidos de 21 bp correspondientes a las regiones seleccionadas en la secuencia correspondiente para efectuar el RNAi (secuencia de nucleótidos de la DGK α humana, nt 1153-1173: AAGCCAGAAGACCATGGATGA (SEQ ID NO4); secuencia de nucleótidos de la DGK ζ humana, nt 2290-2310: AACTATGTGACTGAGATCGCA (SEQ ID NO8) (Figura 10). Las secuencias seleccionadas (SEQ ID NO3 y 8) se emplearon posteriormente para generar oligonucleótidos de doble cadena de DNA que incluían una secuencia adaptadora de siete bp seguida de los 19 últimos

nucleótidos correspondientes a la secuencia de interferencia más una secuencia de nueve bp que origina una horquilla en el RNA producido y de la secuencia complementaria a los 19 pb anteriores (TCATCCATGGTCTTCTGGC (SEQ ID NO5) y TGCGATCTCAGTCACATAG (SEQ ID NO8), complementarias de DGK α y DGK ζ humana, respectivamente) (Figura 10), originando una pareja de secuencias de nucleótidos sense y antisense para DGK α humana, (SEQ ID NO6 y 7) como para DGK ζ (SEQ ID NO10 y 11), respectivamente. Por último, el oligonucleótido contiene una secuencia de polimidinas que permiten la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa III. El RNA obtenido por la transcripción de este inserto consta de un RNA de doble cadena con una horquilla ("short hairpin RNA o shRNAi), el cuál es efectivamente reconocido por el complejo Dicer o complejo de silenciamiento de RNA.

La secuencias de DNA generados se clonaron en el vector pSUPER y pSUPERGFP (Oligoengine). Los vectores se transfectaron en células Jurkat mediante electroporación. Las células se recogieron 96 horas post-transfección y los niveles de las proteínas DGK α y ζ se evaluaron mediante Western blot con anticuerpos específicos para ambas isoformas (Sanjuan, M. A., D. R. Jones, *et al.* (2001). "Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling". *J Cell Biol* 153(1): 207-20. Anticuerpo antidgkalfa; Topham, M. K. and S. M. Prescott (1999). "Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions". *J Biol Chem* 274(17): 11447-50. Anticuerpo antiDGKzeta; respectivamente). La transfección con los plásmidos correspondientes (pSUPERGFP-1153: AAGCCA GAAGACCATGGATGA y pSUPERGFP-2450: AAGGTGAAGAGCTGATTGAGG) indujo una fuerte reducción en los niveles de cada una de las proteínas DGK α y ζ (Figura 11).

A continuación se evaluó el efecto de atenuar la expresión de cada una de las isoformas de DGK en la regulación de las señales originadas por estimulación del TCR. Los experimentos demostraron previamente el importante papel de DGK α como modulador negativo de la ruta Ras/ERK mediante la localización a la membrana de RasGRP1. Como puede observarse, la atenuación de DGK α tuvo un marcado efecto sobre la cinética de fosforilación de ERK que resultó más intensa y transitoria comparada con la estimulación en células expresando niveles normales de DGK α (Figura 12) Sin embargo, en estas condiciones la atenuación de DGK ζ no tuvo ningún efecto aparente mediante modulación de RasGRP1.

La generación de DAG regula la localización a la membrana de proteínas quinasas de la familia C (PKCs). La estimulación del receptor de antígeno TCR induce la translocación a la membrana de las isoforma alfa de PKC con una cinética bifásica. Como se observa en la Figura 13, la atenuación de la expresión de DGK α induce una cinética de translocación mucho más transitoria perdiéndose el segundo pico de translocación. Por el contrario, la atenuación de la expresión de DGK ζ indujo una cinética de translocación mucho más sostenida. Un efecto similar se observó sobre la cinética de translocación de PKC θ , que, como es el caso para PKC α translocaba de forma mucho más intensa en las células con niveles reducidos de DGK θ .

