



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 362 915**

② Número de solicitud: 201030004

⑤ Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **05.01.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.07.2011

⑥ Número de la solicitud inicial: **P 200800295**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC Serrano, 117 28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Revilla Novella, Yolanda y González Granja, Aitor**

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Composiciones y métodos para modular la actividad de p300.**

⑦ Resumen:

Composiciones y métodos para modular la actividad de p300.

La invención se relaciona con variantes del dominio N-terminal de activación de transcripción de p300 que presentan mutaciones en los sitios de fosforilación dando lugar a mutantes no fosforilables y que carecen de actividad transcripcional o de mutantes que mimetizan restos residuos fosforilados dando lugar a variantes constitutivamente activas de p300. Las variantes de p300 se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciones, etc.

ES 2 362 915 A1

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para modular la actividad de p300.

5 Campo técnico de la invención

La invención se relaciona con composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas con una activación o una inhibición indeseadas de factores de transcripción que requieren de p300 como co-activador. En particular, las composiciones de la invención son útiles para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciones, etc.

Antecedentes de la invención

Las proteínas p300 y CBP son importantes reguladores de la transcripción inducible en células eucariotas. Estas proteínas fueron identificadas originalmente como proteínas que interactuaban con el factor de transcripción CREM y con la proteína adenoviral E1A. Los co-activadores actúan de dos formas distintas. Por un lado, actúan como un puente molecular conectando los factores de transcripción con la maquinaria transcripcional, incluyendo TBP, TFIIB, TFIID y la ARN polimerasa II. Por otro lado, CBP y p300 son capaces de acervilar histonas en la cromatina del promotor diana gracias a la actividad histona acetiltransferasa (HAT) presente en su región C-terminal, lo que provoca un cambio conformacional en la cromatina adquiriendo una estructura abiertas. CBP/p300 interactúan con y aumentan la transactivación de una variedad de factores de transcripción, incluyendo p53, factores de la familia E2F, CREB, NF-AT, NF- κ B y AP-1, coordinando la transcripción de los genes dianas. Por tanto, CBP y p300 están implicados en la regulación de múltiples procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, supresión tumoral, transformación maligna y varias alteraciones inmunológicas.

Por tanto, resulta de interés el disponer de agentes que permiten modular la actividad de p300, tanto mediante su estimulación como mediante su inhibición. Inhibidores de la actividad transcripcional de p300 basados en la inhibición de la actividad acetil transferasa han sido descritos en el estado de la técnica. Así, WO03027279 describe una proteína que se une a la región rica en cisteína/histidina de p300 inhibiendo su actividad histona acetiltransferasa, Zheng *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 2005 Dec 14; 127(49): 17182-3) han descrito un inhibidor de la actividad histona acetiltransferasa de p300 formado por un análogo de coenzima A acoplado mediante un puente disulfuro a un resto de oligoarginina que promueve el transporte a través de membranas; Balasubramanyam, K. *et al.* (J. Biol. Chem. 279:51163-71) han descrito la capacidad de la curcumina de inhibir la actividad histona acetiltransferasa de p300; Stimson *et al.* (Mol. Cancer Ther., 2005, 10:1521-32) han descrito compuestos isotiazolónicos que inhiben la actividad histona acetiltransferasa de p300 y la solicitud de patente japonesa JP2000139464 describe oligonucleótidos antisentido dirigidos contra p300 y CBP y su uso para el tratamiento de la leucemia.

CBP/p300 contienen dos dominios que presentan actividad transcripcional, uno de ellos localizado en el extremo N-terminal y el otro en el extremo C-terminal, que pueden actuar independientemente e interactúan simultáneamente con la maquinaria transaccional y/o con diferentes factores de transcripción para generar la actividad transcripcional mediada por co-activadores. La transactivación mediante por CBP y p300 se regula a través de múltiples vías de señalización que resultan en distintos tipos de modificaciones post-traduccionales de los dominios de transactivación, incluyendo sumoilación, fosforilación, metilación y auto-acetilación. Entre ellas, la fosforilación parece ser una de las modificaciones de mayor importancia dado que la actividad HAT de CBP y p300 se ve aumentada por la quinasas MAP p42 y o44, CaMK IV, PKA, Akt y IKK-alpha. Por otro lado, la actividad transcripcional de CBP/p300 está controlada negativamente por el complejo ciclina *e*/cdk-2 o por la fosforilación por la proteína quinasa delta (PKC- δ).

Por tanto, es posible regular la actividad de p300 mediante la modificación del estado de fosforilación. Sin embargo, a pesar de que se conoce la relación entre fosforilación y actividad, los sitios exactos de fosforilación y las quinasas responsables son desconocidos. Yuan *et al.* (Biochim Biophys Acta. 2002, 1592:205-11) han descrito la capacidad de la proteína quinasa delta de fosforilar la serina en posición 89 de p300 provocando la inhibición de la actividad histona acetiltransferasa.

Por tanto, existe una necesidad en la de técnica de agentes capaces de modificar los patrones fisiológicos de fosforilación de la proteína p300/CBP y que permitan regular a voluntad la actividad de p300.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (amino ácidos 192 a 703 de la proteína p300 humana) o una variante de la misma que muestra al menos un 80% de identidad de secuencia y que carece de actividad trans-activadora de la transcripción.

En otro aspecto la invención se relaciona con un polipéptido que comprende una variante de la secuencia SEQ ID NO: 1 (amino ácidos 192 a 703 de la proteína p300 humana) cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada.

En aspectos adicionales, la invención se relaciona con construcciones génicas que comprenden los polinucleótidos de la invención, con vectores que comprenden los polinucleótido de la invención o las construcciones génicas de la

invención, con células que comprende los polipéptidos de la invención, los polinucleótidos de la invención, los vectores de la invención o las construcciones génicas de la invención y con animales transgénicos no humano que comprende, integrado en su genoma, los polinucleótidos de la invención.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido de la invención, con un polinucleótido de la invención, con una construcción génica de la invención, con un vector de la invención para su uso en medicina.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma que muestra al menos un 80% de identidad de secuencia y que carece de actividad trans-activadora de la transcripción para el tratamiento de enfermedades causados por una activación indeseada de las proteínas p300, NF- κ B, NFAT y/o c-jun.

En otro aspecto la invención se relaciona con un polipéptido que comprende una variante de la secuencia SEQ ID NO: 1 cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada para el tratamiento de enfermedades causados por una inhibición indeseada de las proteínas p300, NF- κ B, NFAT y/o c-jun

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La proteína viral A238L inhibe la interacción entre el extremo N-terminal TAD de p300 y PKC. Células Jurkat-pcDNA y Jurkat-A238L se transfectaron con diferentes mutantes GAL4-p300. A, GAL4-p300 FL; B, GAL4-p300 1-1301; C, GAL4-p300 192-703; y D, GAL4-p300 1239-2414, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se incubaron en ausencia o presencia de PMA/Ion durante 4 h, y los extractos nucleares se inmunoprecipitaron con 4 μ g de anticuerpo policlonal de conejo contra PKC, o con IgG como control negativo. Los inmunoprecipitados se analizaron por Western Blot con el mismo anticuerpo (α PKC) para determinar los niveles de proteínas en el precipitado, y con anti-GAL4 (α GAL4) para detectar los niveles de PKC asociada con la correspondiente forma mutante de p300. El análisis densitométrico muestra la relación entre PKC coimmunoprecipitada y p300 presente en el precipitado, de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.). E, La inmunoprecipitación de PKC se analizó por Western blot con un anticuerpo anti-SV5 para detectar los niveles de A238L-SV5 asociada a PKC. El análisis densitométrico muestra la relación entre A238L coimmunoprecipitada y PKC presente en el precipitado, de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.). F, En paralelo, la PKC inmunoprecipitada se usó en un ensayo kinasa *in vitro*, utilizando como sustrato MBP purificado. Las proteínas se separaron mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y se reveló mediante autoradiografía. El análisis densitométrico muestra la relación entre MBP [32 P] fosforilado y PKC inmunoprecipitada, de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.).

Figura 2. La fosforilación de la Serina 384 por PKC- θ , representa un paso esencial en la activación transcripcional de p300. A, Células Jurkat wild-type se cotransfectaron de forma transitoria con el plásmido reportero GAL4-luc, y con las siguientes construcciones de GAL4-p300: GAL4-p300 (FL) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), y GAL4-p300 (192-703) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), como se ha descrito en Materiales y Métodos. Veinticuatro horas después de la transfección las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de PMA/Ion, los extractos celulares se procesaron y se midió la actividad luciferasa. Los extractos se normalizaron a la actividad luciferasa Renilla. Se muestran los valores de RLU/ μ g de proteína de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.) B, Células Jurkat wild-type se transfectaron transitoriamente con los plásmidos de expresión GAL4-p300 (192-703) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las proteínas GAL4-p300 fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico para GAL4. C, PKC- θ se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares de Jurkat wild-type. Los inmunoprecipitados GAL4-p300 (192-703) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A) se usaron como sustrato para PKC- θ en ensayos kinasa *in vitro*. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% y se revelaron por autoradiografía. El análisis densitométrico muestra la relación entre p300- 32 P] y PKC- θ inmunoprecipitada, de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.). D, Efecto de la sobreexpresión de PKC- θ en la activación transcripcional de p300. Células Jurkat-pcDNA (barras blancas) o Jurkat-A238L (barras grises) se transfectaron transitoriamente con el plásmido vacío pEFneo y los plásmidos de expresión pEF-PKC- θ wild type (wt) o el mutante constitutivamente activo PKC- θ (pEF-PKC- θ A/E) (1 μ g/10⁶ cells), y con las construcciones GAL4-p300 full length (FL) o amino terminal (192-703), junto con el plásmido reportero GAL4-luc (250 ng/106 cells) como se describe en Materiales y Métodos. Después de la transfección las células se incubaron en ausencia (-) o presencia (+) de PMA/Ion, y se midió la actividad luciferasa. Los extractos se normalizaron a la actividad luciferasa Renilla. Se muestran los valores de RLU/ μ g de proteína de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.) E, Células Jurkat-pcDNA y Jurkat-A238L se transfectaron de forma transitoria con GAL4-p300 (192-703) wild type (WT), como se describe en Materiales y Métodos. Veinticuatro horas después de la transfección las células se incubaron en ausencia (-) o presencia (+) de PMA/Ion durante 2 h, los extractos celulares se inmunoprecipitaron con 4 μ g de anticuerpo policlonal de conejo contra PKC- θ , o con IgG como control negativo. Los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot con el mismo anticuerpo (α PKC- θ) para determinar los niveles de kinasa en el precipitado, y con anti GAL4 (α GAL4) para detectar los niveles de PKC asociada con GAL4-p300 (192-703). El análisis densitométrico muestra la relación entre PKC coimmunoprecipitada y p300 presente en el precipitado, de tres experimentos independientes (mean \pm S.D.).

Figura 3. Células Jurkat wild-type se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos de expresión GAL4-p300 full length (FL) y amino terminal (192-703), wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), como se describe en Materiales y Métodos. Los extractos nucleares de 10⁷ células Jurkat transfectadas y tratadas (+) o no (-) con PMA/Ion durante 4 h fueron inmunoprecipitados con 4 μ g de anticuerpo policlonal de conejo contra GAL4, o con

ES 2 362 915 A1

IgG como control negativo. Los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot con el mismo anticuerpo GAL4 para determinar los niveles de estas proteínas en el precipitado, y con un anticuerpo anti lisinas acetiladas (α Ac.Lys) para detectar p300 acetiladas, como se describe en Materiales y Métodos. El análisis densitométrico muestra las veces de inducción de las proteínas GAL4-p300 estimuladas respecto las condiciones basales, de tres experimentos independientes (mean \pm S.D).

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que, sorprendentemente, la serina 384 del dominio CH1 de la proteína p300 es esencial para la actividad transcripcional de p300 y que dicha serina es objeto de fosforilación por la isoforma theta de PKC. Adicionalmente, los autores de la invención han demostrado que la región de p300 en la que se encuentra la serina 384 interacciona con la proteína A238L del virus de la peste porcina africana (VPPA) y que dicha interacción bloquea la capacidad de p300 de interactuar con PKC θ , siendo este bloqueo el responsable de la capacidad de la proteína A238L de inhibir la actividad transcripcional de p300. Estos hallazgos abren la puerta al diseño de variantes de p300 que carecen de actividad activadora de la transcripción así como de variantes de p300 que se encuentran constitutivamente activadas.

Por “p300” se entiende, en el contexto de la presente invención, la proteína humana p300 cuyo número de acceso en UniProt viene dado por EP300 HUMAN o Q09472 cuya secuencia viene dada por la secuencia indicada en SEQ ID NO: 2.

Por “variante de p300” se entiende, en el contexto de la presente invención, una proteína que comprende la secuencia mínima de p300 capaz de promover la transcripción de un gen cuando se encuentra en la proximidad de su región promotora.

Variantes inactivas de p300 de la invención

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (amino ácidos 192 a 703 de la proteína p300 humana) o una variante de la misma que muestra al menos un 80% de identidad de secuencia y que carece de actividad trans-activadora de la transcripción.

Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, se piensa que la actividad bloqueadora de la activación transcripcional mediada por las variantes de la invención radica en la capacidad de estas variantes de secuestrar las dianas downstream de ésta proteína, es decir, la proteína quinasa theta impidiendo que ésta active moléculas de p300 endógenas o los factores de transcripción con los que habitualmente interacciona p300 (NF- κ B, c-jun, NF-AT) impidiendo la unión de éstos a la proteína p300 endógena nativa.

Un ensayo adecuado para determinar la actividad trans-activadora de la transcripción de un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 se ha descrito en los ejemplos y consiste en poner en contacto una proteína de fusión formada por el dominio de unión a ADN de la proteína GAL4 y la variante cuya actividad activadora de la transcripción se desea ensayar con una célula que comprende un gen reportero bajo el control de un sitio de unión para el dominio de unión de ADN de la proteína GAL4. De esta forma, la proteína de fusión sólo provocará expresión del gen reportero si la variante que se encuentra unida al sitio de unión de ADN de GAL4 es capaz de activar la transcripción (véase ejemplo 2).

En una forma de realización, la inactivación de p300 puede llevarse a cabo mediante modificación del amino ácido en posición 193 en la proteína de SEQ ID NO: 1 (correspondiente al amino ácido en posición 384 en la proteína p300 de cadena completa) por un amino ácido que no es fosforilable ni un análogo estructural de fosfoamino ácido. Preferiblemente, el amino ácido en posición 193 en la secuencia de SEQ ID NO: 1 es Ala.

Variantes constitutivamente activadas de p300 de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 que se encuentran constitutivamente activadas. Por variantes “constitutivamente activadas” se entiende, en el contexto de la presente invención, todas aquellas variantes de p300 que son capaces de promover la transcripción de genes cuando la variante se localiza en proximidad en la región reguladora de la expresión de dicho gen sin requerir para ello la fosforilación de la serina en posición 384.

Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, se piensa que la actividad activadora de la transcripcional mediada por las variantes de la invención radica en la capacidad de estas variantes de mimetizar p300 fosforilada en posición 384, eliminando por tanto la necesidad de fosforilar con PKCtheta y activando de forma directa y constitutiva la transcripción mediada por los factores de transcripción con los que habitualmente interacciona p300 (NF- κ B, c-jun, NF-AT).

