



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 595**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02748716 .4**

96 Fecha de presentación : **23.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1390525**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Piruvato-quinasa como nueva molécula diana.**

30 Prioridad: **23.05.2001 EP 01112601**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE**

72 Inventor/es: **Ullrich, Axel;
Stetak, Attila y
Keri, Gyorgy**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Piruvato-quinasa como nueva molécula diana.

5 La presente invención se refiere al uso de una piruvato-quinasa o un ácido nucleico que codifica la misma como diana para la modulación de procesos apoptóticos, particularmente como molécula diana para la diagnosis, la prevención o el tratamiento de trastornos asociados con apoptosis, tales como tumores.

10 La piruvato-quinasa (ATP: piruvato-2-O-fosfo-transferasa, PK), es una enzima glicolítica controladora de la velocidad y cataliza la formación de piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP. En los mamíferos, PK existe como cuatro isoenzimas designadas como tipos M1, M2, L y R, cuya expresión difiere de un tipo de célula a otra (Tanaka *et al.* 1967, Ibsen *et al.* 1974, Nowak *et al.* 1981). El tipo M2, considerado como el prototipo, es predominante en el feto, en las neoplasias (sic) y en tejidos no diferenciados o proliferantes, pero está también distribuido ampliamente en tejidos adultos (Mallati *et al.* 1992, Guminska *et al.* 1988). Esta forma es reemplazada progresivamente por el tipo 15 M1 en el músculo esquelético, el corazón y el cerebro durante la diferenciación. La carcinogénesis invierte aparentemente este proceso. Los tipos M1 y M2 son producidos a partir del mismo gen, por remodelación alternativa. La diferencia entre las dos isoformas reside en un exón que codifica 51 residuos de aminoácidos, en los cuales 21 residuos son diferentes. La propiedad enzimológica de la isoenzima tipo M1 es muy diferente de las otras tres formas, dado que la misma es la única que no está regulada alostéricamente. El tipo M1 exhibe cinética hiperbólica y no es activado 20 por fructosa-1,6-bisfosfato (FBP); en contraste, el tipo M2 exhibe curva cinética que es activado por FBP (Saheki *et al.* 1982).

25 La enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato-des-hidrogenasa exhibe funciones no relacionadas con su actividad glicolítica y juega un papel en diversos procesos celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que GAPDH sufre translocación al núcleo e induce apoptosis, para fijar t-RNAs específicos y posiblemente está implicada en la activación de la transcripción. Sin embargo, no se ha hecho sugerencia alguna en la bibliografía publicada en el sentido de que la piruvato-quinasa esté asociada con procesos apoptóticos.

30 Así, fue sorprendente que el análogo anti-proliferativo de somatostatina TT-232 (Kéri *et al.*, 1993a, Kéri *et al.* 1993b y Kéri *et al.* 1996) se fije a piruvato-quinasa, particularmente la isoenzima de piruvato-quinasa M2. La fijación de TT-232 a piruvato-quinasa conduce a una translocación nuclear y una inducción de apoptosis. Este resultado demuestra que la piruvato-quinasa está implicada en procesos apoptóticos y representa una molécula diana para el desarrollo de nuevos fármacos, particularmente de fármacos contra el cáncer y las enfermedades inflamatorias.

35 La presente invención se refiere a un método de identificación de nuevos moduladores de apoptosis que comprende cribado en busca de sustancias capaces de modular la actividad de piruvato-quinasa, en donde la actividad comprende una translocación al núcleo.

40 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una isoforma M2 de piruvato-quinasa nuclear, que exhibe mayor movilidad electroforética comparada con la isoforma citosólica de piruvato-quinasa.

45 El término “piruvato-quinasa”, tal como se utiliza en la presente solicitud, hace referencia a la isoenzima de piruvato-quinasa M2. Particularmente, la piruvato-quinasa es la isoenzima M2 (Swiss-Prot. número 14786). La secuencia de DNA que codifica las isoformas de piruvato-quinasa se describe en Genbank, número de acceso X56494. Las piruvato-quinasas pueden obtenerse a partir de fuentes animales humanas o no humanas, particularmente de fuentes de mamífero, tales como hombre, ratón, rata, hámster, mono, cerdo, etc. Es especialmente preferida la piruvato-quinasa M2 humana que comprende:

- a) la secuencia de aminoácidos que se muestra en Swiss-Prot. número P14786 o
- 50 b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 80%, particularmente de al menos 90% y más particularmente de al menos 95% con aquella, en donde la identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse por un programa de computadora adecuado, tal como GCG o BLAST.

55 Adicionalmente, el término “piruvato-quinasa” abarca derivados recombinantes o variantes de la misma, así como fragmentos de la misma que tienen actividad biológica. Estos derivados, variantes y fragmentos de aquella pueden obtenerse como productos de expresión de genes alélicos variantes o de genes alterados recombinantemente, v.g. genes modificados o truncados y/o como productos de la escisión proteolítica. El término “actividad biológica” o “actividad” 60 en el contexto de la piruvato-quinasa comprende preferiblemente la aptitud para modular la apoptosis, particularmente la fijación al análogo de somatostatina TT-223 y/o la translocación en el núcleo. Residuos particularmente importantes para actividad de piruvato-quinasa son los residuos de aminoácidos 334-420 que contienen una señal de localización nuclear.

65 Una variante de piruvato-quinasa particularmente preferida es una isoforma nuclear de piruvato-quinasa M2 que difiere de la piruvato-quinasa citosólica en que la misma exhibe una movilidad electroforética mayor. La isoforma nuclear puede obtenerse a partir de la isoforma citosólica por translocación y procesamiento nucleares.

La proteína piruvato-quinasa es codificada por un ácido nucleico que puede ser un DNA o un RNA. preferiblemente, el ácido nucleico comprende:

- (a) la secuencia de ácido nucleico que se muestra en Genbank, número de acceso X56494 o complementaria de la misma
- (b) una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia correspondiente a (a) dentro del alcance de la degeneración del código genético o
- (c) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones severas con una secuencia de (a) y/o (b).

El término “hibridación en condiciones severas” de acuerdo con la presente solicitud se utiliza como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, Laboratory Press (1989), 1101-1104. Por consiguiente, la hibridación en condiciones severas ocurre cuando una señal de hibridación positiva se detecta todavía después de lavado durante una hora con 1 x SSC y 0,1% SDS a 55°C, preferiblemente a 62°C y muy preferiblemente a 68°C, en particular durante 1 h en 0,2 x SSC y 0,1% SDS a 55°C, preferiblemente a 62°C y muy preferiblemente a 68°C. Una secuencia de nucleótidos que se hibrida en tales condiciones de lavado con una secuencia como se muestra en el listado de secuencias o una secuencia de nucleótidos complementaria o una secuencia dentro del alcance de la degeneración del código genético está abarcada por la presente invención.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser moléculas de ácido nucleico recombinantes generadas por métodos recombinantes, v.g. por procedimientos de amplificación conocidos tales como PCR. Por otra parte, las moléculas de ácido nucleico pueden ser también ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico están presentes en un vector, que puede ser cualquier vector procariota o eucariota, en el cual la secuencia de ácido nucleico está presente preferiblemente bajo control de una señal de expresión adecuada, v.g. promotor, operador, intensificador, etc. Ejemplos de vectores procariotas son vectores cromosómicos tales como bacteriófagos y vectores extracromosómicos tales como plásmidos, prefiriéndose vectores plasmídicos circulares. Ejemplos de vectores eucariotas son vectores de levadura o vectores adecuados para células superiores, v.g. células de insecto o células de mamífero, plásmidos o virus.