La activación del TCR induce una mayor actividad PI3K que, a su vez, regula la activación de la quinasa PDK1 que fosforila y activa la quinasa AKT. La activación de esta quinasa es esencial para la activación linfocitaria. Como puede verse en la Figura 14 la fosforilación de AKT en la T308, el sitio de fosforilación por PDK1, resulta elevada en células con menor expresión tanto de DGK α como de DGK ζ , siendo más pronunciado el efecto en el caso de esta última. Por el contrario, la fosforilación de AKT en la S473 no se vio afectada por la alteración de los niveles de ninguna de las dos DGKs.

En resumen, estos experimentos demuestran la eficaz atenuación de DGK α empleando shRNAi y demuestran la acción diferencial de esta isoforma frente a DGK ζ . Estos experimentos indican el potencial uso de esta herramienta para atenuar la expresión de DGK α en aquellas células o tejidos donde su expresión pueda originar patologías.

Material y métodos

Líneas celulares

La línea celular BaF3 se mantuvo en cultivo en medio RPMI suplementado con 2 mM de glutamina, 10% suero fetal bovino (FCS), 50 nM β -mercaptoetanol y 50 U/ml de interleuquina-2 (IL2) recombinante o sobrenadante de células Wehi3B que aporta interleuquina-3 (IL-3) al 10%. Las líneas HEK293, Jurkat y JCAM se mantuvieron con medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 10% de FCS. Las líneas celulares SU-DHL1 y Karpas 299 se mantuvieron con medio RPMI suplementado con 2 mM de glutamina, 10% FCS. Todas las líneas se mantuvieron a 37C y 10% de CO₂.

Estimulación de células con anticuerpos solubles CD3/CD8

Las células de la línea Jurkat en crecimiento exponencial se recogieron en tampón HBSS (25 mM de hepes KOH pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 132 mM NaCl, 0,1% BSA) en tubos de 1.5 ml, uno por cada punto de estimulación, a una concentración nunca superior a 5x10⁶ células/ml. Las células fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración final de 1 μ g/ml cada uno. En el caso de usar el inhibidor de DGK, R59949, las células se incubaron 30 minutos antes de la estimulación con el inhibidor a una concentración de 30 μ M. Tras la estimulación durante los tiempos indicados, las células se congelaron a -80°C y posteriormente se lisaron para analizar las proteínas por técnicas de SDS-PAGE y western blot.

ES 2 322 422 B1

Lisis celular

Las células se lisaron en el tampón p70 (10 mM Hepes, pH 7.5, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 0.2% Nonidet P-40, 1 mM ditioneitol, 50 mM NaF, 10 μ g/ml de leupeptina y de aprotinina, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato sódico, y 20 mM -glicerolfosfato) a 4° durante 10 minutos. Después el lisado se centrifugó a 15.000 g, a 4° durante 15 minutos. En el sobrenadante se cuantificó la cantidad de proteína, una vez cuantificada mediante el detergente SDS se redujeron las proteínas con tampón de Laemmli y se separan éstas en geles de poliacrilamida y electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y estas se analizaron con anticuerpos específicos frente a la proteína de interés.

Plásmidos y Transfecciones

Los vectores de expresión para GFP-DGK α silvestre (wt), GFP-DGK α Δ (1-196) y HA-DGK α usados fueron previamente generados y descritos en el laboratorio (Sanjuan, Jones *et al.* 2001; Cipres, Carrasco *et al.* 2003). Sobre los mismos se realizaron la mutación puntual de la tirosina 335 por alanina o por aspártico.

Los oligos de ADN usados para realizar la mutagénesis dirigida se resumen en la Tabla Materiales 1:

TABLA Materiales 1

MUTACIÓN	OLIGO DISEÑADO
Y335D ratón	5' CCTCCGTGTTCCATCGACCCAGCGTCCTGGTAT 3' 3' GGAGGCACAAGGTAGCTGGGGTCGCAGGACCATA 5'
Y335F ratón	5' CCTCCGTGTTCCATCTTCCCAGCGTCCTGGTAT 3' 3' GGAGGCACAAGGTAGAAGGGGTCGCAGGACCATA 5'
Y335D cerdo	5' CCTCCATCTTCCATCGATCCCAGTGTCCTGGCC 3' 3' GGAGGTAGAAGGTAGCTAGGGTCACAGGACCGG 5'
Y335F cerdo	5' CCTCCATCTTCCATCTTCCCAGTGTCCTGGCC 3' 3' GGAGGTAGAAGGTAGAAAGGGTCACAGGACCGG 5'