Un ensayo adecuado para determinar la actividad transcripcional de la variante de la invención se ha descrito anteriormente para las variantes inactivas y se basa en la capacidad de dicha variante de activar la transcripción de un gen reportero cuando dicha variante se encuentra asociada a la región reguladora de la expresión de dicho gen mediante el uso del dominio de unión de ADN de un factor de transcripción cualquiera (por ejemplo GAL4) (véase ejemplo 2).

ES 2 362 915 A1

En una forma preferida de realización, la variante comprende la secuencia identificada en SEQ ID NO: 1 en la que la serina en posición 193 ha sido reemplazada por un amino ácido que es estructuralmente similar a fosfoserina. En otro aspecto, la variante constitutivamente activa de p300 contiene un resto de aspártico en posición 193.

5 *Polinucleótidos, construcciones génicas, vectores y células de la invención*

En otro aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que codifica un polipéptido inactivo de acuerdo a la invención o un polipéptido constitutivamente activo de acuerdo a la invención.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que comprende el polinucleótido la invención. Preferiblemente, las construcciones génicas contienen el polinucleótido de la invención junto con regiones adecuadas para regular la expresión de dicho polinucleótido incluyendo promotores, terminadores de la transcripción, regiones no traducidas 5' y 3', señales de poliadenilación y similares.

15 En principio, cualquier promotor puede ser utilizado a los vectores de clonaje en el contexto de la presente invención siempre que dicho promotores sean compatibles con las células en las que se desea expresar el polinucleótido. Así, promotores adecuados para la realización de la presente invención incluyen, sin estar necesariamente limitados, promotores constitutivos tales como los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del polio, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el
20 promotor del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alpha así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFκB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico, los promotores regulables de la ARN polimerasa II descritos en WO/2006/135436 así como promotores específicos de
25 tejido tales como:

- promotores específicos de tejido gástrico tales como el promotor de la subunidad beta de la ATPasa H/K, el promotor K19, el promotor de metalotioneína, el promotor TFF1, el promotor TFF2 y el promotor FOXa/HNF2
30 gamma,
- promotores específicos de páncreas tales como el promotor de la elastasa, el promotor Pdx-1, el promotor de la insulina o el promotor de la fosfoglicerato quinasa,
- promotores específicos de pulmón tales como el promotor de la proteína secretora de células Clara o el promotor
35 del surfactante C,
- promotores específicos de tejido mamario tal como el promotor del virus del tumor mamario de ratón o el promotor de la proteína ácida del suero,
- promotores específicos de piel como el promotor de queratina o el promotor K14,
- promotores específicos de esófago como el promotor de la proteína L2 de EBV,
- promotores específicos de hígado como el promotor de la proteína urinaria mayoritaria o el promotor de albú-
45 mina,
- promotores específicos de colon como el promotor de la villina o el promotor de FABP-TS4,
- promotores específicos de próstata como el promotor de la criptidina 2, el promotor del antígeno específico
50 de próstata (PSA), el promotor de C(3)1 de la proteína secretora de próstata de 94 amino ácidos (PSP94) o el promotor de la probasina,
- promotores específicos de riñón tales como el promotor de la uromodulina, el promotor de la proteína Tamm-
55 Horsfall o el promotor de la gamma-glutamyl transpeptidasa de tipo 1,
- promotores específicos de vejiga tales como el promotor de la uroplaquina o el promotor de la urohingina,
- promotores específicos de útero como el promotor de la uteroglobina.

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con vectores que comprenden el polinucleótido de la invención o las construcciones génicas de la invención. Así, es posible el uso de vectores derivados de vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, fagos y vectores "shuttle" tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo
65 de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus

asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDT1.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con células que comprenden en su interior al menos un polinucleótido de la invención, una construcción génica de la invención o un vector de acuerdo con la invención. Los huéspedes pueden contener una o más copias de los vectores mencionados anteriormente son un objeto adicional de la presente invención. Preferiblemente, los huéspedes son células huésped. Las células huésped incluyen, pero no están limitadas a, células procedentes de mamífero, planta, insecto, hongos o bacteria. Las células bacterianas incluyen, pero no están limitadas a, células de bacterias Gram positivas tal como varias especies de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* 10 o células de bacterias Gram negativas tal como varias especies de los géneros *Escherichia* y *Pseudomonas*. En el grupo de las células de hongos se utilizan preferiblemente células de levadura. Se puede alcanzar la expresión en levadura utilizando cepas de levadura tal como entre otras *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*. Además, se pueden utilizar células de insecto tal como células de *Drosophila* y Sf9 como células huésped. Además de eso, las células huésped pueden ser células vegetales tal como entre otras células de plantas de cultivo tal como plantas de silvicultura, o células de plantas que proporcionan alimento y materias primas tal como plantas de cereales, o plantas medicinales, o células de plantas ornamentales, o células de flores de bulbos de cultivo. Las plantas o las células vegetales transformadas (transgénicas) se producen mediante métodos conocidos, por ejemplo, transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, transformación de discos de hojas, transformación de protoplastos mediante transferencia de ADN mediada por polietilenglicol, electroporación, sonicación, microinyección o transferencia de genes balística. Adicionalmente, un sistema de expresión adecuado puede ser un sistema de baculovirus. Los sistemas de expresión que utilizan células de mamífero tal como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células BHK, células HeLa, células CHO, células Vero, células MDCK, células 293, células 3T3, células de melanoma de Bowes y similares son preferidas en la presente invención. Las células de mamífero proporcionan proteínas expresadas con las modificaciones postraduccionales que son más similares a las moléculas naturales procedentes de mamíferos. Puesto que la presente invención se ocupa de moléculas que puede que se tengan que administrar a seres humanos, un sistema de expresión completamente humano sería particularmente preferido. Por lo tanto, aún más preferiblemente, las células huésped son células humanas, tal como células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6™ (PER.C6 es una marca registrada que pertenece a Crucell Holland B.V.) y células derivadas de las mismas mediante modificación genética. 30

Usos médicos de las formas inactivas de p300

35 Las variantes inactivas de p300 de acuerdo a la invención pueden ser utilizadas para el tratamiento de todos aquellos trastornos causados por una activación indeseada de p300 o de todos aquellos factores de transcripción que actúan aguas debajo de p300, tales como NF- κ B, NF-AT y c-jun.

40 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una variante inactiva de p300, un polinucleótido que codifica dicha variante, una construcción génica que comprende dicho polinucleótido o un vector que comprende dicho polinucleótido o dicha construcción para uso en medicina.

45 En una forma preferida de realización, el polipéptido, polinucleótido, construcción génica o vector se utilizan en el tratamiento de trastornos causados por una activación indeseada de las proteínas p300, NF- κ B, NFAT y/o c-jun. Preferiblemente, los polipéptidos se usan para el tratamiento de trastornos en los que se produce una activación indeseada de NF- κ B. Preferiblemente, dicha enfermedad asociada a una activación indeseada de NF- κ B se selecciona del grupo de una enfermedad inflamatoria y una enfermedad autoinmune.

Trastornos causados por una activación indeseada de p300, NF- κ B, NF-AT y/o c-jun

50 Puesto que p300 actúa como mediador de la actividad pro-tumorigénica de distintos factores de transcripción y de algunas oncoproteínas virales, la activación indeseada de p300 puede resultar en el desarrollo de trastornos neoplásicos. Por tanto, las variantes inactivas de p300 de acuerdo a la invención pueden ser usadas para el tratamiento de trastornos neoplásicos debidos a una hiperactividad de ciertos oncogenes o asociados a infecciones por virus que expresan oncoproteínas. 55

60 En otro aspecto, los compuestos de la invención permiten el tratamiento de trastornos causados por una activación indeseada de NF- κ B. Estos trastornos incluyen, entre otros, enfermedades causadas por la producción excesiva de mediadores inflamatorios y por la propagación viral, en particular, enfermedades causadas por la hiperproliferación de queratinocitos y/o de células T, en particular enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes tales como enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, anemia hemolítica, anemia perniciosa, aftas, estomatitis aftosa, artritis, arterioesclerosis, osteoartritis, artritis reumatoide, aspermiogénesis, asma bronquial, asma autoinmune, hemolisis autoinmune, enfermedad de Bechet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma de Burkitt, enfermedad de Crohn, corioiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, crioglobulinemia, dermatitis herpetiformis, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedades demielinantes autoinmunes, contractura de Dupuytren, encefalomiéltis, encefalomiéltis alérgica, endoftalmia, enteiritis alérgica, síndrome enteropatía autoinmune, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Harnman-Rich, enfermedad de Hashimoto, pérdida repentina de audición, hepatitis crónica, enfermedad de Hodgkin, hemo-

5 globinuria paroximástica, hipogonadismo, ileitis regionales, iritis, leucopenia, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis transversa, mixedema idiomático primario, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, pénfigo vulgar, poliarteritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, poliradiculitis aguda, psoriasis, purpura, pioderma gangrenoso, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia, esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, infertilidad debida a anticuerpos anti-espertazoides, trombocitopenia, timoma, uveitis anterior aguda, vitiligo, enfermedades asociadas al SIDA, SCID y virus de Epstein Barr tales como el síndrome de Sjorgren, el linfoma de células B asociado a SIDA o a virus de Epstein-Barr, enfermedades parasitarias tales como leishmaniosis y estados inmuno suprimidos tales como infecciones virales tras transplantes, SIDA, cáncer, hepatitis activa crónica, el rechazo de trasplante a consecuencia del trasplante de un tejido u órgano y la enfermedad de injerto contra huésped que puede resultar del trasplante de médula ósea o de células troncales.

15 En otro aspecto, los compuestos de la invención permiten el tratamiento de trastornos causados por una activación indeseada de NF-AT. NF-AT es un factor de transcripción que aparece en distintas células del sistema inmune (células T, células B, células linfocítica natural o células NK y monocitos), por lo que los trastornos incluyen, aquellos en los que se produce una hiperactivación indeseada o actividad inapropiada del sistema inmune e incluyen, sin limitación, enfermedades tales como enfermedades inmunes agudas y crónicas y enfermedades autoinmunes. Ejemplos de este tipo de enfermedades han sido citados anteriormente con respecto a la activación indeseada de NF- κ B.

20 En otro aspecto, los compuestos de la invención permiten el tratamiento de trastornos causados por una activación indeseada de c-jun. El oncogén celular c-jun es una fosfoproteína nuclear de 39 kDa que forma parte del factor de transcripción heterodimérico AP-1 junto con la proto-oncoproteína c-fos. El complejo AP-1 es capaz de activar la transcripción de múltiples genes que se encuentran bajo el control de sitios de unión de AP-1 que conduce en muchos casos a la transformación celular y a la carcinogénesis. Por tanto, los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de trastornos o enfermedades neoplásicas se selecciona del grupo que consiste en leucemias (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, síndrome mielodisplásico, leucemia mielomonocítica juvenil, etc.), metástasis, neoplasias, tumores (por ejemplo, neuroma acústico, adenocarcinoma, cáncer adrenocortical, carcinoma anal, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma de células basales, carcinoma de conductos biliares, carcinoma de vesícula, cáncer de cerebro, cáncer de mama, carcinoma broncogénico, cáncer del peritoneo, cáncer cervical, condrosarcoma, cordoma, coriocarcinoma, carcinoma de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, cistadenocarcinoma, carcinoma embrionario, carcinoma endometrial, endoteliosarcoma, epindimoma, carcinoma epitelial, cáncer de esófago, tumor de Ewing, fibrosarcoma, 35 cáncer gastrointestinal, cáncer del aparato genitourinario, glioblastomas, glioma, cáncer de cabeza, hemangioblastoma, hepatoma, enfermedad de Hodgkin, cáncer de riñón, liomiosarcoma, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma de pulmón, linfangioendoteliosarcoma, linfangio sarcoma, linfomas, hipercalcemia maligna, insulanoma pancreático maligno, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, mesotelioma, cáncer de cuello, neuroblastoma, linfoma no de Hodgkin, carcinoma de no células pequeñas de pulmón, oligodendroglioma, sarcoma osteogénico, 40 cáncer de ovario, cáncer de páncreas, adenocarcinomas papilares, carcinoma papilar, carcinoma de pene, pinealoma, lesiones de la piel premalignas, tumores primarios del cerebro, macroglobulinemia primaria, trombocitosis primaria, cáncer de próstata, cáncer de recto, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de las glándulas salivares, sarcoma, carcinoma de las glándulas sebáceas, seminoma, carcinoma de células pequeñas de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, sinovioma, carcinoma de glándula sudorípara, tumor testicular, cáncer de tiroides, carcinoma de útero, cáncer de vulva, y tumor de Wilms), o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado.

Usos médicos de las formas constitutivamente activas de p300

50 Las variantes constitutivamente activas de p300 de acuerdo a la invención pueden ser utilizadas para el tratamiento de todos aquellos trastornos causados por una activación indeseada de p300 o de todos aquellos factores de transcripción que actúan aguas debajo de p300, tales como NF- κ B, NF-AT y c-jun.

55 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una variante constitutivamente activa de p300, un polinucleótido que codifica dicha variante, una construcción génica que comprende dicho polinucleótido o un vector que comprende dicho polinucleótido o dicha construcción para uso en medicina.

60 En una forma preferida de realización, el polipéptido, polinucleótido, construcción génica o vector se utilizan en el tratamiento de trastornos causados por una inhibición indeseada de las proteínas p300, NF- κ B, NF-AT y/o c-jun. Preferiblemente, los polipéptidos se usan para el tratamiento de trastornos en los que se produce una inhibición indeseada de NF- κ B, NF-AT o c-jun. Preferiblemente, los compuestos de la invención son útiles para el tratamiento de condiciones de inmunodeficiencia innatas o adquiridas, enfermedades causadas por una apoptosis prematura durante el desarrollo, para potenciar la respuesta inmune del organismo frente a tumores y metástasis y frente a agentes infecciosos.

65

ES 2 362 915 A1

Trastornos causados por una inhibición indeseada de NF- κ B

En otro aspecto, los compuestos de la invención permiten el tratamiento de trastornos causados por una inhibición indeseada de NF- κ B, por ejemplo, en los casos en los que existe un defecto en la ruta de señalización de NF- κ B tales como:

- Enfermedades en las que se produce apoptosis de forma prematura durante el desarrollo embrionario o cuando se produce apoptosis ectópica (por ejemplo, durante el desarrollo embrionario del ojo o del cerebro), como ocurre en pacientes con Incontinentia Pigmento.
- Defectos neurológicos tales como microcefalia, o a condiciones epilépticas producidas a consecuencia de malformaciones del cerebro.
- Enfermedades oftalmológicas tales como la retinopatía del prematuro o las vasculopatías proliferativas (cataratas, ojo pequeño o desprendimiento de retina).
- Enfermedades en las que el organismo tienen una capacidad parcial o totalmente alterada de responder a infecciones de distinto tipo, tales como la Incontinentia Pigmenti, en donde existe una proliferación extrema de eosinófilos que se infiltran en la piel y que aumentan su concentración en sangre.
- Enfermedades de los vasos sanguíneos en la retina, el cerebro o en la piel.
- Enfermedades dentales.
- Osteopetrosis ocasionada por una resorción defectuosa del hueso inmaduro.
- Enfermedades cutáneas tales como hipomelanosis.