La piruvato-quinasa es capaz de fijar el análogo de somatostatina TT-232 y mediar su efecto, particularmente su efecto para estimular procesos apoptóticos. Así, una estimulación de la apoptosis puede obtenerse por aumento de la cantidad y/o actividad de piruvato-quinasa, particularmente la actividad de translocación nuclear. En contraste con ello, puede obtenerse una inhibición de la apoptosis por reducción de la actividad de piruvato-quinasa, particularmente la actividad de translocación nuclear.

Debido a su actividad, la piruvato-quinasa es una diana adecuada para agentes para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado con apoptosis, particularmente una enfermedad hiperproliferativa que puede seleccionarse de tumores, v.g. cáncer de colon, cáncer de mama o melanomas y enfermedades inflamatorias, v.g. enfermedades inflamatorias neuronales, tales como neuroartritis, o una enfermedad degenerativa.

La presente invención se refiere a un método de identificación de nuevos moduladores de la apoptosis que comprende cribado respecto a sustancias capaces de modular la actividad de piruvato-quinasa M2. Particularmente, la invención se refiere a un método de identificación de sustancias capaces de fijarse a piruvato-quinasa y estimular la translocación al núcleo.

El método de cribado puede ser un ensayo de cribado de alta capacidad, en el cual se testan en paralelo una pluralidad de sustancias. El ensayo de cribado puede ser un ensayo celular o un ensayo molecular, en el cual se determina una interacción de una sustancia a testar con la actividad de piruvato-quinasa. La piruvato-quinasa puede proporcionarse en un sistema celular, preferiblemente en un sistema celular que sobreexpresa piruvato-quinasa, v.g. un cultivo de células o un modelo animal no humano. Por otra parte, pueden utilizarse sistemas no celulares, v.g. fracciones de células que contienen piruvato-quinasa o piruvato-quinasa sustancialmente aislada y purificada. Cualquier sustancia activa identificada por este método, v.g. cualquier sustancia capaz de modular, particularmente estimular la translocación nuclear de piruvato-quinasa puede utilizarse como un agente farmacéutico o como una estructura conductora que se modifica ulteriormente para mejorar las propiedades farmacéuticas. Así pues, la invención comprende adicionalmente formular un modulador de piruvato-quinasa, como se identifica por el método que se ha descrito arriba o una sustancia obtenida a partir del mismo, v.g. por derivatización química o por modelización molecular, como una composición farmacéutica junto con vehículos, diluyentes o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se explica con mayor detalle en las figuras y ejemplos siguientes:

Figura 1. Representación esquemática de los mutantes de piruvato-quinasa generados.

Figura 2. Efecto de diferentes mutantes de delección de piruvato-quinasa sobre la muerte celular inducida por TT-232.

Figura 3. Localización de piruvato-quinasa. Células NIH3T3 se dejaron sin tratar (A) o se trataron con TT-232 50 μ M durante 4 horas (B). Las células se fijaron con metanol, se bloquearon con PBS + 3% BSA y se sometieron

a inmunotinción con anticuerpo policlonal PK-M2 primario específico y secundario marcado con FITC (verde). Los núcleos se visualizaron por tinción con yoduro de propidio (rojo, imagen insertada).

Figura 4. Translocación nuclear de la piruvato-quinasa después de diferentes estímulos apoptóticos. Se transfec-
 taron transitoriamente células Cos-7 con plásmido de expresión eucariota pEGFP-PK-M2 (produciendo piruvato-
 quinasa de tipo salvaje fusionada en el terminal N a GFP).

Figura 5. Translocación nuclear de los mutantes de delección de piruvato-quinasa después de estímulos apoptóticos.
 Se transfectaron transitoriamente células Cos-7 con el plásmido de expresión eucariota pEGFP-PK-M2 (produciendo
 mutantes de delección diferentes de la piruvato-quinasa fusionada en el terminal N a GFP) y 48 horas después de la
 transfección las células se dejaron sin tratar (A-L) o se trataron con TT-232 50 μ M durante 4 horas (D'-L'). (Ex: 485
 nm = GFP, Ex: 390 = yoduro de propidio).

Fig. 6. Fijación *in vitro* de somatostatina y TT-232 a piruvato-quinasa muscular de conejo.

Fig. 7. Efecto de la sobreexpresión de piruvato-quinasa sobre la sensibilidad hacia TT-232. (A) Transferencia
 Western de lisados de células totales de 293 HEK con o sin sobreexpresión marcada con HA de PK-M2 de tipo salvaje
 (B) Células transfectadas de manera estable se trataron con concentración creciente de TT-232 durante 24 horas la
 cantidad de células vivas se midió por el ensayo MTT (n = 32, *: p < 0,005, **: p < 0,001 determinado por el test T
 de Student).

Fig. 8. Localización subcelular de PK-M2 endógena después de la estimulación con peróxido o UV. Células Cos-
 7 se dejaron sin tratar, se trataron con TT-232 50 μ M (A), peróxido de hidrógeno 100 μ M (B), o 120 mJ/cm² de
 UV (C) y se incubaron durante periodos de tiempo diferentes como se indica. Las células se separaron en fracciones
 citosólica (c) o nuclear (n) cargadas por triplicado y se sometieron a transferencia con PK-M2 (paneles superiores,
 Erk-2 (paneles centrales) o Histona H1 (paneles inferiores).

Fig. 9. Efecto de PK-M2 direccionada al núcleo sobre el crecimiento celular. (A y C). Se transfectaron células
 Cos-7 durante 5 horas con vectores vacíos, pEGFP-PK-M2 (PKM2) o con pEYFP-PKM2-NLS (PKM2-NLS) (A) o
 pEGFP-PK-M1 (PKM2) o con pEYFP-PKM1-NLS (B). Las células se tripsinizaron, se extendieron en placas de 96
 pocillos, se incubaron durante 24, 48, y 72 horas en medio que contenía FCS, y se midió la densidad de células por
 el ensayo MTT. Las células se dejaron adherir durante 10 horas, se midieron y se consideró esto como el momento
 cero (n = 12 de tres experimentos independientes). (B y D) Una porción de las células transfectadas se incubó durante
 48 horas, se separó por electroforesis en gel con gradiente de SDS 6-15% y se analizó en transferencia Western con
 anticuerpo GFP (panel superior). La re-exploración del filtro con anticuerpo de tubulina (panel inferior) exhibió una
 carga igual.

Fig. 10. Efecto de PK-M2 direccionada al núcleo sobre la apoptosis. Se transfectaron células Cos-7 con pEGFP (A,
 A'), pEYFP-NLS (B, B'), pEGFP-PKM2 (C', C') o pEYFP-PKM2-NLS (D, D'), pEGFP-PKM1 (E, E') o pEYFP-
 PKM1-NLS (F, F') incubados durante 48 horas en medios que contenían FCS. Las células se fijaron, se tiñeron
 los núcleos con Hoechst y se analizaron bajo microscopio fluorescente respecto a GFP (A-F) y respecto a tinción
 nuclear (A'-F'). Los núcleos altamente fluorescentes, condensados, y fragmentados se consideraron como apoptóticos
 (flechas).