Para obtener las mutaciones puntuales de la tirosina 335 se usó el sistema "QuickChange Site-directed mutagenesis kit" de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la transfección de las células Ba/F3 se recogieron 12.5×10^6 de células en crecimiento exponencial y se resuspenden en un volumen de 500 μ l de medio sin suero previamente atemperado. Se transfectaron 20 μ g de ADN del plásmido de interés con un electrochoque que se realiza a 304 v y 975 μ F. Después del electrochoque, las células se recuperaron con 30 ml de medio completo y 24 horas después se realizó el ensayo correspondiente. En el caso de las células Jurkat, se transfectaron 20 μ g de ADN del plásmido de interés en el mismo número de células que en BaF3 pero se resuspenden en 400 μ l de medio sin suero previamente atemperado. El electrochoque se realizó a 270 v y 975 μ F y las células se recuperaron con 20 ml de medio completo, 24 horas después se realizó el ensayo. Las células HEK293 se transfectaron con lipofectamina según las instrucciones del fabricante.

Geles de poliacrilamida y Western Blot

Las proteínas de los lisados celulares se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El porcentaje de los geles varió en función de la proteína analizada entre el 7.5% y el 12%. En el caso de DGK α el porcentaje fue del 10%. Una vez realizada la separación de las proteínas, éstas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por técnicas de western blot.

El análisis de las membranas de nitrocelulosas se realizó con anticuerpos específicos siguiendo las instrucciones del fabricante. Excepto variaciones puntuales, en el protocolo básico se incubaron las membranas de nitrocelulosa con leche al 5% en TBS durante una hora a temperatura ambiente para bloquearlas. Después se realizaron 2 lavados de

ES 2 322 422 B1

10 minutos con TBS/Tween-20 0,1%, seguido de una incubación de 1 hora con el anticuerpo primario a temperatura ambiente. Pasada la hora, se lavó la membrana de nitrocelulosa con 3 lavados de TBS/Tween-20 0,1% y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 2 veces la membrana con TBS/Tween-20 0,1%, y se reveló mediante la reacción luminiscente que genera la HRP en presencia de su sustrato para lo cual se usó el reactivo ECL. Esta reacción luminiscente se recogió por autoradiografía y se cuantificó mediante el programa Image J.

Generación del anticuerpo, no comercial, anti-pY335DGK α

Un péptido sintético correspondiente a la secuencia de DGK α P329-A339, NH₂-CPPSS(fosfoY)PSVLA-COOH se conjugó a KLH. 300 μ g del antígeno conjugado a KLH se emulsionaron con adyuvante de Freund completo y se inyectaron en conejas de 10 meses de edad. Cada dos semanas, se reinyectan otros 150 μ g de antígeno con adyuvante de Freund incompleto. Tres días después de la sexta reinyección, se sangró el conejo y el antisuero fue recolectado. La especificidad del anticuerpo se confirmó por dot blot y western blot usando un péptido no fosforilado, NH₂-CPPS-SIYPSVLA-COOH, y un mutante de DGK α que no puede ser fosforilado en la tirosina 335, Y335F. El anticuerpo reaccionó con el péptido fosforilado pero no con el no fosforilado o con el mutante Y335F.