En otro aspecto, los compuestos de la invención permiten el tratamiento de trastornos causados por una inhibición indeseada de NF-AT. Dichos trastornos se manifiestan por una hipoactividad del sistema inmune tales como las que aparecen en condiciones de inmunodeficiencia innatas o adquiridas, por lo que las variantes constitutivamente activadas de p300 tienen utilidad en métodos para estimular el sistema inmune en condiciones tales como cirugía, heridas, infecciones u otro tipo de traumas. Los compuestos de la invención son útiles para su administración en infecciones bacterianas, virales, parasitarias del tipo de *Así*, la invención contempla el uso de los polipéptidos y polinucleótidos para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias tales como meningitis, carbunco, apendicitis, disenteria, bacteremia, peste, lepra, borreliosis, botulismo, bronquitis, brucelosis, peste bubónica, cerebritos, cervicitis, cólera, conjuntivitis, cistitis, dermatitis, diarrea, encefalitis, endocarditis, fiebre entérica, enteritis, enterocolitis, epididimitis, erisipela, tuberculosis, forúnculos, gangrena, gastritis, gastroenteritis, otitis, glomerulonefritis, impetigo, laringitis, tétano, mastitis, meningitis, meningoencefalitis, listeriosis, nocardiosis, oftalmitis, osteomielitis, otitis media, pancreatitis, parotiditis, neumonía, listeremia, prostatitis, sepsis puerperal, abscesos cutáneos, pielonefritis, fiebre reumática, rinitis, romboencefalitis, salmonelosis, escarlatina, sepsis, shigelosis, sífilis, peritonitis, sinusitis, traqueobronquitis, fiebres de Malta, tífus, fiebres tifoideas, úlcera y uretritis.

Asimismo, los compuestos de la invención pueden usarse como agentes adyuvantes de vacunas inyectables cuando se utilizan conjuntamente con vacunas para alguna de las enfermedades citadas anteriormente.

Adicionalmente, los compuestos de la invención que tienen utilidad para el tratamiento de tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza, cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos e hígado. En particular, tumores que pueden ser tratados con los compuestos de la invención incluyen adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma y teratoma. En particular, el tumor/cáncer se selecciona del grupo de melanoma acral lentiginoso, queratosis actínica adenocarcinoma, carcinoma adenoidal cística, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma de células basales, carcinoma de glándulas branquiales, carcinoma capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, cistadenoma, tumor del seno endodermal, hiperplasia endometrial, sarcoma del estroma endometrial, adenocarcinoma endometrioide, sarcoma ependial, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de la línea germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomastosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinita, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas interepiteliales, carcinoma de células escamosas invasivas, carcinoma de células grandes, leiomyosarcoma, melanoma, melonoma maligno, tumor mesotelial maligno, meduloblastoma, medulopitelioma, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, tumores pituitarios, plasmocitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma no diferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, vipoma, tumor de Wilm. Aún más preferiblemente, el tumor/cáncer a ser tratado con los compuestos de la invención incluye cáncer intracerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer rectal, astrocitoma, preferiblemente astrocitoma de grado II, III o IV, glioblastoma, preferiblemente

glioblastoma multiforme, cáncer de células pequeñas, y cáncer de células no pequeñas, preferiblemente cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma metastático, cáncer de próstata metastático independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastático dependiente de andrógenos y cáncer de mama.

5 Para uso en medicina, los compuestos de la invención pueden ser formulados conjuntamente con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención se formulará en una forma farmacéutica de administración sólida (p.ej., comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, etc.) o líquida (p.ej., soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.). En otra realización particular, 10 las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

15 Alternativamente, cuando el compuesto de la invención comprende un polinucleótido, la composición farmacéutica de la invención puede formularse en forma de una composición destinada para su empleo en terapia génica; a modo ilustrativo, no limitativo, en este caso, la composición farmacéutica de la invención puede contener un vector, viral o no viral, que comprende un polinucleótido de la invención o una construcción génica de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dichos vectores pueden ser vectores virales, por ejemplo, basados en retrovirus, adenovirus, etc., o no virales tales como los complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores, que contienen un polinucleótido o una construcción génica de la invención pueden ser administrados directamente al cuerpo humano o animal por métodos convencionales. Alternativamente, dichos vectores pueden ser utilizados para transformar, transfectar o infectar células, por ejemplo, células de mamíferos, incluido el hombre, *ex vivo*, y, posteriormente 20 implantarlas en el cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al cuerpo humano o animal dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecte adversamente a la viabilidad de dichas células.

30 Las composiciones de la invención pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugadas a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en WO07069090 (Lindgren, A. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393). Alternativamente, en el caso que el compuesto terapéutico sea ADN, éste puede administrarse formando parte de un vector plasmídico o de un vector viral, preferiblemente vectores basados en adenovirus, en virus adeno aso ciados o en retrovirus, particularmente virus basados en el virus de la leucemia murina (MLV) o en lentivirus (HIV, FIV, EIAV).

40 En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas de la invención comprende instrucciones para su uso. El experto en la materia apreciará que el régimen de dosis y los pacientes correspondientes a ser tratados se pueden determinar de acuerdo con la presente invención. Las dosis recomendadas se indicarán en la etiqueta del producto permitiendo al prescriptor anticipar los ajustes de dosis dependiendo del grupo de pacientes considerado, con información que evita 45 prescribir la droga incorrecta a los pacientes incorrectos a la dosis incorrecta.

El régimen de dosis se determinará por el médico y otros factores clínicos; preferiblemente de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Como es bien sabido en la ciencia médica, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de la superficie del cuerpo, edad, 50 el compuesto particular que se le va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y si se están administrando otras drogas al mismo tiempo. El progreso se puede observar mediante valoración periódica.

Las composiciones de la invención pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 ó 0.00001 mg 55 por cada kg de peso corporal y menos de 200 nmol de agente ARN, es decir, en torno a 4.4×10^{16} copias por kg de peso corporal o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7.5, 1.5, 0.75, 0.15 ó 0.075 nmol por Kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica. Las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente en el órgano en el que se observe el defecto que se desea tratar en cuyo caso se administran dosis de entre 0.00001 mg a 3 mg por órgano, o preferiblemente entre 0.0001 y 0.001 mg 60 por órgano, en torno a 0,03 y 3.0 mg por órgano, en torno a 0,1 y 3,0 mg por órgano o entre 0,3 y 3,0 mg por órgano.

La dosis depende de la severidad y respuesta de la condición a tratar y puede variar entre varios días y varios meses o hasta que se observe que la condición remite. La dosificación óptima se puede determinar realizando mediciones periódicas de las concentraciones de agente en el organismo del paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir 65 de los valores de EC50 obtenidos mediante ensayos previos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente, menos de una vez cada 2, 4, 8 o 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de menos cantidad que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente

ES 2 362 915 A1

con dosis que oscilan entre 0,01 μg y 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran, preferiblemente, como mucho una vez cada 5, 10 ó 30 días. El tratamiento se debe continuar durante un tiempo que variará según el tipo de alteración que sufra el paciente, su severidad y el estado del paciente. Tras el tratamiento, se debe monitorizar la evolución del paciente para determinar si se debe incrementar la dosis en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o se disminuye la dosis si se observa una mejora de la enfermedad o si se observan efectos secundarios indeseados.

La dosis diaria se puede administrar en una única dosis o en dos o más dosis según las circunstancias particulares. Si se desea una administración repetida o administraciones frecuentes, es aconsejable la implantación de un dispositivo de administración tal como una bomba, un catéter semipermanente (intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un reservorio.

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la capacidad de la proteína A238L de bloquear la activación de NF-kappaB y NF-AT radica en la capacidad de esta proteína de impedir la actividad activadora de la transcripción de p300 al impedir la fosforilación de p300 por la PKC-theta. Estos resultados permiten el desarrollo de métodos para la identificación de compuestos capaces de inhibir la actividad de p300 de forma similar a A238L. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de compuestos antitumorales que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una célula que comprende
 - (a) un polipéptido de fusión que comprende un primer componente formado por la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada y un segundo componente formado por un dominio de unión a ADN y
 - (b) un gen reportero acoplado operativamente a un promotor que comprende al menos una copia del sitio al que se une el dominio de unión de ADN presente en el polipéptido (i)

con un compuesto cuya actividad antitumoral se desea ensayar y

- (ii) identificar aquellas células en las que se produzca una disminución de la expresión del gen reportero en donde el compuesto es antitumoral si provoca una disminución de la expresión del gen reportero.

En una primera etapa, el método de identificación de compuestos antitumorales o antiinflamatorios de la invención implica poner en contacto una célula con un compuesto candidato en cualquier grado de pureza. Por "célula" se entiende, en el contexto de la presente invención, cualquier célula que comprende

- (a) un polipéptido de fusión que comprende un primer componente formado por la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada y un segundo componente formado por un dominio de unión a ADN y
- (b) un gen reportero acoplado operativamente a un promotor que comprende al menos una copia del sitio al que se une el dominio de unión de ADN presente en el polipéptido (i).

En una forma preferida de realización, el polipéptido (i) comprende una variante de la secuencia SEQ ID NO: 1 cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada. Preferiblemente, la variante de la SEQ ID NO: 1 se encuentra constitutivamente activada mediante la sustitución del amino ácido en posición 193 de SEQ ID NO: 1 por un análogo estructural de un fosfoamino ácido. En una forma aún más preferida de realización, el análogo estructural de un fosfoamino ácido es Asp.

En otra forma preferida de realización, el polipéptido (i) comprende la secuencia SEQ ID NO: 1. En este caso, sólo es posible identificar compuestos que interfieran con la activación de p300 si el polipéptido de SEQ ID NO: 1 se activa previamente por medio de la fosforilación en la posición 193 (correspondiente a la posición 384 en la proteína p300 completa). Dicha activación puede ser llevada a cabo por medio de la proteína PKC-theta que aparece de forma endógena en la célula en la que se lleva a cabo el ensayo. Sin embargo, en caso de que la célula no disponga de actividad PKC-theta suficiente para la activación del polipéptido de SEQ ID NO:1, la invención contempla, en una forma preferida de realización, el uso de una célula en la etapa (i) que comprende, adicionalmente, un gen que codifica PKC-theta. En una forma preferida de realización, el gen que codifica PKC-theta se encuentra operativamente controlado por un promotor inducible. Promotores adecuados para regular la expresión de PKC-theta incluyen los promotores anteriormente mencionados. Preferiblemente, el promotor es un promotor inducible que permite activar la expresión de PKC-theta a voluntad mediante la puesta en contacto de la célula con un determinado compuesto o en determinadas condiciones.

Genes reporteros que se pueden usar formando parte del componente (ii) invención incluyen luciferasa, proteína verde fluorescente y variantes de la misma que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda (por ejemplo, DS-

ES 2 362 915 A1

Red o proteína fluorescente roja), cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano.

5 Células adecuadas para la realización del método de la invención incluyen células de las líneas CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK 293, 3T3, WI38 y similares. En una forma preferida de realización, la célula que se usa en el método de la invención es una célula Jurkatt, correspondiente una línea de células T de origen humano.

10 Una vez que se ha seleccionado la célula en la que se va a expresar las proteínas de fusión y el gen reportero bajo el control de un promotor, es necesario incorporar en dicha célula las construcciones de ADN que codifican para el componente (i) y que comprenden la construcción (ii). Las construcciones de ADN se introducen en las células objeto de estudio usando cualquiera de los métodos de transfección conocidos para el experto en la materia (véase secciones 9.1 a 9.5 en Ausubel, F.M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc; ringbou edition, 2003). En particular, las células se pueden transfectar mediante co-precipitación de ADN con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, polibreon, electroporación, microinyección, fusión mediada por liposomas, lipofección, infección 15 por retrovirus y transfección biolística.

Las construcciones necesarias para la expresión de ambas componente pueden incorporarse de forma transitoria o de forma estable. Preferiblemente, las construcciones se incorporan de forma estable. Para ello, es necesario incluir en la transfección un gen que codifique para resistencia a un determinado antibiótico, de forma que se puedan seleccionar 20 aquellas líneas celulares que han incorporado el ADN en el genoma de aquellas líneas celulares en las que el ADN se encuentra en posición extracromosómica. El gen que permite seleccionar las células se puede aportar formando parte del mismo vector que contiene la construcción objeto de la invención o, alternativamente, se puede aportar separadamente mediante co-transfección con un segundo plásmido que contiene dicho gen de resistencia. En este último caso, el plásmido que contiene la construcción de ADN se aporta a la mezcla de transfección en un exceso 25 molar con respecto al gen de resistencia de forma que por cada evento de integración del gen de resistencia exista una alta probabilidad de integración del gen que contiene el promotor objeto de estudio. Preferiblemente, el plásmido que contiene la construcción de ADN se aporta en un exceso de al menos 5 veces con respecto al vector que contiene el reportero de resistencia.

30 Marcadores de resistencia adecuados para seleccionar líneas celulares que han integrado la construcción en el genoma incluyen marcadores de selección positiva como por ejemplo el gen de resistencia a la neomicina, que confiere resistencia al aminoglucósido G418, el gen de la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina, el gen ODC, que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa (2-(difluorometil)-DL-ornitina (DFMO), el gen de la dihidrofolato reductasa que confiere resistencia a metotrexato, el gen de la puromicina-N-acetil transferasa, 35 que confiere resistencia a puromicina, el gen ble que confiere resistencia a zeocina, el gen de la adenosina deaminasa que confiere resistencia a 9-beta-D-xilofuranosil adenina, el gen de la citosina deaminasa, que permite a las células crecer en presencia de N-(fosfonacetil)-L-aspartato, timidina kinasa, que permite a las células crecer en presencia de aminopterina, el gen de Xantina-guanina fosforibosiltransferasa, que permite a las células crecer en presencia de xantina y ausencia de guanina, el gen *trpB* de *E. coli* que permite a las células crecer en presencia de indol en lugar de triptófano, el gen *hisD* de *E. coli*, que permite a las células el usar histidinol en lugar de histidina. El gen de selección se incorpora en un plásmido que puede incluir, adicionalmente, un promotor adecuado para la expresión de dicho gen en células eucariotas (por ejemplo, los promotores CMV o SV40), un sitio optimizado de iniciación de la traducción (por ejemplo un sitio que sigue las denominadas reglas de Kozak o un IRES), un sitio de poliadenilación como, por ejemplo, el sitio de poliadenilación del SV40 o de la fosfoglicerato quinasa, intrones como, por ejemplo, el intrón del 45 gen de la beta-globulina.