Fig. 11. Detección de la degradación del DNA. (A y B) Se transfectaron células Cos-7 con constructos diferentes,
 se incubaron durante 48 horas en medios que contenían FCS, se dividieron las muestras en dos partes, y el DNA se
 extrajo y analizó en gel de agarosa al 0,6%. (C y D) Se analizó la segunda parte de la muestra respecto a expresión de
 proteínas. Se cargaron lisados de células totales en gel en gradiente al 6-15% y se analizaron en transferencia Western
 con anticuerpo GFP (panel superior). La re-exploración del filtro con anticuerpo de tubulina (panel inferior) exhibió
 carga igual.

Fig. 12. Expresión de piruvato-quinasa deficiente en quinasa en células Cos-7. Se cargaron lisados de células totales
 en gel en gradiente 6-15% y se analizaron en transferencia Western con anticuerpo GFP (panel superior, GFP se indica
 por puntas de flecha y las proteínas de fusión GFP-piruvato-quinasa M2 por flechas). La re-exploración del filtro con
 anticuerpo de tubulina (panel inferior) exhibía una carga igual.

Fig. 13. Actividad de piruvato-quinasa de células Cos-7 que sobreexpresan piruvato-quinasa de tipo salvaje
 (PKM2wt) o piruvato-quinasa M2 deficiente en quinasa (PKM2KM). Los lisados de células totales se ensayaron
 respecto a actividad de piruvato-quinasa por ensayo de LDH acoplada. (n = 6).

Fig. 14. Efecto de PK-M2 deficiente en quinasa y direccionada al núcleo sobre la apoptosis. Se transfectaron
 células Cos-7 con pEYFP-NLS (GFP-NLS), pEYFP-PKM2wt-NLS (GFP-NLS PKM2wt) o pEYFP-PKM2 K/M-NLS
 (GFP-NLS PKM2 K/M), incubadas durante 48 horas en medios que contenían FCS. Se fijaron las células, se tiñeron
 los núcleos con Hoechst y se analizaron bajo microscopio fluorescente respecto a GFP (parte superior) y respecto
 a tinción nuclear (parte inferior). Los núcleos altamente fluorescentes, condensados y fragmentados se consideraron
 como apoptóticos (flechas).

Ejemplos

Se estudió el efecto apoptótico de un nuevo análogo de somatostatina selectivo de tumores; TT-232, y se encontró que el compuesto se fija a piruvato-quinasa M2. La isoforma de piruvato-quinasa M2 se clonó a partir de RNA derivado de la línea de células de carcinoma epidermoide A431, con PCR. Se generaron varios mutantes de delección de la isoforma M2 de piruvato-quinasa en el vector de expresión eucariota pCDNA3.1 (Invitrogen) se muestra en la Figura 1.

Efecto de los mutantes sobre la inducción de apoptosis por TT-232 se investigó en células Cos-7 que sobreexpresaban transitoriamente estos mutantes. Las células se transfectaron a 70% de confluencia con 1 μ g de DNA utilizando el método de lipofectamina. Se indujo la apoptosis 48 horas después de la transfección con TT-232 25 μ M y las células se sometieron a recuento 24 horas más tarde. Con objeto de discriminar entre células vivas o muertas se utilizó la exclusión con azul de metilo (Figura 2).

La sobreexpresión del aminoácido 100 N-terminal (sic) de la molécula de piruvato-quinasa era suficiente para bloquear el efecto del análogo de somatostatina TT-232. Este resultado sugiere que la piruvato-quinasa, análogamente a GAPDH, juega un papel en la apoptosis. Sin embargo, dado que la actividad de piruvato-quinasa no se veía afectada por tratamiento con TT-232, este efecto apoptótico es independiente de la actividad catalítica de la enzima.

Se ha informado previamente de la fijación de PK a tubulina (Ovadi *et al.* 1999) y se ha encontrado que TT-232 inhibe esta interacción. Por esta razón, se estudió en detalle la localización de la piruvato-quinasa. Células NIH3T3 se dejaron sin tratar (Figura 3A) o se trataron con TT-232 50 μ M durante 4 horas (Figura 3B), se fijaron con metanol y se sometieron a inmuno-tinción con la isoforma PK-M2 policlonal específica y el anticuerpo secundario marcado con FITC. El núcleo se visualizó con yoduro de propidio y se detectó la tinción por microscopía láser confocal.

La Figura 3 demuestra que la piruvato-quinasa sufre translocación al núcleo durante el tratamiento con el análogo de somatostatina TT-232. A fin de ver si este efecto es un proceso general durante la apoptosis, se investigó la translocación nuclear después de tratamiento con peróxido de hidrógeno y UV. Se transfectaron transitoriamente células Cos-7 con el plásmido de expresión eucariota pEGFP-PK-M2 y, 48 horas después de la transfección se trataron las células con peróxido de hidrógeno 1 mM durante 4 horas. Las células se trataron con 60 J/cm² de radiación UV y se incubaron durante tiempos diferentes. Las células se fijaron con aldehído glutárico al 1% y se analizaron con microscopía fluorescente y software de formación de imágenes confocales InoVision. La Figura 4 muestra que la translocación nuclear de la piruvato-quinasa se produce después de tratamiento con peróxido-peróxido y UV, confirmando que la translocación de la piruvato-quinasa es un fenómeno general.

Finalmente, los autores de la invención estudiaron la ubicación de la señal de localización nuclear. Por esta razón, varios fragmentos truncados de la piruvato-quinasa se fusionaron a GFP y se estudió la localización de estos fragmentos por tratamiento con el análogo de somatostatina TT-232. Las células Cos-7 transfectadas transitoriamente se dejaron sin tratar o se trataron con TT-232 50 μ M durante 4 horas. Se fijaron las células con aldehído glutárico al 1% y la localización de GFP se detectó y analizó con microscopía fluorescente y software de formación de imágenes confocales InoVision. Los núcleos se tiñeron con propidio-yodo (sic) (Figura 5).

La translocación nuclear era detectable con el tipo salvaje y el mutante Δ C (aminoácidos 1-420) pero no con el mutante truncado PK1-334. Por consiguiente, la proteína piruvato-quinasa tiene una señal de localización nuclear entre los aminoácidos 334 y 420.

Se aisló previamente la piruvato-quinasa M2 como el receptor para el fármaco anticáncer TT-232. Para confirmar la interacción entre la piruvato-quinasa M y la somatostatina o TT-232 se realizó un ensayo de fijación *in vitro* con piruvato-quinasa aislada de músculo de conejo y ¹²⁵I-somatostatina (SS-14). La constante de fijación (dada como valores CI₅₀) para SS-14 o TT-232 se midió por competición entre SS-14 radiomarcada y péptidos "fríos" (Figura 6) y se midió la radiactividad con PhosphoImager después de electroforesis en gel de las proteínas reticuladas.

Para investigar el papel biológico de PK-M2 en el efecto anticáncer de TT-232 se generaron células 293HEK estables que sobreexpresaban PK-M2 de tipo salvaje marcada con HA y se midió la sensibilidad de estas células a las concentraciones de TT-232. Como se muestra en la Figura 7, el aumento de la cantidad de proteína piruvato-quinasa en las células da como resultado una sensibilidad incrementada a TT-232, lo que sugiere que dicha piruvato-quinasa juega un papel importante en el efecto del fármaco.