Inmunoprecipitación

Las células se lisaron en tampón NP-40 (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 ng/ μ l aprotinina, 10 ng/ μ l leupeptina), después se centrifugaron a 15.000 g, 4°C. Una vez se recoge el sobrenadante, se cuantificó la cantidad de proteína del mismo. La inmunoprecipitación se realizó según las especificaciones de cada anticuerpo, por lo general 1-5 μ g/ml de anticuerpo en 300-500 μ g de proteína durante 1 hora a 4°C. Pasado ese tiempo, se incorporó el anticuerpo secundario capaz de reconocer el anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar, Gamma-Bind G protein shepharose, 1 hora a 4°C. Finalmente, el inmunoprecipitado se recolectó por centrifugación, y se lavó 2 veces con el tampón de lisis NP40 usado para lisar, una vez con un tampón LiCl (0.5 M LiCl y Hepes 50 mM pH 7.4) y 3 veces con tampón Hepes 50 mM pH 7.4.

Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento se realizó como se describe en Cao, Janssen *et al.* 2002 con las siguientes modificaciones. Las células Jurkat se recolectaron y se resuspendieron en tampón de lisis 1 previamente enfriado (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 40 μ g/ml de digitonina) suplementado con la mezcla de inhibidores de proteínas. Se lisaron las células durante 15 minutos a 4°C, después se centrifugaron a 4500 g durante 4 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante (fracción citosólica, C). La fracción insoluble se resuspendió en tampón de lisis 2 previamente enfriado (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 0.2% NP40) y se lisaron durante 10 minutos a 4°C, después se centrifugó a 15000 g, 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante (fracción de membrana, M1). La fracción insoluble de este segundo lisado es resuspendida en el tampón de lisis 3 (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 1% NP40) y sujeta al mismo proceso que con el tampón 2. El sobrenadante de esta segunda fracción contiene las proteínas más fuertemente asociadas a las membranas celulares (fracción de membrana, M2). La última fracción insoluble fue resuspendida en tampón de carga de proteínas (tampón de Laemmli) y corresponde a la fracción de proteínas del citoesqueleto (Ck). Las diferentes fracciones son separadas por técnicas de SDS-PAGE y western blot.

Ensayo DGK

Las proteínas fueron inmunoprecipitadas según su protocolo y su actividad se ensayó mediante incorporación del fosfato gamma de una molécula de ATP marcado radiactivamente (P³²) en la molécula de DAG de cadena de ocho átomos de carbono, 1,2-octanoil-sn-glicerol (C8-DAG), para dar lugar a ácido fosfatídico con una cadena de ocho átomos de carbono marcado con fósforo 32 (C8-P³²A). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos, y una vez se produjo, los lípidos fueron extraídos mediante un solvente compuesto de CHCl₃/MeOH/HCL (2N) (20:10:5,v/v/v). Los lípidos fueron secados por medio de centrifugación en vacío atmosférico, para después ser resuspendidos en un solvente de CHCl₃, MeOH, y amonio 4 M (9:7:2,v/v/v). Estos lípidos fueron separados en cromatografía en capa fina (TLC) y el resultado de la separación se visualizó por autoradiografía de la misma.

Microscopia confocal

Las células Jurkat, 24 horas después de la transfección, se centrifugaron y se resuspendieron en HBSS (25 mM de hepes KOH pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 132 mM NaCl, 0,1% BSA), para después transferirlas a cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina y, tras permitir que se adhieran, se mantuvieron a 37°C. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal Leica y analizadas con el programa ImageJ.

Estimulación de células con anticuerpos anti-CD3/CD28 pegados a la placa

La superficie de las cámaras de microscopía se incubaron con una mezcla de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$ cada uno) en 150 mM Tris-HCl pH8, a temperatura ambiente durante 1 hora ó a 4°C durante 16 horas. Las células Jurkat, transfectadas 24 horas antes con la construcción indicada, se centrifugaron y se resuspendieron en HBSS. Estas células se incorporaron a las cámaras de microscopía previamente atemperadas a 37°C, y se recogieron las imágenes por microscopía confocal a los tiempos indicados tomando como tiempo cero el momento en que se incorporan las células. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ.