El proceso de selección de células que contienen la construcción de ADN de interés integrada de forma estable en el genoma se lleva a cabo mediante un proceso de selección convencional (véase por ejemplo Ausubel, F.M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1997) 9.5.1-9.5.19). Para ello, se transfectan las células con el vector 50 o mezclas de vectores y, tras un periodo de recuperación, se dejan crecer en un medio selectivo (bien un medio que contiene al antibiótico frente al que el reportero confiere resistencia o bien un medio mínimo que contiene el antimetabolito frente al cual el reportero confiere resistencia). Las colonias celulares que crecen en medio selectivo se aíslan y se vuelven a dejar crecer en medio selectivo. Una vez que se han obtenido células que son capaces de crecer durante repetidos ciclos de proliferación en presencia del marcador de selección, puede ser conveniente el eliminar 55 dicho marcador de las células, particularmente si las células van a ser transfectadas con otro marcador de selección. Para ello, se pueden usar recombinasas, en particular el sistema Cre/Lox. Alternativamente, es posible amplificar el número de copias del marcador de selección, lo que resulta en una amplificación simultánea del número de copias del gen de interés con el consiguiente aumento de su expresión. Para ello, las células se hacen crecer en presencia de concentraciones progresivamente superiores de agente de selección, lo que resulta en una selección de las células 60 que han sufrido una amplificación de los genes que confieren resistencia a tal agente y, normalmente, de las regiones adyacentes o intermedias. Preferiblemente se usa DHFR como marcador de selección y la selección de líneas celulares en las que existe una amplificación de dicho gen se lleva a cabo en presencia de metotrexato.

En el caso de que las células utilizadas en el método de la invención, es necesaria la incorporación sucesiva de dos 65 construcciones. En este caso, es posible incorporar la construcción que codifica la proteína de fusión de forma estable usando los métodos ya descritos y la construcción que contiene el gen reportero de forma transitoria. Alternativamente, es posible incorporar ambas construcciones de forma estable, en cuyo caso será necesario usar un marcador de selección distinto con cada construcción y efectuar el proceso de transfección/selección ya descrito dos veces. Nor-

ES 2 362 915 A1

malmente, se considera que una célula expresa un marcador de forma estable cuando la expresión de dicho marcador no disminuye con sucesivos ciclos de proliferación, independientemente de la presencia en el medio de cultivo de un agente de selección.

Una vez que se dispone de una línea celular que ha integrado en su genoma de forma estable las construcciones de ADN de acuerdo a la invención, la célula se pone en contacto con un compuesto o preparación cuyo efecto sobre la transcripción del gen reportero se desee estudiar. Por "poner en contacto" una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta el interior de la célula que expresa la construcción de ADN.

Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección, según se ha descrito anteriormente para la introducción de la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción/traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. *et al.*, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, Mol. Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393).

Preferiblemente, el compuesto a ensayar no se encuentra aislado sino que se encuentra formando parte de una mezcla más o menos compleja bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos incluyendo tanto péptidos como análogos peptídicos que comprenden D-amino ácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiéster del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para que contengan compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos se pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilicidad, hidrofiliicidad, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

Alternativamente, los compuestos a ensayar pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, vegetal obtenido de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

En una segunda etapa, el método de la invención incluye la determinación de la actividad de la proteína codificada por el gen reportero. Preferiblemente, a la vez que se lleva a cabo la determinación de la actividad del gen reportero en presencia de los compuestos a ensayar, es necesario efectuar determinaciones en paralelo de la actividad transcripcional basal en presencia de únicamente el medio de cultivo y/o del vehículo en el que se encuentra disuelto el compuesto a ensayar o en el que se han preparado los extractos a ensayar. Generalmente, aquellos compuestos o extractos con actividad promotora de la transcripción se manifestarán porque darán valores superiores a 1 de la relación entre actividad transcripcional en presencia del compuesto o del extracto candidato y en presencia de vehículo. Preferiblemente, se considerarán compuestos o extractos positivos aquellos en los que la relación de actividad del gen reportero sea de al menos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 y 2.

En una forma de realización preferida, el método de la invención se utiliza para identificar compuestos adecuados para el tratamiento o la prevención de un proceso tumoral en donde dicho proceso se caracteriza por una activación indeseada de la activada de los factores de transcripción NF- κ B, NF-AT y/o AP-1.

El método de detección de la expresión del gen reportero implica la puesta en contacto de las células con un compuesto que puede generar un producto coloreado o fluorescente en presencia del producto codificado por el gen reportero. Así, si la enzima es la fosfatasa alcalina, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo del p-nitrofenil fosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato/tetrazolio nitroblue (BCIP/NPT), Fast-Red/naftol-AS-TS fosfato o sustratos fluorogénicos del tipo de 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), 3,6-fluoresceína difosfato (3,6-FDP), Fast Blue BB, Fast Red TR o sales de diazonio de Fast Red Violet LB.

Si el gen reportero codifica una peroxidasa, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo de 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilenediamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-amino salicílico, ácido 3-dimetilamino benzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) o sustratos fluorogénicos del tipo

ES 2 362 915 A1

del ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazines reducidas y benzotiazines reducidas, incluyendo los reactivos Amplex[®] Red y Amplex UltraRed y los dihidroxantenos reducidos.

Si el gen reportero codifica una glucosidasa, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo de o-nitrofenil- β -D-galactosido (o-NPG), p-nitrofenil- β -D-galactosido y 4-metilumbeliferil- β -D-galactosido (MUG) para la β -D-galactosidasa y sustratos fluorogénicos del tipo de la resorufina beta-D-galactopiranosido, digalactosido de fluoresceína (FDG), diglucurónido de fluoresceína, 4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil beta-D-galactopiranosido y beta-D-galactopiranosido de cumarina.

En una forma preferida de realización, el gen reportero codifica para la luciferasa y la detección se efectúa midiendo la luminiscencia emitida por dicha enzima en presencia de ATP. La luminiscencia se determina usando kits comerciales, como por ejemplo, el kit de enhanced luciferase assay (Analytical Luminescence Laboratory, MI). Preferiblemente, el método de identificación de compuestos de la invención se lleva a cabo usando métodos de alta capacidad de procesamiento (high-throughput screening o HTS), de forma que se puedan ensayar un alto número de muestras simultáneamente. Los ensayos HTS se llevan a cabo preferiblemente en placas mutipocillo, preferiblemente, en placas de 96 pocillos, lo que facilita la detección de la actividad luciferasa en cada muestra puesto que existen luminómetros que pueden aceptar directamente placas de cultivo de 96 pocillos.

En caso de que el compuesto candidato se encuentre formando parte de una mezcla de mayor o menor complejidad, la invención comprende adicionalmente una o varias etapas (iii) de fraccionamiento de dicha mezcla y la repetición de las etapas (i), (ii) y (iii) del método de la invención un número variable de veces hasta que el compuesto de la mezcla responsable de la actividad promotora de la transcripción se encuentre aislado. Métodos para el fraccionamiento de compuestos presentes en una mezcla incluyen cromatografía (en capa fina, de gases o de exclusión molecular en gel, de afinidad), cristalización, destilación, filtración, precipitación, sublimación, extracción, evaporación, centrifugación, espectrometría de masas, adsorción y similares.

La invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y en ningún caso limitativos de la invención.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

Western blot

Extractos nucleares y citosólicos de células Jurkat wild-type (wt), Jurkat-pcDNA y Jurkat-A238L estimuladas o no estimuladas con PMA/Ion, se procesaron para el ensayo. Las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500 μ l de Buffer A (10 mM HEPES pH: 7.6; 10 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA, 0.75 mM espermidina, 0.15 mM espermina, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 mM Na₂MoO₄ y 2 μ g/ml de cada uno de los inhibidores leupeptina, aprotinina y pepstatina A). Después de 15 min a 4°C, se añadió 5 μ l de solución NP-40 al 10%. Las muestras se agitaron mediante vortex durante 10 sec y se centrifugaron 20 min a 3000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes se usaron como extractos citosólicos. Los núcleos se lavaron dos veces con 200 μ l de buffer A para evitar la contaminación citosólica. Para la extracción de proteínas nucleares, se añadió 50 μ l de Buffer C (20 mM HEPES pH: 7.6; 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 mM Na₂MoO₄ y 2 μ g/ml de cada uno de los inhibidores leupeptin, aprotinin y pepstatin A) y los pellet de núcleos se incubaron durante 30 min a 4°C en agitación. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm y 4°C, y los sobrenadantes se usaron como extractos nucleares. Los extractos proteicos de células Jurkat wt se prepararon con buffer RIPA (radio immunoprecipitation assay), formado por 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40 y 0.25% Na-deoxycholate, y suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). En cada caso, la concentración de proteínas se determinó mediante el método espectrofotométrico del ácido bicínico (BCA) (Pierce). Los lisados celulares se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de Immobilon (Amersham) y las proteínas separadas reaccionaron con el anticuerpo primario específico. Los anticuerpos usados fueron: NFATc2 (sc-7296, Santa Cruz Biotechnology), NF κ B-p65 (se-109, Santa Cruz Biotechnology), c-Jun (sc-45, Santa Cruz Biotechnology), c-Fos (sc-52, Santa Cruz Biotechnology), p300 (sc-584, Santa Cruz Biotechnology), Acetylated Lysine (Ac-K-103, Cell Signaling), GAL4 (sc-577, Santa Cruz Biotechnology), PKC (sc-10800, Santa Cruz Biotechnology), PKC- θ (sc-212, Santa Cruz Biotechnology), V5-TAG (MCA1360, Serotec), β -actin (AC-15, Sigma) y un antisuero policlonal frente A238L. Las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Amersham Biosciences). Para la detección de las proteínas específicas se utilizó el método de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences). El análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el software TINA 2.0.

Immunoprecipitación

Extractos celulares y nucleares de células Jurkat, al 80-90% de confluencia, tratadas o no con PMA/Ion durante 4 h, se procesaron, y se determinó la concentración proteica. Los extractos se incubaron con los siguientes anticuerpos específicos: NFATc2 (sc-7296, Santa Cruz Biotechnology), NF κ B-p65 (se-109, Santa Cruz Biotechnology), c-Jun (sc-45, Santa Cruz Biotechnology), c-Fos (sc-52, Santa Cruz Biotechnology), p300 (sc-584, Santa Cruz Biotechnology), PKC (sc-10800, Santa Cruz Biotechnology), PKC- θ (sc-212, Santa Cruz Biotechnology), V5-TAG (MCA1360, Serotec) y una IgG de conejo o ratón como control negativo, a una concentración final de 4 μ g/ml. Las muestras se

ES 2 362 915 A1

incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se incubaron durante 3 horas a 4°C con bolas de proteína A/G-sefariosa (Sigma). Las muestras se centrifugaron y las bolas se lavaron tres veces con el buffer de lavado correspondiente (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, y 0.5% Nonidet P-40). Los inmunoprecipitados se mezclaron con buffer de carga SDS y se separaron mediante un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente de 4-15%, y se analizaron mediante Western blot.

Construcción de plásmidos

El plásmido de expresión pcDNA-A238L expression plasmid se generó clonando el marco de lectura abierta del gen A238L procedente del aislado viral Ba71V de VPPA (African swine fever virus), en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). El NFAT-luc, que contiene tres copias en tándem del sitio de unión distal NFATc2/AP-1 (posición -286 a -257) del promotor de IL-2, fue cedido por el Dr. Gerald Crabtree (Departamento de Patología y Biología del Desarrollo, Howard Hughes Medical Institute, Stanford University Medical School, Stanford, CA). El plásmido reportero NFκB-p65 (pNF3TKLuc) contiene un trímero del motivo de unión de NFκB-p65 del gen upstream H-2K del promotor de la timidita kinasa y del gen reportero de la luciferasa. El plásmido AP-1-Luc presenta el elemento de respuesta a AP-1 (-73 a +63 pb) del promotor humano de la colagenasa fusionado al gen de la luciferasa. La construcción pGAL4-hNFATc2 contiene los primeros 451 aminoácidos del NFATc2 humano fusionado al dominio de unión a DNA (DBD) del factor de transcripción de levaduras GAL4. La construcción GAL4-p65 tiene el dominio de unión a DNA de GAL4 unido al dominio de transactivación carboxi terminal de p65. El plásmido GAL4-c-Jun expresa los primeros 166 aminoácidos de c-Jun humano fusionado al DBD del factor de transcripción de levaduras GAL4. GAL4-cFos y GAL4-Sp1 fueron cedidos por el Dr. Manuel Fresno (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain) y el Dr. Stefan Roberts (División of Gene Expression, Department of Biochemistry, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK) respectivamente. La construcción GAL4-luciferasa (pGAL4-Luc) contiene cinco sitios de unión a GAL4 derivados de la fusión del gen GAL4 y el gen reportero luciferasa. La construcción GAL4-p300 full-length (FL) y los mutantes (192-703), (1-1301) y (1239-2414) fueron cedidos por Dr. Perkins. La expresión del plásmido pCI-p300 wild-type y su mutante de delección histona acetil transferasa (HAT), pCI-p300ΔHAT, fue cedido por el Dr. Joan Boyes (Institute of Cancer Research, London, UK) y el plásmido pCDNA3-A238L-SV5 fue cedido por la Dr. Linda K. Dixon (Institute for Animal Health, Woking, Surrey, UK). Los plásmidos de expresión de PKC-θ wild-type y el mutante constitutivamente activo (pEF-PKC-θ wt y pEF-PKC-θ A/E, respectivamente) fueron cedidos por el Dr. Martín Villalba (Institut de Genetique Moleculaire de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique-Unite Mixte de Recherche, Montpellier, France). El plásmido vacío pEFneo fue cedido por el Dr. Manuel Fresno. GAL4-p300 (FL)Ser384Ala y GAL4-p300(192-703)Ser384Ala fueron generados utilizando el *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis fueron: p300S384A; forward (5'-CCACATGACACACTGCCAGGCAGGCAAGTCTGCCAAGTGGC-3') (SEQ ID NO: 5) y reverse (5'-GCCACTTGGCAGACTTGCCTGCCTGGCAGTGTGTCATGAGG-3') (SEQ ID NO: 6). Los nucleótidos subrayados indican la sustitución de la Serina por Alanina. El plásmido pRL-tk-luc (Promega) se utilizó en todos los casos para evaluar la eficiencia de transfección.

Ensayos de transfección y ensayos luciferasa

Se generaron células Jurkat que expresan de manera estable la proteína A238L. Para la transfección transitoria, las células se transfectaron con 250 ng de plásmidos reporteros o con 1 μg de plásmidos de expresión por 10⁶ células, utilizando el sistema *LipofectAMINE Plus Reagent* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. En los ensayos de co-transfección se añadió la misma dosis de plásmido de expresión por 10⁶ células. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C, se lavaron e incubaron con medio con suero durante 24 h y se estimularon o no con PMA/Ion. Como control de la transfección para el ensayo luciferasa, se co-transfectó en todos los casos el plásmido control Renilla luciferasa pRL-TK-luc (Promega). A los tiempos post-estimulación indicados, las células se lisaron con 200 μl de *Cell Culture Lysis Reagent* (Promega) y se centrifugaron a velocidad máxima durante 5 min a 4°C, y 20 μl de cada sobrenadante se utilizó para determinar los valores de la actividad luciferasa de luciérnaga y Renilla en un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory) utilizando *Dual Luciferase Assay System* (Promega). Las transfecciones se normalizaron a los valores de luciferasa de Renilla, y los resultados se expresaron como unidades de luminiscencia relativas ajustados a la concentración de proteínas de cada muestra determinado por el método BCA. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los datos se representan como unidades de luciferasa relativas (RLU) (mean ± S.D).