En las células sin tratar, PK-M2 era citoplásmica. TT-232, peróxido de hidrógeno y UV inducían la translocación nuclear de PK-M2 que precedía a la aparición de la morfología apoptótica. Este resultado soportaba los datos previos de los autores de la invención de que, como la GAPDH, la piruvato-quinasa sufre translocación al núcleo después de los estímulos apoptóticos. Con objeto de investigar ulteriormente, se trataron células Cos-7, se separaron en fracciones citosólica y nuclear por lisis con NP-40 y se analizaron con anticuerpo policlonal PK-M2 específico (Weernink *et al.*, 1988) respecto a PK-M2 endógena por transferencia Western. Para excluir la contaminación cruzada, se cargaron las muestras por triplicado y se sometieron a transferencia con anticuerpos PK-M2, Erk-2 o Histona H1. Como se muestra en la Figura 8, el tratamiento con TT-232, peróxido de hidrógeno y UV inducía la translocación de la PK-M2 endógena al núcleo con cinéticas similares.

Sin embargo, la enzima presente en el núcleo exhibía movilidad electroforética incrementada, lo cual es debido probablemente a escisión proteolítica o a desfosforilación. Para testar el papel de las proteasas, se pretrataron células Cos-7 con serina-proteasa (AEBSE, TPCK), caspasa (zDEVD) o inhibidor de calpaína (ALLN), pero no se logró invertir este efecto. Esto sugiere que ninguna de estas proteasas es responsable de la transformación aparente.

Adicionalmente, se investigó el papel de la isoforma M2 en el núcleo. Por esta razón, se subclonaron PK-M2 y PK-M1 en el vector pEYFP-Nuc que llevaba la señal de localización nuclear del antígeno T grande de SV-40 fusionada a GFP, y se transfectaron células Cos-7 con los diferentes constructos. Después de 5 horas, se tripsinizaron las células y se extendieron en placas de 96 pocillos y de 6 pocillos, y se dejaron crecer durante tiempos diferentes. Después de 10 horas, se añadió MTT a una de las placas, se midió y se consideró esto como el momento cero. Los ensayos de MTT demostraron una inhibición significativa del crecimiento celular en las células transfectadas con la NLS-PK-M2 direccionada al núcleo, mientras que las propiedades de crecimiento de las células Cos-7 que llevaban GFP, GFP-NLS, PK-M1, NLS-PK-M1 o PK-M2 no se veían afectadas (Fig. 9A y C). Para confirmar la expresión del constructo GFP, se llevaron a cabo transferencias Western con un anticuerpo GFP a partir de los lisados de células totales de las placas de 6 pocillos y se re-exploraron con anticuerpo de tubulina (Fig. 9B y D).

Este resultado sugería que la translocación nuclear de PK-M2 inhibe el crecimiento celular y/o induce apoptosis. Se analizaron células Cos-7 transfectadas teñidas con tinte Hoechst por microscopía fluorescente. Los núcleos altamente fluorescentes, condensados o fragmentados que exhibían manchas de cromatina compacta se consideraron como apoptóticos. La Figura 10 muestra que las células que expresaban la proteína de fusión GFP-PKM2, GFP-PKM1 o GFP-NLS-PKM1 exhibían tinción nuclear normal (Fig. 4C, E, F, C', E' y F') similar a las células que llevaban GFP o GFP-NLS (Fig. 10A-B'). Al mismo tiempo, se encontró en el núcleo GFP-PK-M2-NLS y las células que expresaban la proteína exhibían morfología apoptótica (Fig. 10D y D').

Este resultado respalda que la translocación de la piruvato-quinasa después de estímulos apoptóticos es importante para la entrega a la muerte celular. Esto está en asociación con resultados previos que demuestran que la translocación nuclear de GAPDH está implicada en la apoptosis. Con objeto de testar el efecto de la sobreexpresión de PK-M2-NLS sobre la fragmentación del DNA, se transfectaron células Cos-7 con constructos diferentes, después de 48 horas de incubación, y el DNA se extrajo y se analizó por electroforesis en gel de agarosa. La expresión de PK-M2 direccionada al núcleo inducía la degradación de DNA en fragmentos mayores diferenciados (3500, 7000 pb), lo que era diferente del escalonamiento clásico del DNA (Fig. 11).

Dado que la degradación del DNA durante la apoptosis es un proceso multietápico que da como resultado primeramente productos de escisión del DNA grandes y finalmente fragmentos oligonucleosómicos, los autores de la invención proponen que la piruvato-quinasa está implicada en un paso inicial de degradación del DNA, y son necesarios otros factores, como la activación de caspasas, para la transformación ulterior. Dado que la PK-M2 sobreexpresada direccionada al núcleo era suficiente para la muerte celular con independencia de la proteína endógena, este efecto no es debido probablemente a la inhibición de la glicólisis y el empobrecimiento en ATP de las células. Esta hipótesis se ve respaldada por el hecho de que, aunque la GAPDH está relacionada con condiciones degenerativas en la enfermedad de Huntington, la actividad glicolítica de la enzima no parece alterarse (Kagedal *et al.*, 2001). Para testar el requerimiento de la actividad de piruvato-quinasa en el núcleo, los autores de la invención generaron PK-M2 deficiente en quinasa (PKM2K/M) y se transfectó transitoriamente a células Cos-7. En primer lugar, se testó la expresión y la transformación de las diferentes proteínas de fusión en transferencias Western (Fig. 12).

A continuación, se midió la actividad catalítica de piruvato-quinasa de los lisados de células totales (Fig. 13). La sobreexpresión de la PK-M2 de tipo salvaje aumentaba significativamente la actividad global de PK ($p > 0,005$), mientras que la actividad de PK en las células que expresaban el mutante deficiente en quinasa era reducida comparada con las células falsamente transfectadas ($p > 0,0001$). Esto sugiere que la mutación PKM2 K269M, que afecta al sitio de fijación de ATP, conduce a la desactivación catalítica de la proteína PKM. Esto se ve respaldado por el hecho de que la sobreexpresión del mutante PKM2K/M interfería también con la actividad endógena de PK y daba como resultado una actividad global reducida de PK.

Para investigar el requerimiento de la actividad de piruvato-quinasa en el núcleo se analizaron células Cos-7 transfectadas transitoriamente respecto a apoptosis por tinción con Hoechst (Fig. 14).

Considerado en su conjunto, se encontró que la piruvato-quinasa es el receptor de un potente agente antitumoral con efecto apoptótico fuerte. Resultados ulteriores demostraron que la piruvato-quinasa juega un papel importante en el proceso apoptótico, y ulteriormente la enzima sufre translocación al núcleo. La translocación nuclear de PK parece ser un fenómeno general, dado que en la apoptosis inducida por estrés oxidante (peróxido de hidrógeno) o por UV se encontró piruvato-quinasa en el núcleo. La isoforma de piruvato-quinasa nuclear difiere de la piruvato-quinasa citosólica en el sentido de que exhibe una mayor movilidad electroforética.

Se llega a la conclusión de que, al igual que GAPDH, la piruvato-quinasa está implicada en el proceso apoptótico y podría ser una molécula diana para el desarrollo de fármacos contra el cáncer y enfermedades inflamatorias.