Estimulación de células con anticuerpos solubles CD3/CD28

Las células de la línea Jurkat en crecimiento exponencial se recogieron en tampón HBSS (25 mM de hepes KOH pH 7.4, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 132 mM NaCl, 0,1% BSA) en tubos de 1.5 ml, uno por cada punto de estimulación, a una concentración nunca superior a 5×10^6 células/ml. Las células fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ cada uno. En el caso de usar el inhibidor de DGK, R59949, las células fueron incubadas 30 minutos antes de la estimulación con el inhibidor a una concentración de 30 μM . Tras la estimulación durante los tiempos indicados, las células se congelaron a -80°C y posteriormente se lisaron para analizar las proteínas por técnicas de SDS-PAGE y western blot.

Bibliografía

Abe, T., X. Lu, et al. (2003). “Site-directed mutagenesis of the active site of diacylglycerol kinase alpha: calcium and phosphatidylserine stimulate enzyme activity via distinct mechanisms”. *Biochem J* 375(Pt 3): 673-80.

Bacchiocchi, R., G. Baldanzi, et al. (2005). “Activation of alpha-diacylglycerol kinase is critical for the . mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase”. *Blood* 106(6): 2175-82.

Berridge, M. J. (1997). “Lymphocyte activation in health and disease”. *Crit Rev Immunol* 17(2): 155-78. **Ci-pres, A., S. Carrasco, et al. (2003).** “Regulation of diacylglycerol kinase alpha by phosphoinositide 3-kinase lipid products”. *J Biol Chem* 278(37): 35629-35.

Cutrupi, S., G. Baldanzi, et al. (2000). “Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility”. *Embo J* 19(17): 4614-22.

Flores, I., T. Casaseca, et al. (1996). “Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation”. *J Biol Chem* 271(17): 10334-40.

Flores, I., D. R. Jones, et al. (1999). “Diacylglycerol kinase inhibition prevents IL-2-induced G1 to S transition through a phosphatidylinositol-3 kinase-independent mechanism”. *J Immunol* 163(2): 708-14.

Fukunaga-Takenaka, R., Y. Shirai, et al. (2005). “Importance of chroman ring and tyrosine phosphorylation in the subtype-specific translocation and activation of diacylglycerol kinase alpha by D-alpha-tocopherol”. *Genes Cells* 10(4): 311-9.

Heissmeyer, V., F. Macian, et al. (2004). “Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins”. *Nat Immunol* 5(3): 255-65.

Imai, S. I., M. Kai, et al. (2005). “Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGKkappa”. *J Biol Chem*.

Macian, F., F. Garcia-Cozar, et al. (2002). “Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance”. *Cell* 109(6): 719-31.

Olenchock, B. A., R. Guo, et al. (2006). “Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy”. *Nat Immunol*.

Sakane, F. and H. Kanoh (1997). “Molecules in focus: diacylglycerol kinase”. *Int J Biochem Cell Biol* 29(10): 1139-43.

Sanjuan, M. A., D. R. Jones, et al. (2001). “Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling”. *J Cell Biol* 153(1): 207-20.

Sanjuan, M. A., B. Pradet-Balade, et al. (2003). “T cell activation *in vivo* targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation”. *J Immunol* 170(6): 2877-83.

ES 2 322 422 B1

Shindo, M., K. Irie, et al. (2003). “Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes. DGKgamma and DGKbeta are new targets of tumor-promoting phorbol esters”. *J Biol Chem* **278**(20): 18448-54.

5 **Topham, M. K. and S. M. Prescott (1999).** “Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions”. *J Biol Chem* **274**(17): 11447-50.

10 van **Blitterswijk, W. J. and B. Houssa (1999).** “Diacylglycerol kinases in signal transduction”. *Chem Phys Lipids* **98**(1-2): 95-108.

10 van **Blitterswijk, W. J. and B. Houssa (2000).** “Properties and functions of diacylglycerol kinases”. *Cell Signal* **12**(9-10): 595-605.

15 **Yamada, K., F. Sakane, et al. (1997).** “EF-hand motifs of alpha, beta and gamma isoforms of diacylglycerol kinase bind calcium with different affinities and conformational changes”. *Biochem J* **321** (Pt 1): 59-64.