Ensayo de fosforilación *in vitro* en fase sólida

Utilizamos 2 μg de MBP (miosin binding protein) (sc-4113, Santa Cruz Biotechnology) o los inmunoprecipitados GAL4-p300(192-703)wt y GAL4-p300(192-703)S384A como sustrato de la fosforilación *in vitro*, en los cuales se inmunoprecipitó pan-PKC o PKC-θ de células Jurkat. Extractos celulares de 10⁷ células Jurkat se cultivaron en ausencia o presencia de PMA/Ion durante 30 minutos. Las células se usaron en buffer RIPA formado por 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl y 1% NP-40, suplementado con inhibidores de fosfatasa (1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, y 10 mM Na₂MoO₄) e inhibidores de proteasa (0.5 mM fluoruro fenilmetilsulfonil) 1 μg de pepstatina, 2 μg de leupeptina, y 2 μg de aprotinina por ml).

Los extractos clarificados se incubaron toda la noche con 4 μg de anticuerpo contra PKC (sc-10800, Santa Cruz Biotechnology) o contra PKC-θ (sc-212, Santa Cruz Biotechnology) para inmunoprecipitarlos. Los precipitados fueron resuspendidos en buffer kinasa constituido por 20 mM HEPES (pH 7.6), 20 mM MgCl₂, 20 mM β-glicerofosfato, 20

μM ATP, y $1 \mu\text{Ci}$ de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (actividad específica, 3,000 Ci/mol) suplementado con inhibidores de fosfatasa y mezclado con el sustrato correspondiente. Después de 30 min a 30°C , la reacción kinasa se determina lavando con buffer TNT que contiene 20 mM Trizma base (pH 7.5), 200 mM NaCl y 1% Tritón X-100, y está suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Las proteínas fosforiladas se separaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, y se revelaron por autoradiografía.

Ejemplo 2

10 *La Ser384 es un nuevo residuo en el dominio CH1 de p300 potencialmente fosforilado por PKC y bloqueado por A238L*

Puesto que la activación y represión transcripcional de p300 se regula por la actividad de diferentes quinasas, y para establecer el mecanismo funcional de A238L por el cual controla simultáneamente la actividad transcripcional de NF κ B, NFAT y c-Jun, probablemente a través de la regulación del dominio CH1/KIX de p300, hemos analizado los residuos fosforilables presentes en dicho dominio usando el servidor NetPhosK, encontrando una nueva serina en la posición 384 dentro del dominio TAD potencialmente fosforilable por PKC. A partir de este momento, nos planteamos, por un lado, caracterizar el isotipo de 1 PKC involucrada, y por otro, si A238L realiza su función por desplazamiento de dicha PKC de dicho dominio de fosforilación. Para ello preparamos extractos nucleares de células estables Jurkat-PCDNA y Jurkat-A238L, transfectadas con diferentes construcciones de p300, GAL4-p300 (FL), GAL4-p300 (1-1301), GAL4-p300 (1239-2414), y GAL4-p300 (192-703), estimuladas o no con PMA/Ion que fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo frente a distintos miembros de la familia de PKCs (panPKC). Nuestros resultados muestran que la p300 completa se asocia a PKC después de la estimulación con PMA/Ion, y que esta interacción es 1 desplazada por la proteína A238L. La proteína viral también desplazó PKC de las construcciones que contienen la región amino-terminal de p300, GAL4-p300(1-1301) (Fig. 1B), o los dominios CH1/KIX, GAL4-p300 (192-703) (Fig. 1C), soportando por tanto la hipótesis de que A238L específicamente inhibe la activación de la región amino-terminal TAD de p300 mediada por PKC. Cuando se ensayó la construcción GAL4-p300 (1239-2414), conteniendo el C-terminal TAD, A238L no alteró la interacción con PKC (Fig. 1D), indicando que la proteína viral no afecta la unión de PKC a esta región de p-300. Además, la Fig. 1E muestra que A238L no interacciona con PKCs, y por tanto no es esta la explicación de su interferencia con la unión. Por último, analizamos la actividad de la PKC en ensayos kinasa específicos, que demostraron que la actividad quínasa de PKC no está alterada (Fig. 1F, lo cual indica fuertemente que la inhibición de la trans activación de p-300 se lleva a cabo impidiendo la interacción de la quínasa con el amino-terminal TAD de p300, sin afectar a su actividad enzimática.

35 *La sobre-expresión de PKC- θ revierte la inhibición de la actividad transcripcional de p300 mediada por A238L, a través de un mecanismo que involucra la señalización de la Ser 384 y la acetilación de p300*

Para analizar la relevancia de la Ser 384 en la modulación de la actividad de p300, se generaron mutantes que sustituyen la Ser en posición 384 por Ala (S384A), sobre la proteína p300 completa, GAL4-p300 (FL) S384A, y sobre la construcción que contiene la región amino-terminal GAL4-p300 (192-703) S384A, las cuales fueron ensayadas para actividad Gal4-luc. Nuestros resultados mostraron que dicha mutación en la p300 completa es responsable de una importante reducción de la transactivación de p300 y que la sustitución de la Ser384 por alanina en GAL4-p300 (192-703) S384A eliminó completamente la actividad transcripcional mediada por esta región. (Fig. 2A). Estos datos claramente indican que la Ser384 es esencial en la trans-activación mediada por el dominio N-terminal de p300, y directamente señalan a este residuo como fundamental en la regulación global de este coactivador. Previamente ha sido demostrada la importancia de los miembros ζ , ε y θ de la familia PKC en la activación de NF-ATc2, NF- κ B-p65, y c-Jun en células T. Teniendo en cuenta estos datos, la Ser384 parece ser un sustrato potencial de PKC. Por lo tanto, y para caracterizar el isotipo de PKC responsable de la fosforilación de la Ser384, se sobre-expresaron separadamente los mutantes GAL4-p300 (192-703), wt, y GAL4-p300 (192-703) S384A en células Jurkat. Después, se utilizaron extractos nucleares para inmunoprecipitarlos con un anticuerpo específico para GAL4, y posteriormente revelarlos con un anticuerpo frente a p300 para asesorarnos de la expresión de los transfectantes (Fig. 2B). Los extractos inmunoprecipitados fueron entonces utilizados como sustratos de sucesivos ensayos quínasa usando PKC- ζ , ε y θ , previamente obtenidos de células Jurkat y Jurkat estimuladas con PMA/Ion. Los resultados muestran que ni PKC- ζ , ni ε fueron capaces de fosforilar la construcción GAL4-p300 (192-703) que comprende el extremo N-terminal de p300, mientras que PKC- θ fosforiló esta proteína de fusión, revelando la importancia de PKC- θ en la fosforilación de este dominio regulador p300. Además, se observó un menor nivel de fosforilación cuando GAL4-p300 (192-703) se usó el mutante S384A como sustrato (Fig. 2C), confirmando la relevancia de la S384 como diana de la PKC- θ en células T. Para reconfirmar el papel de A238L y de PKC- θ en la inhibición de la activación de p300, células Jurkat-pcDNA o Jurkat-A238L fueron transfectadas con el vector vacío pEFneo, pEF-PKC- θ wt, o con un vector que expresa un mutante constitutivamente activo de PKC- θ (pEF-PKC- θ A/E) y además con GAL4-p300 de cadena completa (full-length o FL) o la construcción N-terminal (192-703), junto con el plásmido reportero GAL4-luc, como se describe en el ejemplo 1. La Fig. 2D muestra cómo la sobre-expresión del mutante constitutivamente activo PKC- θ (pEF-PKC- θ A/E), revierte completamente la inhibición inducida por A238L, incrementando por tanto la relevancia de PKC- θ en el mecanismo de inhibición llevado a cabo por la proteína viral. Los resultados también indican que PKC- θ debe estar activada para ejercer su función, un punto que ya se había establecido previamente por otros laboratorios. Para demostrar la relación entre PKC- θ y la inhibición inducida por A238L, se inmunoprecipitó la quínasa de Jurkat-pcDNA y Jurkat-A238L, previamente transfectadas con GAL4-p300 (192-703) wt. La Fig. 2E muestra la presencia de GAL4-p300 (192-703) en los inmunoprecipitados de células Jurkat-pcDNA estimuladas, pero no en las Jurkat-A238L.

ES 2 362 915 A1

En su conjunto, estos datos demuestran que la expresión de la proteína viral interfiere con la asociación de PKC- θ con la región N-terminal de p300, controlando simultáneamente la transactivación de NF- κ B-p65, NF-ATc2, y c-Jun y representando un nuevo y sofisticado mecanismo viral de bloqueo de la respuesta inflamatoria. Finalmente y para corroborar aún mas la relevancia de la S384 en la actividad de p300, usamos células Jurkat transfectadas con GAL4-p300 (FL) o con GAL4-p300 (192-703), para inmunoprecipitar las construcciones con un anti-Gal4 Ab o IgG control. Los inmunoprecipitados fueron analizados en Western blot usando un anticuerpo específico frente a acetilisina, para investigar el nivel de acetilación de los mutantes S384A comparados con los wt. Los resultados mostraron (Fig. 3) que la mutación de Ser384 por alanina decrece fuertemente el nivel de acetilación, tanto de las construcciones que expresan la p300 completo, como las del dominio terminal TAD, indicando que este residuo es probablemente responsable de la completa activación del co-activador p300.

Ejemplo 3

Se generan líneas celulares derivadas de células Jurkat que expresan p300 y que comprenden un plásmido que comprende el gen reportero luciferasa bajo el control transcripcional de varios motivos kB de unión de NF- κ B (κ B-Luc), líneas celulares que expresan el mutante S384A de p300 y que contienen el plásmido κ B-Luc, células que expresan el fragmento formado por los amino ácidos 192-703 de p300 de origen humano y que contienen el plásmido κ B-Luc y líneas celulares que expresan el fragmento formado por los amino ácidos 192-703 de p300 de origen humano con la mutación S193A (correspondiente al amino ácido 384 en la secuencia completa de p300) y que contienen el plásmido κ B-Luc. Tras la selección de aquellas líneas celulares que contienen ambos plásmidos, se determina la actividad luciferasa en las distintas líneas celulares.

Ejemplo 4

Las líneas celulares generadas que expresan p300-S384D y que comprenden el gen κ B-Luc según el ejemplo 5 se hacen crecer sobre placas multipocillo. En cada uno de los pocillos de dichas placas se añade un compuesto seleccionado de una librería combinatoria de compuestos y se determina la variación en la actividad luciferasa usando métodos de alta capacidad de procesamiento. Se identifican aquellos compuestos que provoquen una disminución de la actividad del gen reportero en comparación con el control.

Ejemplo 5

Se transfectan de forma estable células Jurkat con un primer plásmido que codifica p300 o el mutante S384D de p300 y con κ B-Luc. Una vez seleccionadas líneas celulares que contienen las dos combinaciones de plásmidos, se determina la actividad luciferasa en ambas líneas celulares y se comparan los valores obtenidos con las células que expresan la forma nativa de p300 con las células que expresan el mutante de p300.

Se transfectan de forma estable células Jurkat con un primer plásmido que codifica la proteína GAL4-p300 (192-703) o con un plásmido que codifica la proteína GAL4-p300 (192-703) S384D y con un segundo plásmido que comprende el gen reportero luciferasa bajo el control transcripcional de varios sitios de unión GAL4. Tras la selección de aquellas líneas celulares que contienen ambos plásmidos, se determina la actividad luciferasa en las distintas líneas celulares.

Ejemplo 6

Se generan líneas celulares estables que comprenden un vector que permite la expresión de GAL4-p300 (192-703) o GAL4-p300 (192-703) S384A, un segundo vector que permite la expresión de pEF-PKC- θ wt o de un mutante constitutivamente activo de PKC- θ (pEF-PKC- θ A/E) y un tercer vector que comprende un gen reportero bajo el control de varios elementos de unión de NF- κ B. Se determinará la actividad del gen reportero en las distintas líneas celulares con el fin de determinar si la fosforilación de S384 en p300 mediada por PKC- θ es capaz de estimular la activación transcripcional mediada por NF- κ B.

ES 2 362 915 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una variante de la secuencia SEQ ID NO: 1 cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada.
2. Un polipéptido según la reivindicación 1 en donde dicha variante comprende en posición 193 de la secuencia SEQ ID NO: 1 un análogo estructural de un fosfoaminoácido.
- 10 3. Un polipéptido según la reivindicación 2 en donde el amino ácido en posición 193 en la secuencia de SEQ ID NO: 1 es Asp.
4. Un polinucleótido que codifica un polipéptido tal que definido en las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4.
6. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4 o una construcción génica según la reivindicación 5.
- 20 7. Una célula que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6.
8. Un animal transgénico no humano que comprende, integrado en su genoma, un polinucleótido según la reivindicación 4.
- 25 9. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 para su uso en medicina.
10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 11. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos causados por una inhibición indeseada de la actividad de las proteínas p300, NF- κ B, NF-AT y/o c-jun.
- 35 12. Uso según la reivindicación 11 en donde el trastorno está causado por una inhibición indeseada de la actividad la proteína NF- κ B.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12 en donde el trastorno causado por una inhibición indeseada de la actividad la proteína NF- κ B se selecciona del grupo de una enfermedad asociada a la apoptosis, una enfermedad asociada al sistema inmune, una enfermedad de los vasos sanguíneos, un defecto cutáneo, un defecto dental, osteopetrosis, un defecto oftalmológico, un defecto neurológico e incontinencia pigmentaria.
- 45 14. Uso según la reivindicación 13 en donde el trastorno causado por una inhibición indeseada de la actividad la proteína NF-AT se selecciona del grupo de una enfermedad hipoinmune, una enfermedad infecciosa y un trastorno debido a una inhibición del desarrollo en algún órgano durante el desarrollo.
- 50 15. Un método para la identificación de compuestos antitumorales que comprende las etapas de:
- (i) poner en contacto una célula que comprende
- 55 (a) un polipéptido de fusión que comprende un primer componente formado por la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada y un segundo componente formado por un dominio de unión a ADN y
- (b) un gen reportero acoplado operativamente a un promotor que comprende al menos una copia del sitio al que se une el dominio de unión de ADN presente en el polipéptido (i)
- 60 con un compuesto cuya actividad antitumoral se desea ensayar y
- (ii) identificar aquellas células en las que se produzca una disminución de la expresión del gen reportero
- 65 en donde el compuesto es antitumoral si provoca una disminución de la expresión del gen reportero.

ES 2 362 915 A1

16. Un método según la reivindicación 15 en donde la variante de la secuencia SEQ ID NO: 1 cuya actividad transactivadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada comprende una sustitución del amino ácido en posición 193 en dicha secuencia por un análogo estructural de un fosfoamino ácido.

5 17. Un método según la reivindicación 16 en donde el análogo estructural de un fosfoamino ácido es Asp.

18. Un método según la reivindicación 15 en donde el polipéptido (i) comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

10 19. Un método según la reivindicación 18 en donde la célula que se usa en la etapa (i) comprende, adicionalmente, un gen que codifica PKC- θ .

20. Un método según la reivindicación 19 en donde el gen que codifica PKC- θ se encuentra operativamente controlado por un promotor inducible.