Referencias

- Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. and Morimura, H.** (1967) *J. Biochem.* (Tokyo) 62, 71-91.
- 5 **Nowak, T. and Suelter, C.** (1981) *Mol. Cell. Biochem.* 35, 65-75.
- Ibsen, K. and Trippet, P.** (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 570-580.
- 10 **Mallati, A., Yucel, M., Altinors, N. and Gunduz, U.** (1992) *Cancer Biochem. Biophys.* 13, 33-41.
- Guminska, M., Stachurska, M.B. and Ignacak, J.** (1988) *Biochem. Biophys. Acta* 966, 207-213.
- Saheki, S., Saheki, K. and Tanaka, T.** (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 704, 484-493.
- 15 **Kéri, Gy., et al.** (1993a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191, 681-687,
- Kéri, Gy., et al.** (1993b) *Peptide Research* 6, 281-288.
- Kéri, Gy., et al.** (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12513-12518.
- 20 **Baselga** (2000), *Semin. Oncol.* 27, 27-32.
- Monia** (2000), *Cancer Invest.* 18, 635-650.
- 25 **Vertessy, B.G., Bankfalvi, D., Kovacs, J., Low, P., Lehotzky, A. and Ovadi, J.** (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 254, 430-435.
- Weernink, P.A.O., Rijkssen, G. and Staal, G.E.J.** (1988) *FEBS Letters* 236, 391-395.
- 30 **Kagedal, K., Johansson, U. and Ollinger, K.** *FASEB J.* 2001 15, 1592-4.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de identificación de nuevos moduladores de apoptosis que comprende cribado respecto a sustancias capaces de modular la actividad de piruvato-quinasa M2, en el cual la actividad comprende una translocación al núcleo.

2. El método de la reivindicación 1 para identificación de nuevos estimuladores de apoptosis para uso como agente farmacéutico o como estructura conductora adecuada para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa.

10 3. El método de la reivindicación 2, en el cual la enfermedad hiperproliferativa se selecciona de tumores, y/o una respuesta inflamatoria.

15 4. Isoforma nuclear M2 de piruvato-quinasa, que exhibe mayor movilidad electroforética comparada con la isoforma citosólica de piruvato-quinasa.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