Zha, Y., R. Marks, et al. (2006). “T cell energy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha”. *Nat Immunol.*

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de diagnóstico y pronóstico de una enfermedad en la que se produce la estimulación y proliferación de células T del sistema inmune seleccionada de la lista que consiste en enfermedades autoinmunes, alérgicas, inflamatorias y alteraciones linfoproliferativas **caracterizado** porque comprende:

a) identificación o determinación del nivel de fosforilación de la proteína DGK α en el residuo tirosina Y335, en una muestra biológica, y

10 b) comparación de dicha determinación observada en a) con una muestra control, y donde su presencia incrementada es indicativa de la existencia de una enfermedad en la que se produce la estimulación y proliferación de células del sistema inmune.

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación se realiza con un anticuerpo específico frente a la tirosina fosforilada (pY335) de la proteína DGK α de SEQ ID NO2.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

20 4. Anticuerpo, monoclonal o policlonal y/o recombinante, específico frente a la tirosina fosforilada (pY335) de la proteína DGK α de SEQ ID NO2.

5. Proteína DGK α fosforilada en el residuo tirosina 335 o un fragmento o péptido del mismo, capaz de ser reconocido específicamente por un anticuerpo según la reivindicación 4.

25 6. Proteína DGK α fosforilada según la reivindicación 5 **caracterizada** porque es de un mamífero de la lista que consiste en ratón, cerdo, rata y humano.

30 7. Proteína DGK α fosforilada según la reivindicación 5 **caracterizada** porque es la proteína humana DGK α fosforilada en la tirosina 335 de SEQ ID NO2.

8. Procedimiento de identificación de compuestos capaces de alterar, activar o inhibir la actividad kinasa de la proteína DGK α mediante la utilización de un anticuerpo según la reivindicación 4.

Figura 1

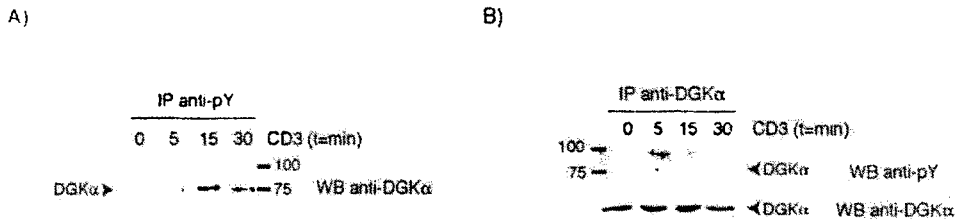


Figura 2

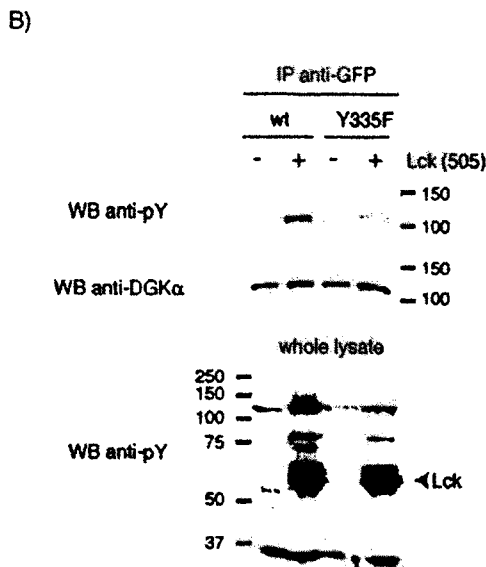
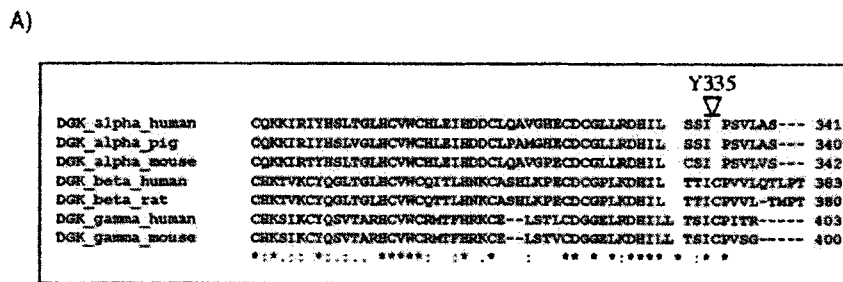