15 21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 en donde el método se lleva a cabo mediante un ensayo de alta capacidad de procesamiento.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

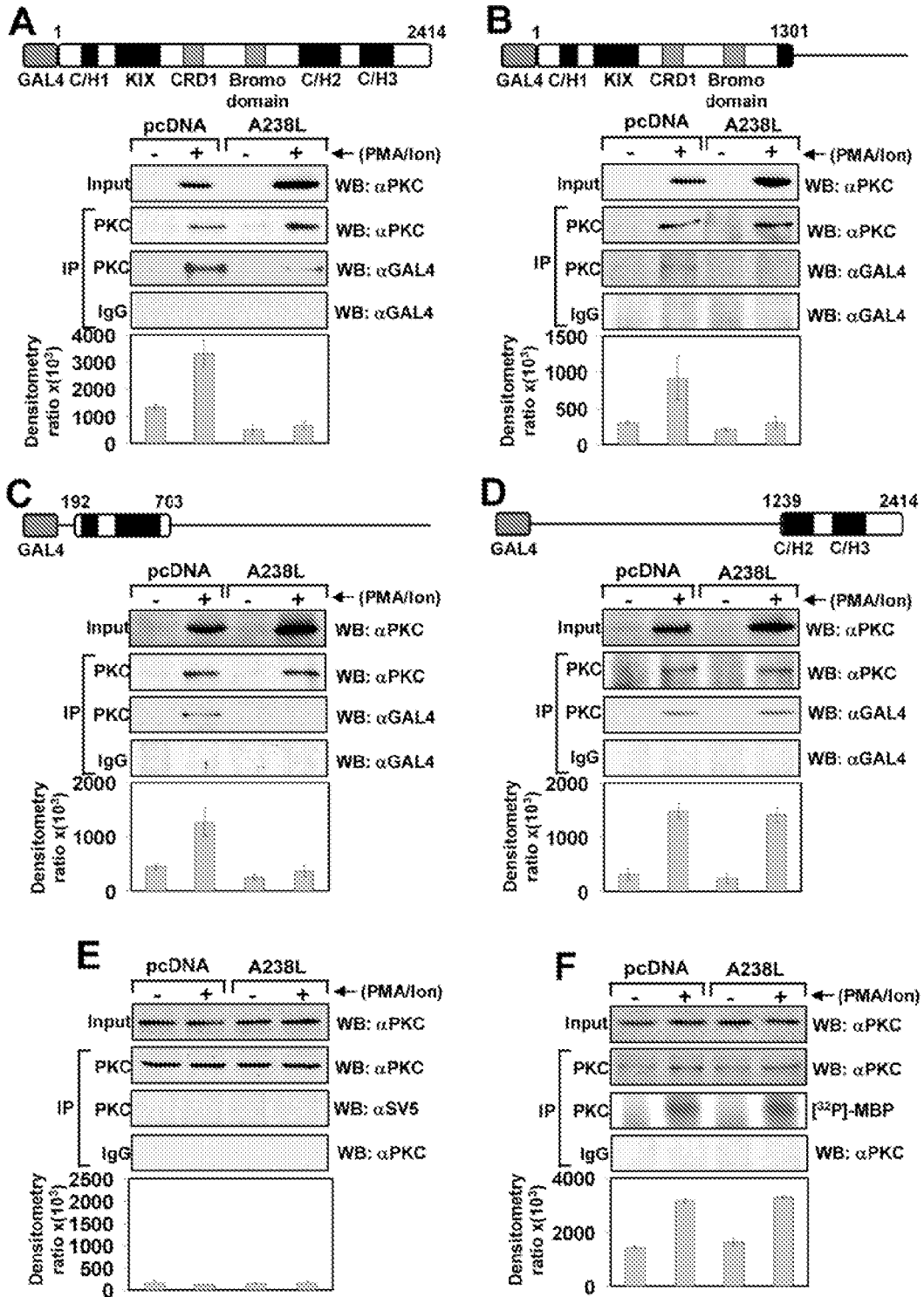


Figure 1

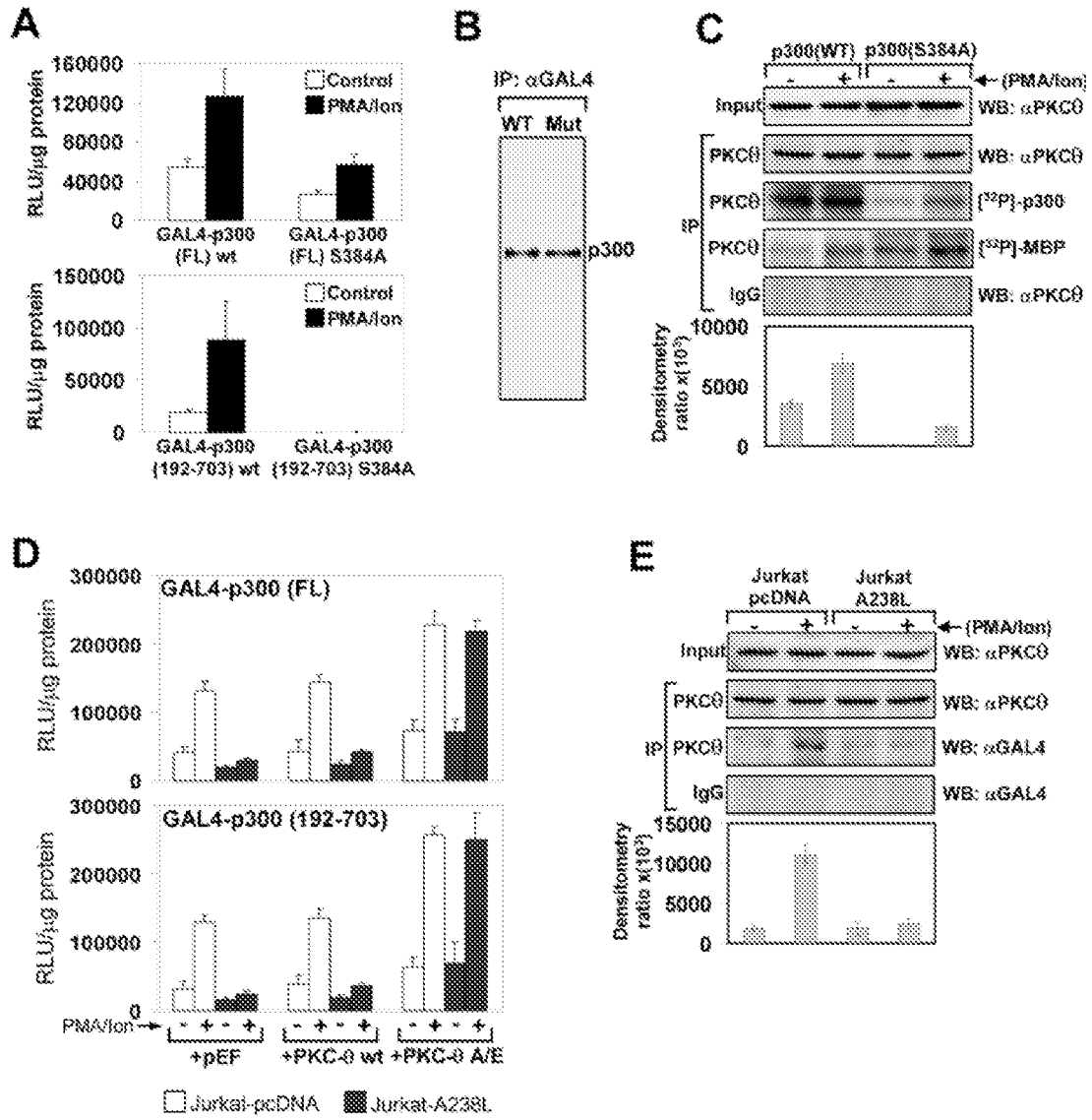


Figura 2

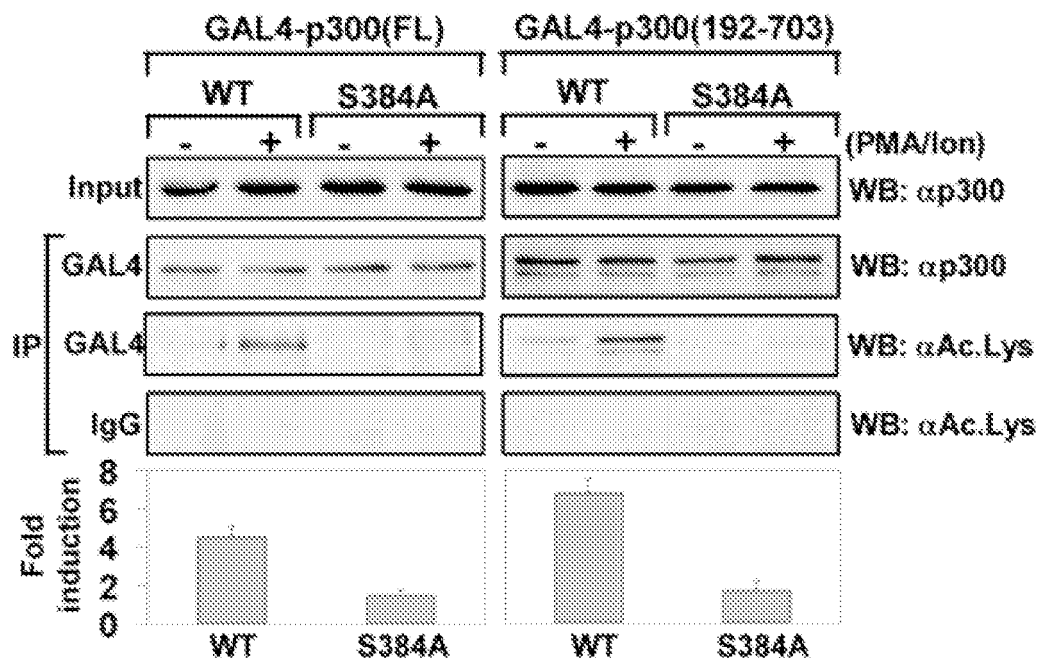


Figura 3

ES 2 362 915 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSIC

5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE p300

<130> P3657ES01

10 <150> P200800295

<151> 2008-02-04

15 <150> ES200800295

<151> 2008-02-04

<160> 4

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 512

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 1

35 Met Asn Gly Ser Ile Gly Ala Gly Arg Gly Arg Gln Asp Met Gln Tyr
1 5 10 15

40 Pro Asn Pro Gly Met Gly Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Glu Pro Leu
20 25 30

45 Gln Gln Gly Ser Pro Gln Met Gly Gly Gln Thr Gly Leu Arg Gly Pro
35 40 45

50
55 Gln Pro Leu Lys Met Gly Met Met Asn Asn Pro Asn Pro Tyr Gly Ser
50 55 60

60

65

ES 2 362 915 A1

5 Pro Tyr Thr Gln Asn Pro Gly Gln Gln Ile Gly Ala Ser Gly Leu Gly
65 70 75 80

10 Leu Gln Ile Gln Thr Lys Thr Val Leu Ser Asn Asn Leu Ser Pro Phe
85 90 95

15 Ala Met Asp Lys Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Met Pro Asn Met Gly
100 105 110

20 Gln Gln Pro Ala Pro Gln Val Gln Gln Pro Gly Leu Val Thr Pro Val
115 120 125

25 Ala Gln Gly Met Gly Ser Gly Ala His Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg
130 135 140

30 Lys Leu Ile Gln Gln Gln Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys
145 150 155 160

35 Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg Gln Cys Asn Leu Pro
165 170 175

40 His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln
180 185 190

45 Ser Gly Lys Ser Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile
195 200 205

50 Ile Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu
210 215 220

55

60

65

ES 2 362 915 A1

Pro Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Arg Asn Gln Gln Pro Ile Leu Thr
225 230 235 240

5

Gly Ala Pro Val Gly Leu Gly Asn Pro Ser Ser Leu Gly Val Gly Gln
10 245 250 255

15

Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ser Thr Val Ser Gln Ile Asp Pro Ser Ser
 260 265 270

20

Ile Glu Arg Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Leu Pro Tyr Gln Val Asn Gln
 275 280 285

25

Met Pro Thr Gln Pro Gln Val Gln Ala Lys Asn Gln Gln Asn Gln Gln
30 290 295 300

35

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Gly Met Arg Pro Met Ser Asn Met Ser Ala
305 310 315 320

40

Ser Pro Met Gly Val Asn Gly Gly Val Gly Val Gln Thr Pro Ser Leu
 325 330 335

45

Leu Ser Asp Ser Met Leu His Ser Ala Ile Asn Ser Gln Asn Pro Met
50 340 345 350

55

Met Ser Glu Asn Ala Ser Val Pro Ser Leu Gly Pro Met Pro Thr Ala
 355 360 365

60

Ala Gln Pro Ser Thr Thr Gly Ile Arg Lys Gln Trp His Glu Asp Ile
 370 375 380

65

ES 2 362 915 A1

5 Thr Gln Asp Leu Arg Asn His Leu Val His Lys Leu Val Gln Ala Ile
385 390 395 400

10 Phe Pro Thr Pro Asp Pro Ala Ala Leu Lys Asp Arg Arg Met Glu Asn
405 410 415

15 Leu Val Ala Tyr Ala Arg Lys Val Glu Gly Asp Met Tyr Glu Ser Ala
420 425 430

20

25 Asn Asn Arg Ala Glu Tyr Tyr His Leu Leu Ala Glu Lys Ile Tyr Lys
435 440 445

30 Ile Gln Lys Glu Leu Glu Glu Lys Arg Arg Thr Arg Leu Gln Lys Gln
450 455 460

35 Asn Met Leu Pro Asn Ala Ala Gly Met Val Pro Val Ser Met Asn Pro
465 470 475 480

40

45 Gly Pro Asn Met Gly Gln Pro Gln Pro Gly Met Thr Ser Asn Gly Pro
485 490 495

50 Leu Pro Asp Pro Ser Met Ile Arg Gly Ser Val Pro Asn Gln Met Met
500 505 510

55 <210> 2
<211> 2414
<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 362 915 A1

<400> 2

5	Met	Ala	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Lys	Arg	Pro
	1			5					10						15	
10	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Gly	Thr	Asp
				20					25					30		
15	Phe	Gly	Ser	Leu	Phe	Asp	Leu	Glu	His	Asp	Leu	Pro	Asp	Glu	Leu	Ile
			35					40					45			
20	Asn	Ser	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu	Thr	Asn	Gly	Gly	Asp	Ile	Asn	Gln	Leu
		50					55					60				
30	Gln	Thr	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Lys	His	Lys	Gln
	65					70					75					80
35	Leu	Ser	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Met	Gly
					85					90					95	
40	Val	Gly	Gly	Pro	Gly	Gln	Val	Met	Ala	Ser	Gln	Ala	Gln	Gln	Ser	Ser
				100					105					110		
45	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Ile	Asn	Ser	Met	Val	Lys	Ser	Pro	Met	Thr	Gln
			115						120					125		
50	Ala	Gly	Leu	Thr	Ser	Pro	Asn	Met	Gly	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Pro	Asn
		130						135				140				
55	Gln	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Met	Met	Asn	Ser	Pro	Val	Asn	Gln
	145					150					155					160
60																
65																

ES 2 362 915 A1

Pro Ala Met Gly Met Asn Thr Gly Thr Asn Ala Gly Met Asn Pro Gly
165 170 175

5

Met Leu Ala Ala Gly Asn Gly Gln Gly Ile Met Pro Asn Gln Val Met
180 185 190

10

Asn Gly Ser Ile Gly Ala Gly Arg Gly Arg Gln Asp Met Gln Tyr Pro
195 200 205

15

20

Asn Pro Gly Met Gly Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Glu Pro Leu Gln
210 215 220