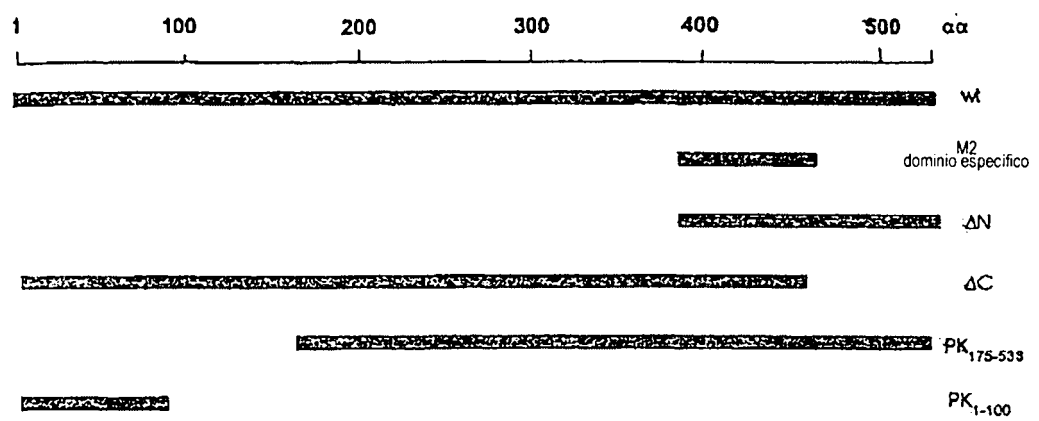


FIGURA 2

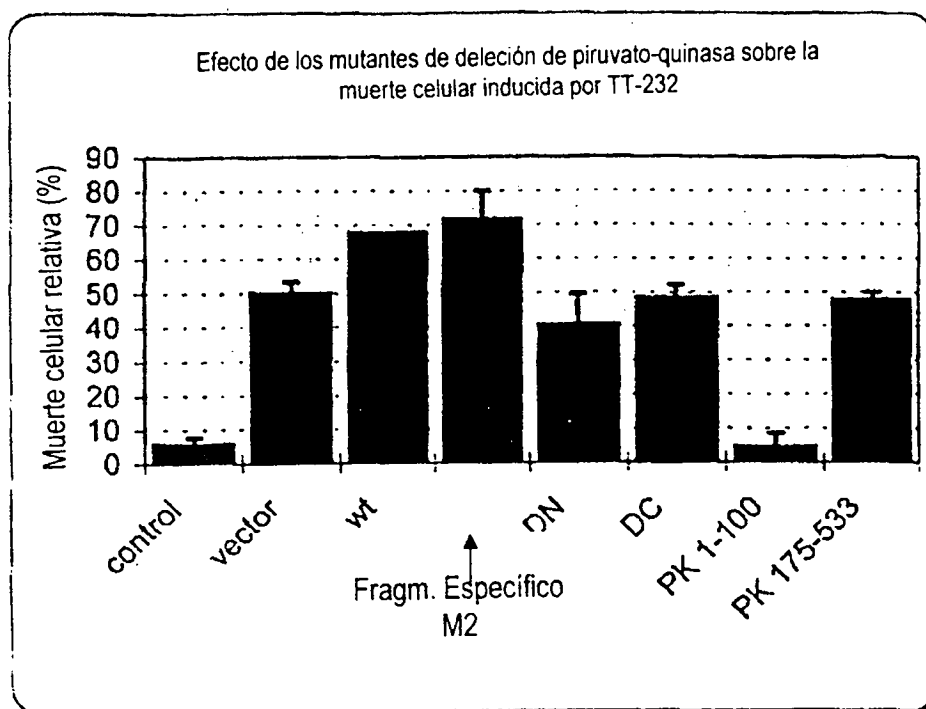


FIGURA 3

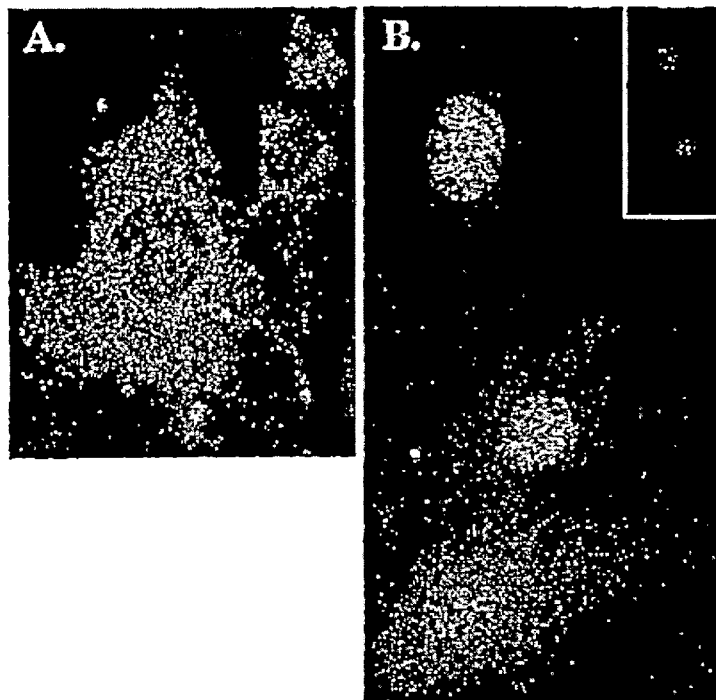


FIGURA 4

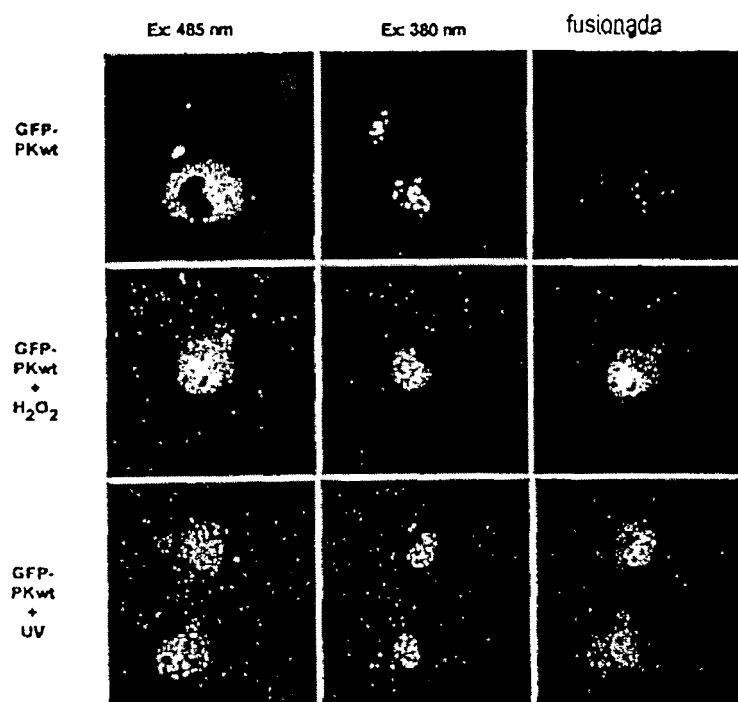


FIGURA 5