Figura 3

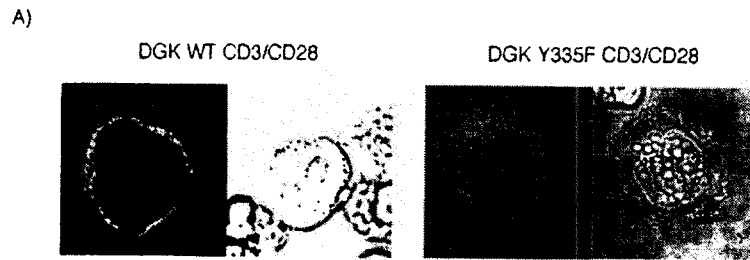


Figura 4

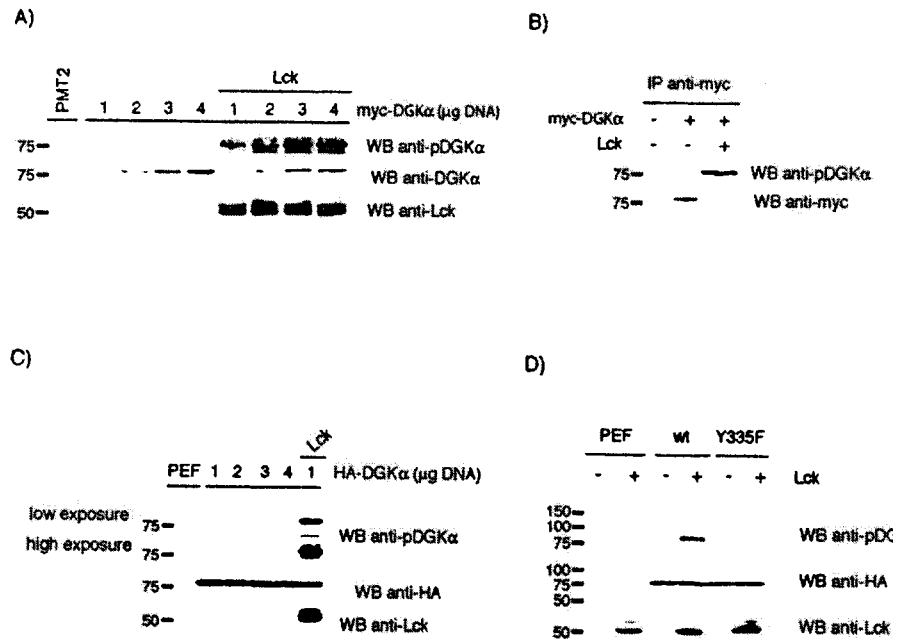


Figura 5

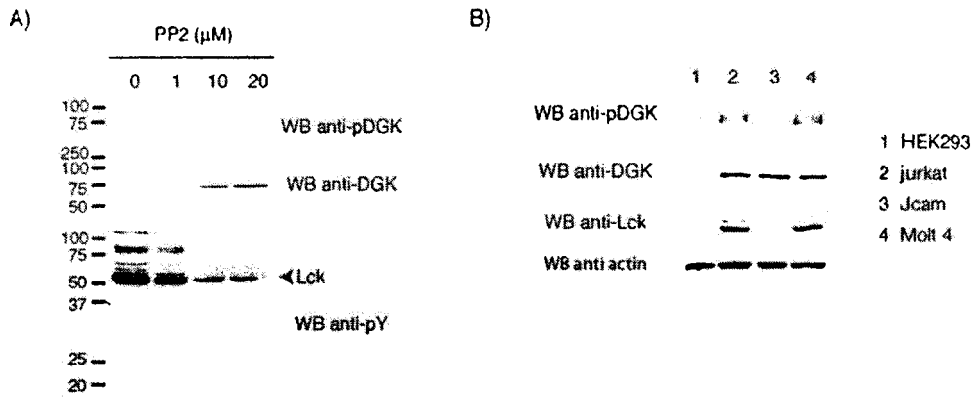
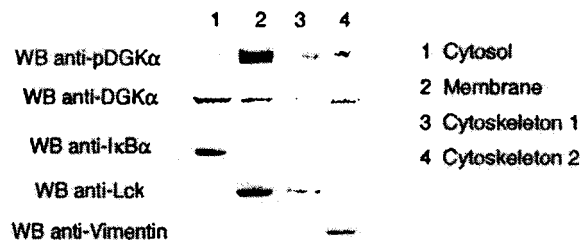