25

Gln Gly Ser Pro Gln Met Gly Gly Gln Thr Gly Leu Arg Gly Pro Gln
225 230 235 240

30

Pro Leu Lys Met Gly Met Met Asn Asn Pro Asn Pro Tyr Gly Ser Pro
245 250 255

35

40

Tyr Thr Gln Asn Pro Gly Gln Gln Ile Gly Ala Ser Gly Leu Gly Leu
260 265 270

45

Gln Ile Gln Thr Lys Thr Val Leu Ser Asn Asn Leu Ser Pro Phe Ala
275 280 285

50

Met Asp Lys Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Met Pro Asn Met Gly Gln
290 295 300

55

60

Gln Pro Ala Pro Gln Val Gln Gln Pro Gly Leu Val Thr Pro Val Ala
305 310 315 320

65

ES 2 362 915 A1

Gln Gly Met Gly Ser Gly Ala His Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg Lys
325 330 335

5

Leu Ile Gln Gln Gln Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys Gln
340 345 350

10

Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg Gln Cys Asn Leu Pro His
355 360 365

15

Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln Ser
370 375 380

20

Gly Lys Ser Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile Ile
385 390 395 400

25

Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu Pro
405 410 415

30

Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Arg Asn Gln Gln Pro Ile Leu Thr Gly
420 425 430

35

Ala Pro Val Gly Leu Gly Asn Pro Ser Ser Leu Gly Val Gly Gln Gln
435 440 445

40

Ser Ala Pro Asn Leu Ser Thr Val Ser Gln Ile Asp Pro Ser Ser Ile
450 455 460

45

Glu Arg Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Leu Pro Tyr Gln Val Asn Gln Met
465 470 475 480

50

65

ES 2 362 915 A1

5	Pro Thr Gln	Pro Gln Val	Gln Ala Lys	Asn Gln Gln	Asn Gln Gln	Pro
		485		490		495
10	Gly Gln Ser	Pro Gln Gly	Met Arg	Pro Met	Ser Asn Met	Ser Ala Ser
		500		505		510
15	Pro Met Gly	Val Asn Gly	Gly Val	Gly Val	Gln Thr	Pro Ser Leu Leu
		515		520		525
20	Ser Asp Ser	Met Leu His	Ser Ala Ile	Asn Ser	Gln Asn	Pro Met Met
	530		535		540	
25	Ser Glu Asn	Ala Ser Val	Pro Ser	Leu Gly	Pro Met	Pro Thr Ala Ala
	545		550		555	560
30	Gln Pro Ser	Thr Thr Gly	Ile Arg	Lys Gln	Trp His	Glu Asp Ile Thr
		565		570		575
35	Gln Asp Leu	Arg Asn His	Leu Val	His Lys	Leu Val	Gln Ala Ile Phe
		580		585		590
40	Pro Thr Pro	Asp Pro Ala	Ala Leu	Lys Asp	Arg Arg	Met Glu Asn Leu
		595		600		605
45	Val Ala Tyr	Ala Arg Lys	Val Glu	Gly Asp	Met Tyr	Glu Ser Ala Asn
	610		615		620	
50	Asn Arg Ala	Glu Tyr Tyr	His Leu	Leu Ala	Glu Lys	Ile Tyr Lys Ile
	625		630		635	640
55						
60						
65						

ES 2 362 915 A1

Gln Lys Glu Leu Glu Glu Lys Arg Arg Thr Arg Leu Gln Lys Gln Asn
645 650 655

5

Met Leu Pro Asn Ala Ala Gly Met Val Pro Val Ser Met Asn Pro Gly
660 665 670

10

Pro Asn Met Gly Gln Pro Gln Pro Gly Met Thr Ser Asn Gly Pro Leu
675 680 685

15

Pro Asp Pro Ser Met Ile Arg Gly Ser Val Pro Asn Gln Met Met Pro
690 695 700

20

Arg Ile Thr Pro Gln Ser Gly Leu Asn Gln Phe Gly Gln Met Ser Met
705 710 715 720

25

Ala Gln Pro Pro Ile Val Pro Arg Gln Thr Pro Pro Leu Gln His His
725 730 735

30

Gly Gln Leu Ala Gln Pro Gly Ala Leu Asn Pro Pro Met Gly Tyr Gly
740 745 750

35

Pro Arg Met Gln Gln Pro Ser Asn Gln Gly Gln Phe Leu Pro Gln Thr
755 760 765

40

Gln Phe Pro Ser Gln Gly Met Asn Val Thr Asn Ile Pro Leu Ala Pro
770 775 780

45

Ser Ser Gly Gln Ala Pro Val Ser Gln Ala Gln Met Ser Ser Ser Ser
785 790 795 800

50

55

60

65

ES 2 362 915 A1

	Cys	Pro	Val	Asn	Ser	Pro	Ile	Met	Pro	Pro	Gly	Ser	Gln	Gly	Ser	His
				805					810					815		
5																
	Ile	His	Cys	Pro	Gln	Leu	Pro	Gln	Pro	Ala	Leu	His	Gln	Asn	Ser	Pro
10				820					825					830		
	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Pro	His	His	Thr	Pro	Pro	Ser
15			835					840					845			
	Ile	Gly	Ala	Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Ala	Pro	Val	Pro
20		850						855					860			
	Thr	Pro	Pro	Ala	Met	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Gln	Ala	Leu	His	Pro
30	865					870					875					880
	Pro	Pro	Arg	Gln	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Gln	Leu	Pro	Gln	Gln
35					885					890					895	
	Val	Gln	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Asp	Gln	Pro	Gln	Gln
40					900					905				910		
	Gln	Pro	Arg	Ser	Gln	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Val	Pro	Thr	Pro	Asn
50			915						920					925		
	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Ser	Gln	Pro	Ala
55		930					935						940			
	Val	Ser	Ile	Glu	Gly	Gln	Val	Ser	Asn	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr
60	945					950						955				960
65																

ES 2 362 915 A1

5
Glu Val Asn Ser Gln Ala Ile Ala Glu Lys Gln Pro Ser Gln Glu Val
965 970 975

10
Lys Met Glu Ala Lys Met Glu Val Asp Gln Pro Glu Pro Ala Asp Thr
980 985 990

15
Gln Pro Glu Asp Ile Ser Glu Ser Lys Val Glu Asp Cys Lys Met Glu
995 1000 1005

20
Ser Thr Glu Thr Glu Glu Arg Ser Thr Glu Leu Lys Thr Glu Ile
1010 1015 1020

25
Lys Glu Glu Glu Asp Gln Pro Ser Thr Ser Ala Thr Gln Ser Ser
1025 1030 1035

30
Pro Ala Pro Gly Gln Ser Lys Lys Lys Ile Phe Lys Pro Glu Glu
1040 1045 1050

35
Leu Arg Gln Ala Leu Met Pro Thr Leu Glu Ala Leu Tyr Arg Gln
1055 1060 1065

40
Asp Pro Glu Ser Leu Pro Phe Arg Gln Pro Val Asp Pro Gln Leu
1070 1075 1080

45
Leu Gly Ile Pro Asp Tyr Phe Asp Ile Val Lys Ser Pro Met Asp
1085 1090 1095

50
Leu Ser Thr Ile Lys Arg Lys Leu Asp Thr Gly Gln Tyr Gln Glu
1100 1105 1110

55

ES 2 362 915 A1

	Pro	Trp	Gln	Tyr	Val	Asp	Asp	Ile	Trp	Leu	Met	Phe	Asn	Asn	Ala	
		1115					1120					1125				
5																
	Trp	Leu	Tyr	Asn	Arg	Lys	Thr	Ser	Arg	Val	Tyr	Lys	Tyr	Cys	Ser	
10		1130					1135					1140				
	Lys	Leu	Ser	Glu	Val	Phe	Glu	Gln	Glu	Ile	Asp	Pro	Val	Met	Gln	
15		1145					1150					1155				
	Ser	Leu	Gly	Tyr	Cys	Cys	Gly	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe	Ser	Pro	Gln	
20		1160					1165					1170				
	Thr	Leu	Cys	Cys	Tyr	Gly	Lys	Gln	Leu	Cys	Thr	Ile	Pro	Arg	Asp	
25		1175					1180					1185				
	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Gln	Asn	Arg	Tyr	His	Phe	Cys	Glu	Lys	
30		1190					1195					1200				
	Cys	Phe	Asn	Glu	Ile	Gln	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Leu	Gly	Asp	Asp	
35		1205					1210					1215				
	Pro	Ser	Gln	Pro	Gln	Thr	Thr	Ile	Asn	Lys	Glu	Gln	Phe	Ser	Lys	
40		1220					1225					1230				
	Arg	Lys	Asn	Asp	Thr	Leu	Asp	Pro	Glu	Leu	Phe	Val	Glu	Cys	Thr	
45		1235					1240					1245				
	Glu	Cys	Gly	Arg	Lys	Met	His	Gln	Ile	Cys	Val	Leu	His	His	Glu	
50		1250					1255					1260				
55																
60																
65																

ES 2 362 915 A1

	Ile	Ile	Trp	Pro	Ala	Gly	Phe	Val	Cys	Asp	Gly	Cys	Leu	Lys	Lys
	1265						1270					1275			
5															
	Ser	Ala	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu	Asn	Lys	Phe	Ser	Ala	Lys	Arg	Leu
10	1280						1285					1290			
15	Pro	Ser	Thr	Arg	Leu	Gly	Thr	Phe	Leu	Glu	Asn	Arg	Val	Asn	Asp
	1295						1300					1305			
20	Phe	Leu	Arg	Arg	Gln	Asn	His	Pro	Glu	Ser	Gly	Glu	Val	Thr	Val
	1310						1315					1320			
25															
	Arg	Val	Val	His	Ala	Ser	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Val	Lys	Pro	Gly
30	1325						1330					1335			
35	Met	Lys	Ala	Arg	Phe	Val	Asp	Ser	Gly	Glu	Met	Ala	Glu	Ser	Phe
	1340						1345					1350			
40	Pro	Tyr	Arg	Thr	Lys	Ala	Leu	Phe	Ala	Phe	Glu	Glu	Ile	Asp	Gly
	1355						1360					1365			
45															
	Val	Asp	Leu	Cys	Phe	Phe	Gly	Met	His	Val	Gln	Glu	Tyr	Gly	Ser
50	1370						1375					1380			
55	Asp	Cys	Pro	Pro	Pro	Asn	Gln	Arg	Arg	Val	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Leu
	1385						1390					1395			
60	Asp	Ser	Val	His	Phe	Phe	Arg	Pro	Lys	Cys	Leu	Arg	Thr	Ala	Val
	1400						1405					1410			
65															

ES 2 362 915 A1

5	Tyr His	Glu Ile	Leu Ile	Gly Tyr	Leu Glu	Tyr Val	Lys Lys	Leu
	1415			1420				1425
10	Gly Tyr	Thr Thr	Gly His	Ile Trp	Ala Cys	Pro Pro	Ser Glu	Gly
	1430			1435				1440
15	Asp Asp	Tyr Ile	Phe His	Cys His	Pro Pro	Asp Gln	Lys Ile	Pro
	1445			1450				1455
20	Lys Pro	Lys Arg	Leu Gln	Glu Trp	Tyr Lys	Lys Met	Leu Asp	Lys
	1460			1465				1470
25	Ala Val	Ser Glu	Arg Ile	Val His	Asp Tyr	Lys Asp	Ile Phe	Lys
	1475			1480				1485
30	Gln Ala	Thr Glu	Asp Arg	Leu Thr	Ser Ala	Lys Glu	Leu Pro	Tyr
	1490			1495				1500
35	Phe Glu	Gly Asp	Phe Trp	Pro Asn	Val Leu	Glu Glu	Ser Ile	Lys
	1505			1510				1515
40	Glu Leu	Glu Gln	Glu Glu	Glu Glu	Glu Arg	Lys Arg	Glu Glu	Asn Thr
	1520			1525				1530
45	Ser Asn	Glu Ser	Thr Asp	Val Thr	Lys Gly	Asp Ser	Lys Asn	Ala
	1535			1540				1545
50	Lys Lys	Lys Asn	Asn Lys	Lys Thr	Ser Lys	Asn Lys	Ser Ser	Leu
	1550			1555				1560
55								
60								
65								

ES 2 362 915 A1

	Ser Arg	Gly Asn	Lys Lys	Lys	Pro Gly	Met Pro	Asn Val	Ser Asn
	1565			1570			1575	
5								
	Asp Leu	Ser Gln	Lys Leu	Tyr	Ala Thr	Met Glu	Lys His	Lys Glu
10	1580			1585			1590	
15	Val Phe	Phe Val	Ile Arg	Leu	Ile Ala	Gly Pro	Ala Ala	Asn Ser
	1595			1600			1605	
20	Leu Pro	Pro Ile	Val Asp	Pro	Asp Pro	Leu Ile	Pro	Cys Asp
25	1610			1615			1620	Leu
30	Met Asp	Gly Arg	Asp Ala	Phe	Leu Thr	Leu Ala	Arg	Asp Lys
	1625			1630			1635	His
35	Leu Glu	Phe Ser	Ser Leu	Arg	Arg Ala	Gln Trp	Ser	Thr Met
	1640			1645			1650	Cys
40	Met Leu	Val Glu	Leu His	Thr	Gln Ser	Gln Asp	Arg	Phe Val
	1655			1660			1665	Tyr
45								
50	Thr Cys	Asn Glu	Cys Lys	His	His Val	Glu Thr	Arg	Trp His
	1670			1675			1680	Cys
55	Thr Val	Cys Glu	Asp Tyr	Asp	Leu Cys	Ile Thr	Cys	Tyr Asn
	1685			1690			1695	Thr
60	Lys Asn	His Asp	His Lys	Met	Glu Lys	Leu Gly	Leu	Gly Leu
	1700			1705			1710	Asp
65								

ES 2 362 915 A1

5	Asp Glu	Ser Asn Asn	Gln Gln	Ala Ala Ala	Thr Gln	Ser Pro Gly	
	1715		1720		1725		
10	Asp Ser	Arg Arg	Leu Ser	Ile Gln	Arg Cys	Ile Gln	Ser Leu Val
	1730		1735			1740	
15	His Ala	Cys Gln	Cys Arg	Asn Ala	Asn Cys	Ser Leu	Pro Ser Cys
	1745		1750			1755	
20	Gln Lys	Met Lys	Arg Val	Val Gln	His Thr	Lys Gly	Cys Lys Arg
	1760		1765			1770	
25	Lys Thr	Asn Gly	Gly Cys	Pro Ile	Cys Lys	Gln Leu	Ile Ala Leu
	1775		1780			1785	
30	Cys Cys	Tyr His	Ala Lys	His Cys	Gln Glu	Asn Lys	Cys Pro Val
	1790		1795			1800	
35	Pro Phe	Cys Leu	Asn Ile	Lys Gln	Lys Leu	Arg Gln	Gln Gln Leu
	1805		1810			1815	
40	Gln His	Arg Leu	Gln Gln	Ala Gln	Met Leu	Arg Arg	Arg Met Ala
	1820		1825			1830	
45	Ser Met	Gln Arg	Thr Gly	Val Val	Gly Gln	Gln Gln	Gly Leu Pro
	1835		1840			1845	
50	Ser Pro	Thr Pro	Ala Thr	Pro Thr	Thr Pro	Thr Gly	Gln Gln Pro
	1850		1855			1860	
55							
60							
65							