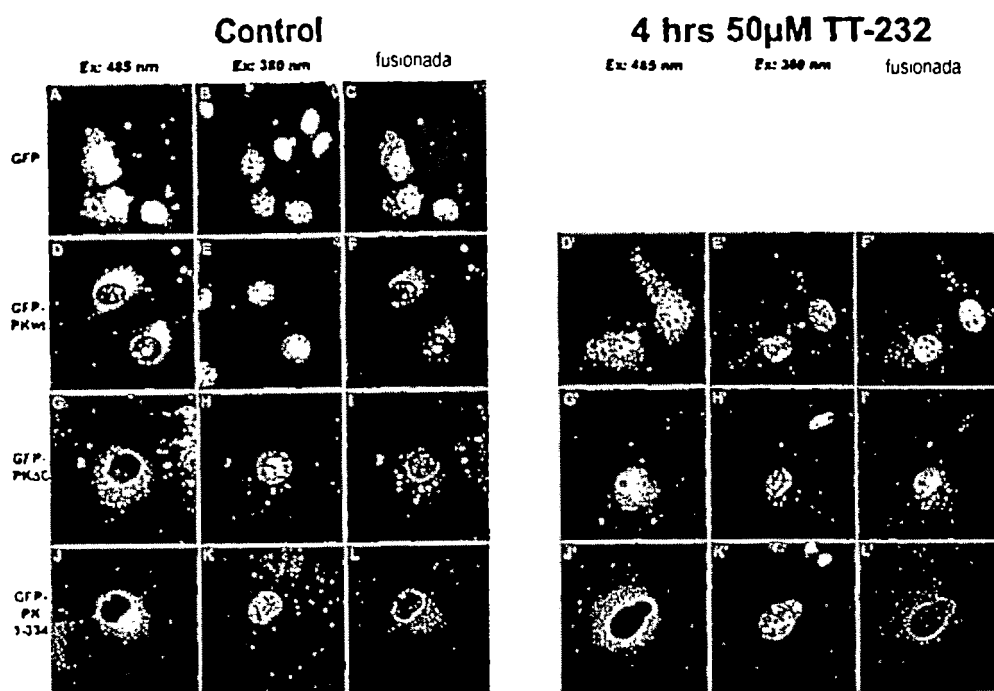


FIGURA 6

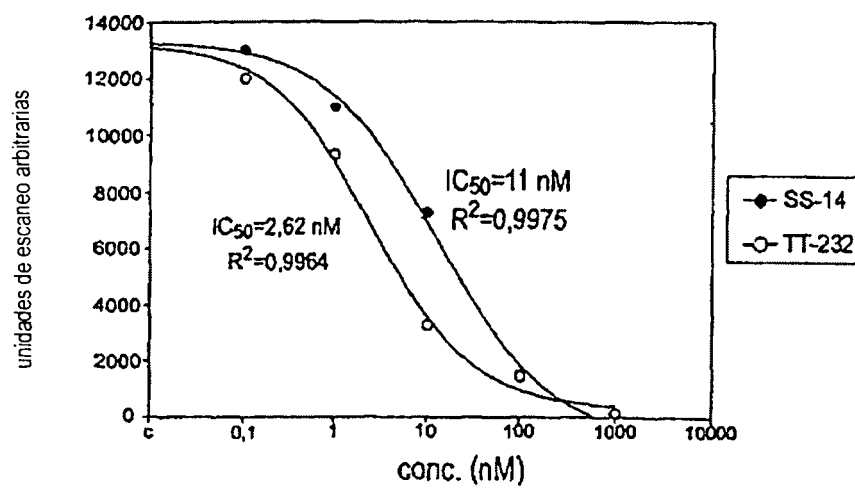


FIGURA 7

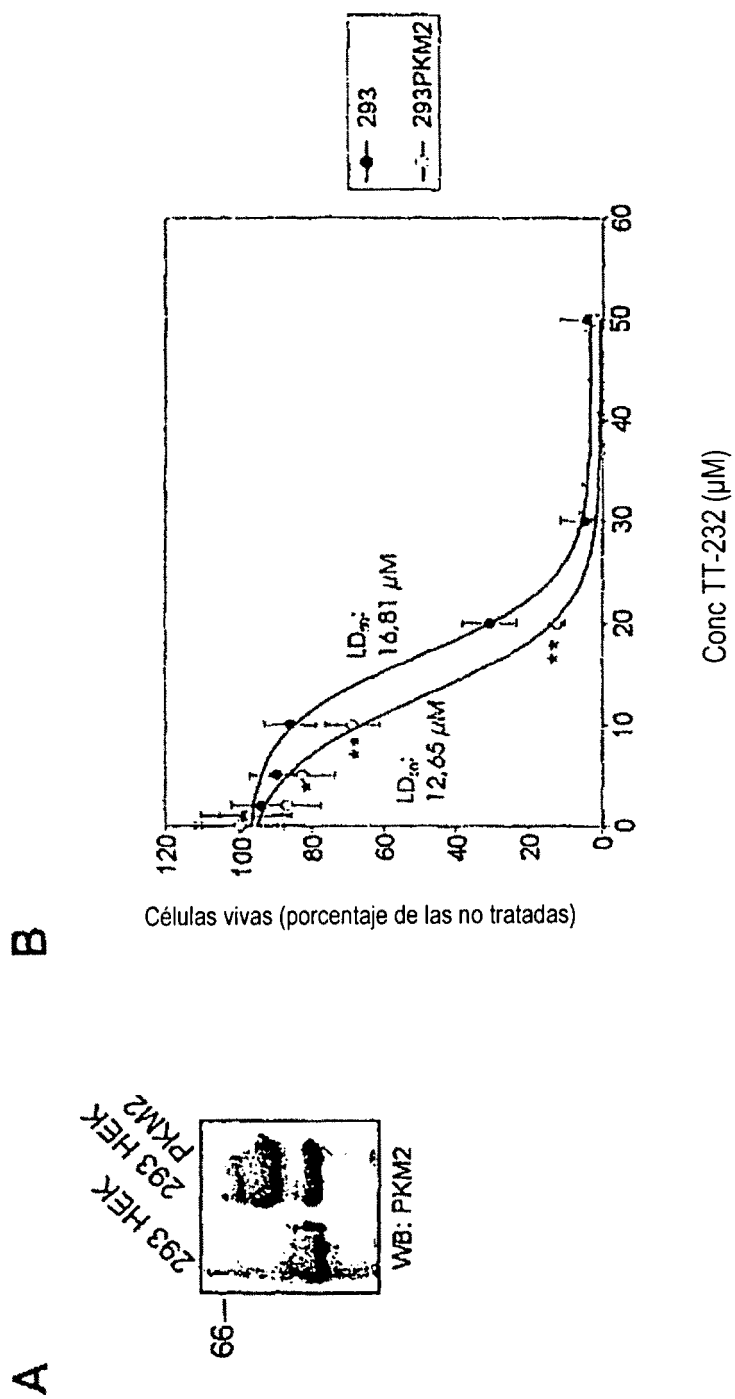


FIGURA 8

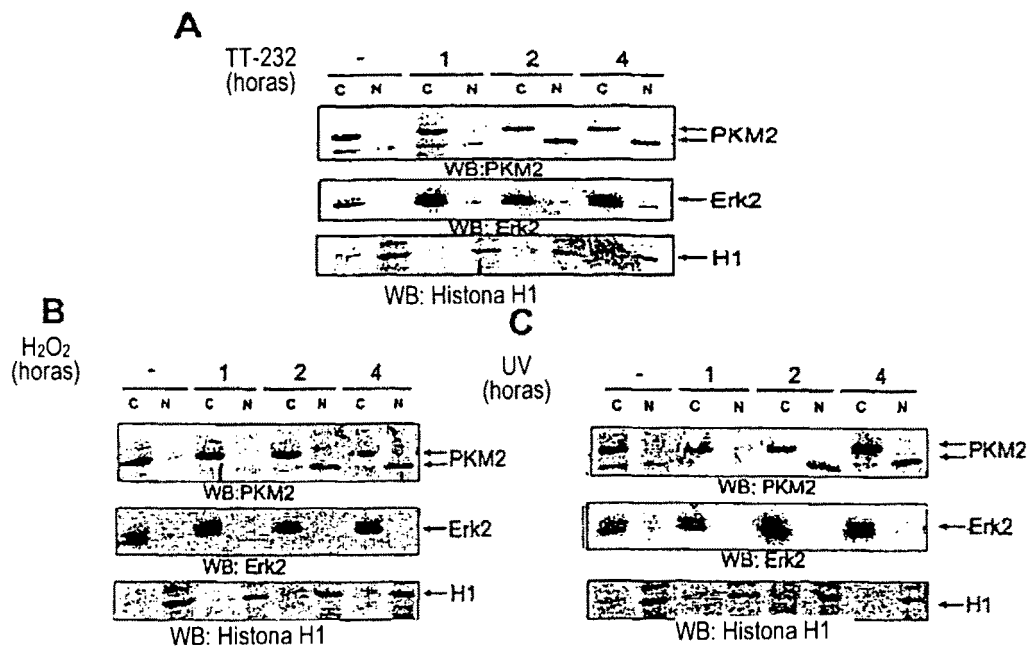


FIGURA 9

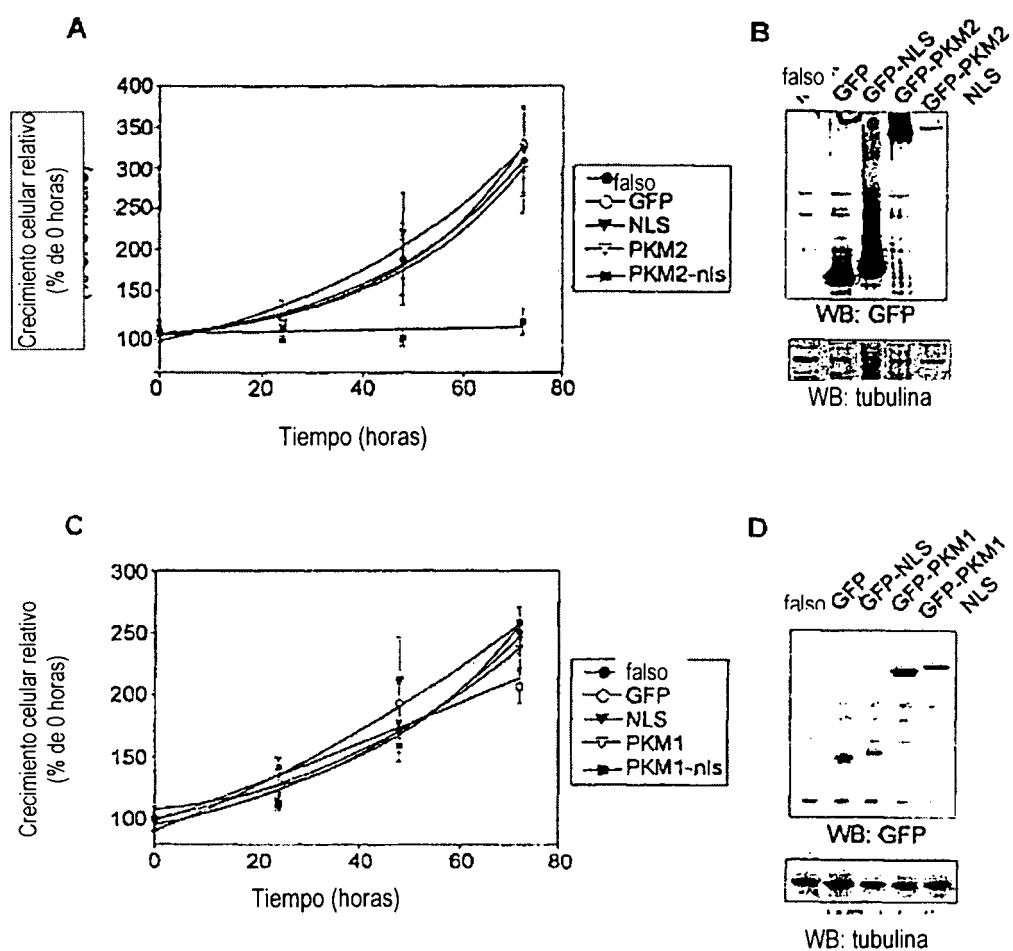