Figura 6



5

Figura 7

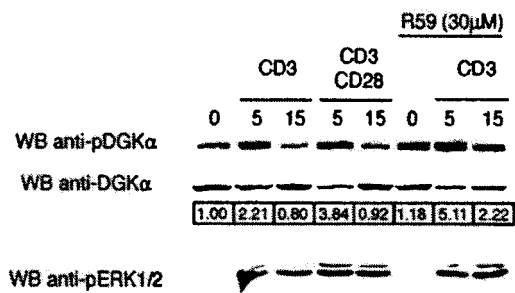


Figura 8

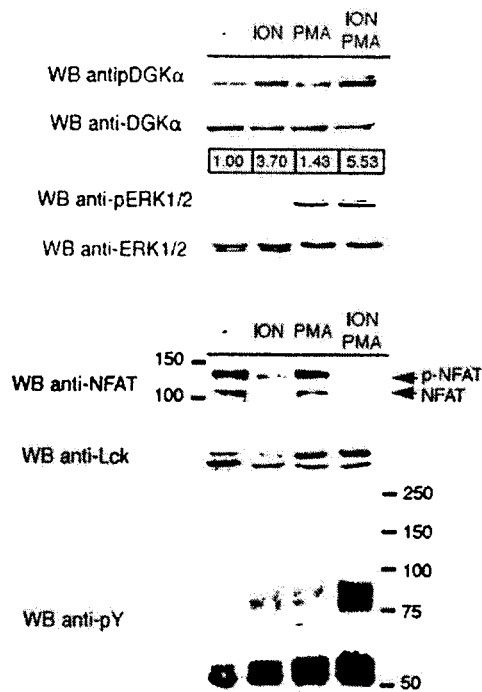
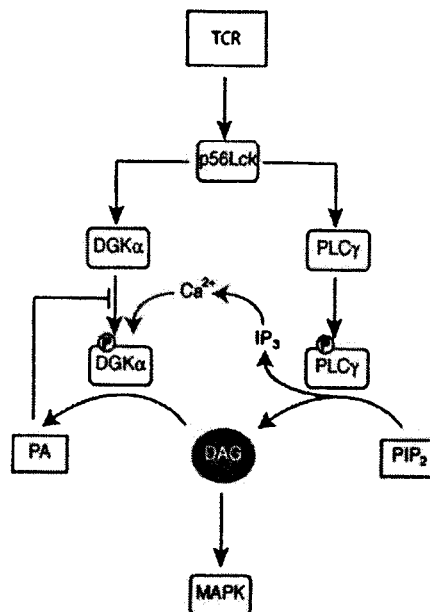


Figura 9





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 322 422

② Nº de solicitud: 200701552

③ Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BASE DE DATOS AGENESEQ (GSP) ONLINE. EBI site. 26.10.2008. WO 02099060 A2 (EXELISIS INC) 12.12.2002. Nº ACCESO AAE 36086. Esta secuencia muestra un 99.7% identidad con SEQ.ID. Nº 2 con solapamiento en 735 aa.	5-7
A	SANJUÁN M. A. et al. "Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signalling". THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. 02.04.2001. Vol. 153, Nº. 1, página 207-220. ISSN 0021-9525; página 215, figura 8; página 216, figura 9d.	1-4,8
A	ALONSO R. et al. "Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 05.08.2005 . Vol. 280, Nº. 31, páginas 28439-28450. ISSN 0021-9258.	1-4,8

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

01.06.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/25 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)