ES 2 362 915 A1

	Thr	Thr	Pro	Gln	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr
	1865						1870					1875			
5															
	Pro	Pro	Asn	Ser	Met	Pro	Pro	Tyr	Leu	Pro	Arg	Thr	Gln	Ala	Ala
10	1880						1885					1890			
	Gly	Pro	Val	Ser	Gln	Gly	Lys	Ala	Ala	Gly	Gln	Val	Thr	Pro	Pro
15	1895						1900					1905			
	Thr	Pro	Pro	Gln	Thr	Ala	Gln	Pro	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro
20	1910						1915					1920			
	Thr	Ala	Val	Glu	Met	Ala	Met	Gln	Ile	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Thr
25	1925						1930					1935			
	Gln	Arg	Gln	Met	Ala	His	Val	Gln	Ile	Phe	Gln	Arg	Pro	Ile	Gln
30	1940						1945					1950			
	His	Gln	Met	Pro	Pro	Met	Thr	Pro	Met	Ala	Pro	Met	Gly	Met	Asn
35	1955						1960					1965			
	Pro	Pro	Pro	Met	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Gly	His	Leu	Glu	Pro	Gly
40	1970						1975					1980			
	Met	Gly	Pro	Thr	Gly	Met	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Trp	Ser	Gln	Gly
45	1985						1990					1995			
	Gly	Leu	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Leu	Gln	Ser	Gly	Met	Pro	Arg	Pro
50	2000						2005					2010			
55															
60															
65															

ES 2 362 915 A1

Ala Met Met Ser Val Ala Gln His Gly Gln Pro Leu Asn Met Ala
2015 2020 2025

5

Pro Gln Pro Gly Leu Gly Gln Val Gly Ile Ser Pro Leu Lys Pro
2030 2035 2040

10

Gly Thr Val Ser Gln Gln Ala Leu Gln Asn Leu Leu Arg Thr Leu
2045 2050 2055

15

Arg Ser Pro Ser Ser Pro Leu Gln Gln Gln Gln Val Leu Ser Ile
2060 2065 2070

20

Leu His Ala Asn Pro Gln Leu Leu Ala Ala Phe Ile Lys Gln Arg
2075 2080 2085

25

Ala Ala Lys Tyr Ala Asn Ser Asn Pro Gln Pro Ile Pro Gly Gln
2090 2095 2100

30

Pro Gly Met Pro Gln Gly Gln Pro Gly Leu Gln Pro Pro Thr Met
2105 2110 2115

35

Pro Gly Gln Gln Gly Val His Ser Asn Pro Ala Met Gln Asn Met
2120 2125 2130

40

Asn Pro Met Gln Ala Gly Val Gln Arg Ala Gly Leu Pro Gln Gln
2135 2140 2145

45

Gln Pro Gln Gln Gln Leu Gln Pro Pro Met Gly Gly Met Ser Pro
2150 2155 2160

50

65

ES 2 362 915 A1

	Gln Ala	Gln Gln	Met Asn	Met Asn	His Asn	Thr Met	Pro Ser	Gln
	2165			2170		2175		
5								
	Phe Arg	Asp Ile	Leu Arg	Arg	Gln Gln	Met Met	Gln Gln	Gln Gln
10	2180			2185		2190		
15	Gln Gln	Gly Ala	Gly Pro	Gly Ile	Gly Pro	Gly Met	Ala Asn	His
	2195			2200		2205		
20	Asn Gln	Phe Gln	Gln Pro	Gln Gly	Val Gly	Tyr Pro	Pro Gln	Pro
	2210			2215		2220		
25								
	Gln Gln	Arg Met	Gln His	His Met	Gln Gln	Met Gln	Gln Gly	Asn
30	2225			2230		2235		
35	Met Gly	Gln Ile	Gly Gln	Leu Pro	Gln Ala	Leu Gly	Ala Glu	Ala
	2240			2245		2250		
40	Gly Ala	Ser Leu	Gln Ala	Tyr Gln	Gln Arg	Leu Leu	Gln Gln	Gln
	2255			2260		2265		
45								
	Met Gly	Ser Pro	Val Gln	Pro Asn	Pro Met	Ser Pro	Gln Gln	His
50	2270			2275		2280		
55	Met Leu	Pro Asn	Gln Ala	Gln Ser	Pro His	Leu Gln	Gly Gln	Gln
	2285			2290		2295		
60	Ile Pro	Asn Ser	Leu Ser	Asn Gln	Val Arg	Ser Pro	Gln Pro	Val
	2300			2305		2310		
65								

ES 2 362 915 A1

Pro Ser Pro Arg Pro Gln Ser Gln Pro Pro His Ser Ser Pro Ser
2315 2320 2325

5

Pro Arg Met Gln Pro Gln Pro Ser Pro His His Val Ser Pro Gln
2330 2335 2340

10

Thr Ser Ser Pro His Pro Gly Leu Val Ala Ala Gln Ala Asn Pro
2345 2350 2355

15

Met Glu Gln Gly His Phe Ala Ser Pro Asp Gln Asn Ser Met Leu
2360 2365 2370

20

Ser Gln Leu Ala Ser Asn Pro Gly Met Ala Asn Leu His Gly Ala
2375 2380 2385

25

Ser Ala Thr Asp Leu Gly Leu Ser Thr Asp Asn Ser Asp Leu Asn
2390 2395 2400

30

Ser Asn Leu Ser Gln Ser Thr Leu Asp Ile His
2405 2410

35

40

45

<210> 3
<211> 512
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 3

55

Met Asn Gly Ser Ile Gly Ala Gly Arg Gly Arg Gln Asp Met Gln Tyr
1 5 10 15

60

Pro Asn Pro Gly Met Gly Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Glu Pro Leu

65

ES 2 362 915 A1

20	25	30
5	Gln Gln Gly Ser Pro Gln Met Gly Gly Gln Thr Gly Leu Arg Gly Pro	
	35	40
10		
	Gln Pro Leu Lys Met Gly Met Met Asn Asn Pro Asn Pro Tyr Gly Ser	
15	50	55
		60
20	Pro Tyr Thr Gln Asn Pro Gly Gln Gln Ile Gly Ala Ser Gly Leu Gly	
	65	70
		75
25		
	Leu Gln Ile Gln Thr Lys Thr Val Leu Ser Asn Asn Leu Ser Pro Phe	
	85	90
		95
30		
	Ala Met Asp Lys Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Met Pro Asn Met Gly	
35	100	105
		110
40	Gln Gln Pro Ala Pro Gln Val Gln Gln Pro Gly Leu Val Thr Pro Val	
	115	120
		125
45		
	Ala Gln Gly Met Gly Ser Gly Ala His Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg	
	130	135
		140
50		
	Lys Leu Ile Gln Gln Gln Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys	
55	145	150
		155
60	Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg Gln Cys Asn Leu Pro	
	165	170
		175
65		
	His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln	

ES 2 362 915 A1

180	185	190
5	Ala Gly Lys Ser Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile	
	195	200
10	Ile Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu	
	210	215
15		220
20	Pro Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Arg Asn Gln Gln Pro Ile Leu Thr	
	225	230
		235
25	Gly Ala Pro Val Gly Leu Gly Asn Pro Ser Ser Leu Gly Val Gly Gln	
	245	250
		255
30		
35	Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ser Thr Val Ser Gln Ile Asp Pro Ser Ser	
	260	265
		270
40	Ile Glu Arg Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Leu Pro Tyr Gln Val Asn Gln	
	275	280
		285
45		
50	Met Pro Thr Gln Pro Gln Val Gln Ala Lys Asn Gln Gln Asn Gln Gln	
	290	295
		300
55	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Gly Met Arg Pro Met Ser Asn Met Ser Ala	
	305	310
		315
60	Ser Pro Met Gly Val Asn Gly Gly Val Gly Val Gln Thr Pro Ser Leu	
	325	330
		335
65	Leu Ser Asp Ser Met Leu His Ser Ala Ile Asn Ser Gln Asn Pro Met	

ES 2 362 915 A1

340	345	350
5	Met Ser Glu Asn Ala Ser Val Pro Ser Leu Gly Pro Met Pro Thr Ala	
	355	360
10	Ala Gln Pro Ser Thr Thr Gly Ile Arg Lys Gln Trp His Glu Asp Ile	
	370	375
15		380
20	Thr Gln Asp Leu Arg Asn His Leu Val His Lys Leu Val Gln Ala Ile	
	385	390
		395
		400
25	Phe Pro Thr Pro Asp Pro Ala Ala Leu Lys Asp Arg Arg Met Glu Asn	
		405
		410
		415
30	Leu Val Ala Tyr Ala Arg Lys Val Glu Gly Asp Met Tyr Glu Ser Ala	
	420	425
		430
35		
40	Asn Asn Arg Ala Glu Tyr Tyr His Leu Leu Ala Glu Lys Ile Tyr Lys	
	435	440
		445
45	Ile Gln Lys Glu Leu Glu Glu Lys Arg Arg Thr Arg Leu Gln Lys Gln	
	450	455
		460
50		
55	Asn Met Leu Pro Asn Ala Ala Gly Met Val Pro Val Ser Met Asn Pro	
	465	470
		475
		480
60	Gly Pro Asn Met Gly Gln Pro Gln Pro Gly Met Thr Ser Asn Gly Pro	
	485	490
		495
65	Leu Pro Asp Pro Ser Met Ile Arg Gly Ser Val Pro Asn Gln Met Met	
	500	505
		510

ES 2 362 915 A1

<210> 4

<211> 512

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

10

Met Asn Gly Ser Ile Gly Ala Gly Arg Gly Arg Gln Asp Met Gln Tyr
1 5 10 15

15

Pro Asn Pro Gly Met Gly Ser Ala Gly Asn Leu Leu Thr Glu Pro Leu
 20 25 30

20

Gln Gln Gly Ser Pro Gln Met Gly Gly Gln Thr Gly Leu Arg Gly Pro
 35 40 45

25

30

Gln Pro Leu Lys Met Gly Met Met Asn Asn Pro Asn Pro Tyr Gly Ser
 50 55 60

35

Pro Tyr Thr Gln Asn Pro Gly Gln Gln Ile Gly Ala Ser Gly Leu Gly
65 70 75 80

40

Leu Gln Ile Gln Thr Lys Thr Val Leu Ser Asn Asn Leu Ser Pro Phe
 85 90 95

45

50

Ala Met Asp Lys Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Met Pro Asn Met Gly
 100 105 110

55

Gln Gln Pro Ala Pro Gln Val Gln Gln Pro Gly Leu Val Thr Pro Val
 115 120 125

60

65

ES 2 362 915 A1

Ala Gln Gly Met Gly Ser Gly Ala His Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg
130 135 140

5

Lys Leu Ile Gln Gln Gln Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys
10 145 150 155 160

15 Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg Gln Cys Asn Leu Pro
165 170 175

20

His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln
180 185 190

25

Asp Gly Lys Ser Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile
30 195 200 205

35 Ile Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu
210 215 220

40

Pro Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Arg Asn Gln Gln Pro Ile Leu Thr
225 230 235 240

45

Gly Ala Pro Val Gly Leu Gly Asn Pro Ser Ser Leu Gly Val Gly Gln
50 245 250 255

55 Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ser Thr Val Ser Gln Ile Asp Pro Ser Ser
260 265 270

60

Ile Glu Arg Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Leu Pro Tyr Gln Val Asn Gln
275 280 285

65

ES 2 362 915 A1

5	Met	Pro	Thr	Gln	Pro	Gln	Val	Gln	Ala	Lys	Asn	Gln	Gln	Asn	Gln	Gln
		290					295					300				
10	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Gly	Met	Arg	Pro	Met	Ser	Asn	Met	Ser	Ala
	305					310					315					320
15	Ser	Pro	Met	Gly	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Gly	Val	Gln	Thr	Pro	Ser	Leu
					325					330					335	
20	Leu	Ser	Asp	Ser	Met	Leu	His	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Gln	Asn	Pro	Met
				340					345					350		
25	Met	Ser	Glu	Asn	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Leu	Gly	Pro	Met	Pro	Thr	Ala
			355					360					365			
30	Ala	Gln	Pro	Ser	Thr	Thr	Gly	Ile	Arg	Lys	Gln	Trp	His	Glu	Asp	Ile
	370						375					380				
35	Thr	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Val	His	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Ile
	385					390					395					400
40	Phe	Pro	Thr	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Met	Glu	Asn
					405					410					415	
45	Leu	Val	Ala	Tyr	Ala	Arg	Lys	Val	Glu	Gly	Asp	Met	Tyr	Glu	Ser	Ala
				420					425				430			
50	Asn	Asn	Arg	Ala	Glu	Tyr	Tyr	His	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Tyr	Lys
			435					440					445			
55																
60																
65																

ES 2 362 915 A1

Ile Gln Lys Glu Leu Glu Glu Lys Arg Arg Thr Arg Leu Gln Lys Gln
450 455 460

5

Asn Met Leu Pro Asn Ala Ala Gly Met Val Pro Val Ser Met Asn Pro
465 470 475 480

10

Gly Pro Asn Met Gly Gln Pro Gln Pro Gly Met Thr Ser Asn Gly Pro
485 490 495

15

Leu Pro Asp Pro Ser Met Ile Arg Gly Ser Val Pro Asn Gln Met Met
500 505 510

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030004

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.01.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SNOWDEN, A.W. et al. "A novel transcriptional repression domain mediates p21WAF1/CIP1 induction of p300 transactivation". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 01.04.2000. Vol. 20, N.º. 8, páginas 2676-2686; todo el documento, especialmente Fig. 3.	1-21
A	WO 9528499 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.) 26.10.1995, todo el documento.	1-21

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
28.02.2011

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/47 (01.01.2006)

A61K38/17 (01.01.2006)

A01K67/027 (01.01.2006)

A61P37/00 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A01K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, PAJ, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en la variantes S193D de la SEQ ID nº 1. La SEQ ID nº 1 a su vez, es una proteína que corresponde a la secuencia 192-703 de la proteína p300. La variante S193D de la SEQ ID nº1, tiene la actividad transactivadora de la transcripción constitutivamente activada, Esta variante se utiliza en la preparación de composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades causadas por una inhibición de la actividad de las proteínas p300, NF-kB, NF-AT y/o c-jun.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SNOWDEN, A.W. et al. "A novel transcriptional repression domain mediates p21WAF1/CIP1 induction of p300 transactivation". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 01.04.2000. Vol. 20, Nº. 8, páginas 2676-2686; todo el documento, especialmente Fig. 3.	
D02	WO 9528499 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.) 26.10.1995, todo el documento.	

El documento D01, describe la obtención del derivado 192-703 de la proteína p300.

El documento D02, describe la secuencia de la proteína p300.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La variante de la SEQ ID nº 1 en la que el aminoácido de la posición 193 es Asp, es nueva y tiene actividad inventiva. Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal como se contempla en las reivindicaciones. Por tanto, el objeto de la presente solicitud, cumple los requisitos de novedad, actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.