FIGURA 10

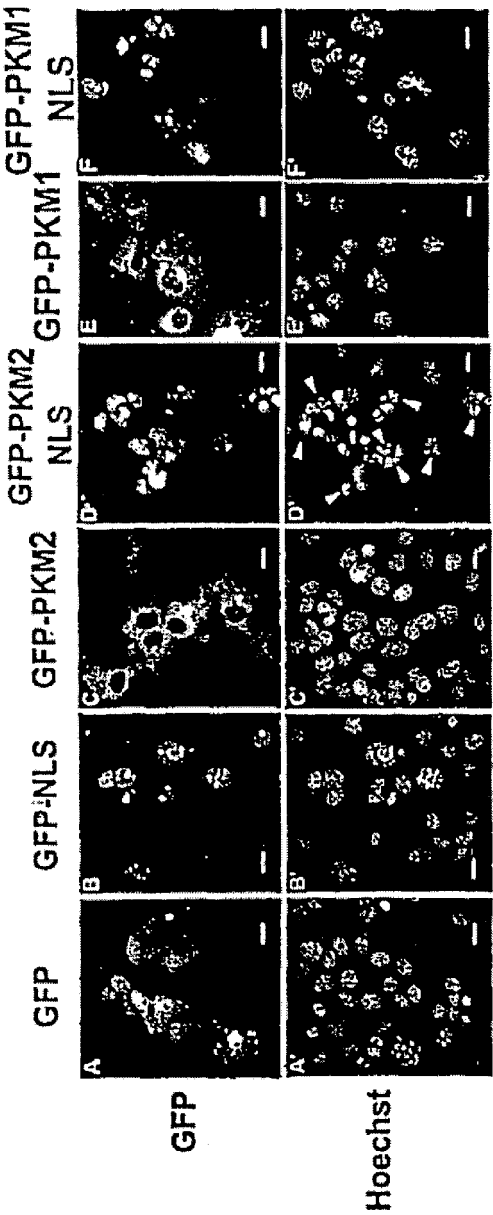


FIGURA 11

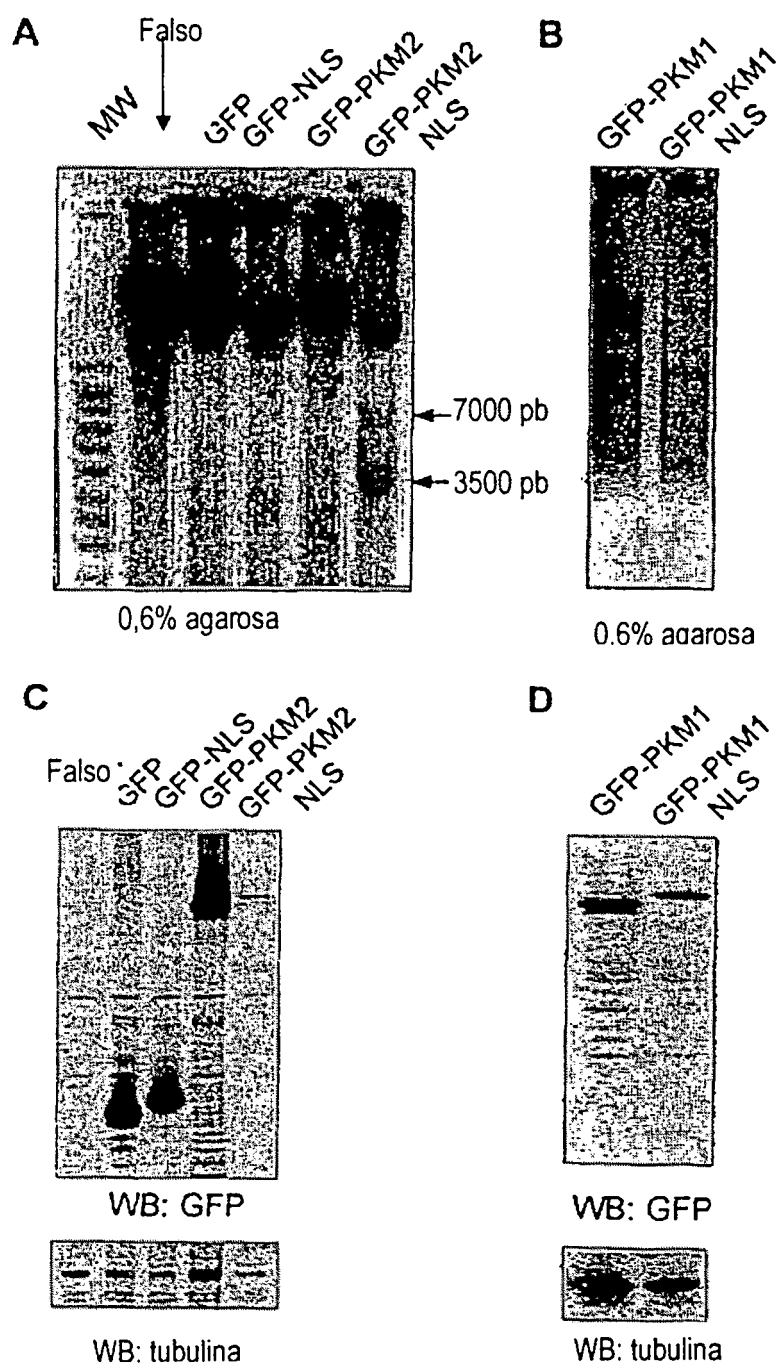


FIGURA 12

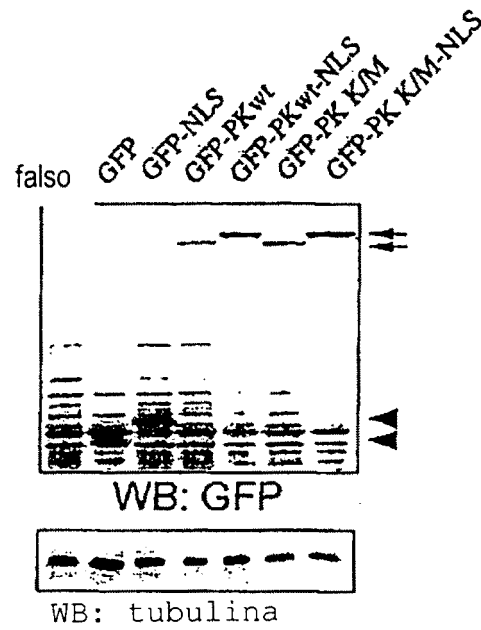


FIGURA 13

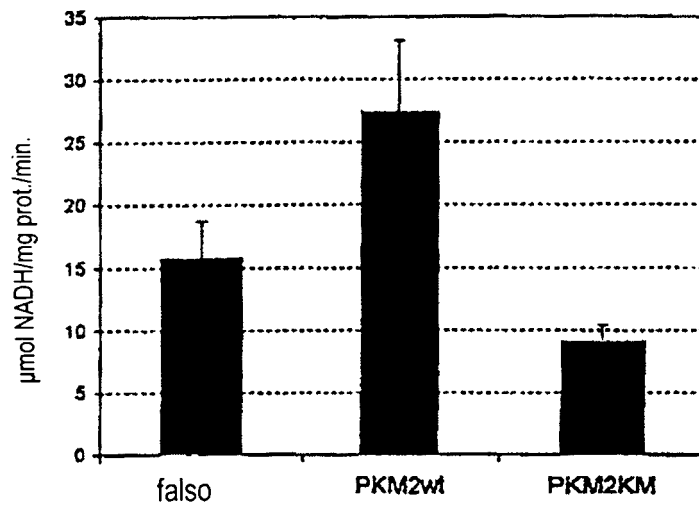


FIGURA 14

