

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 261**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)
C07K 5/04 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07760350 .4**
96 Fecha de presentación: **09.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2002259**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **Moduladores de PDZ Disheveled**

30 Prioridad:
10.04.2006 US 790673 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
COSTA, Mike;
SIDHU, Sachdev S. y
ZHANG, Yingnan

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 385 261 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moduladores de PDZ Disheveled.

5 SOLICITUD RELACIONADA

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de y el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con N° de Serie 60/790673, presentada el 10 de abril de 2006.

10 CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y la regulación del crecimiento celular. Más específicamente, la invención se refiere a moduladores de la ruta de señalización de wnt, y a los usos de dichos moduladores.

15

ANTECEDENTES

[0003] Las rutas de señalización de wnt son esenciales para el desarrollo y se han implicado en la tumorigénesis [1]. Véanse también Reya & Clevers, Nature (2005), 434: 843-850; Logan & Nusse, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (2004), 20: 781-810; y documento US 2004/0247593. Las proteínas Disheveled (Dvl) son proteínas estructurales que juegan un papel central en las rutas de señalización de Wnt tanto generales como no generales [2]. Véase también Wallingford & Habas, Development (2005), 132:4421-4436. Las proteínas Dvl están compuestas por un dominio DIX con extremo N un dominio PDZ normal, y un dominio DEP con extremo C. De estos tres, el dominio PDZ juega el papel más importante en la transducción de la señal de Wnt. De los 20 ligandos naturales que se ha notificado como unidos al dominio PDZ de Dvl (a partir de ahora en la presente memoria descriptiva "DvlPDZ" o "PDZ de Dvl") [2-6], la mayor parte de los éstos se ha señalado como biológicamente fundamental para las rutas generales o no generales de señalización de Wnt. Se ha notificado, por ejemplo, que la unión directa de DvlPDZ a una secuencia interna en la región terminal de Frizzled juega un papel importante en la ruta de señalización de Wnt [3]. La expresión en exceso de Dvl hace de Dvl una diana farmacológica para el tratamiento del cáncer. Se han hecho esfuerzos para desarrollar antagonistas específicos de DvlPDZ basándose en el ligando peptídico derivado de Dapper y Frizzled [9]. Sin embargo, la molécula pequeña que se identificó según se ha informado se une a DvlPDZ con afinidad muy baja ($K_i = 237 \mu\text{M}$), y no se ha resuelto completamente la eficacia *in vivo*. Se han descrito otros ligandos del dominio PDZ, por ejemplo, en el documento WO 2003/004604, [12] y [14]

[0004] Las importantes funciones celulares adscritas a Dvl, en particular aquellas mediadas a través de la interacción proteína-proteína entre DvlPDZ y su(s) ligando(s), sugieren que DvlPDZ representa una significativa diana terapéutica. Sería por tanto beneficioso elucidar los aspectos mecanicistas de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl y proporcionar composiciones y procedimientos dirigidos a modular sus actividades funcionales asociadas. La presente invención proporciona este y otros beneficios.

40

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0005] Las rutas de señalización de Wnt tienen importantes papeles biológicos, y su perturbación se ha implicado en diversos cánceres. La presente invención proporciona composiciones y procedimientos de uso de estas composiciones para modular la actividad del dominio PDZ de la proteína Dvl tal como se define en las reivindicaciones. Debido a las importantes funciones asociadas con la Dvl, las composiciones y procedimientos de la invención presentan utilidades clínicas significativas. La invención está basada en parte en el extenso análisis y caracterización de las moléculas de enlace (ligandos) de PDZ de Dvl, dicho análisis da como resultado hallazgos novedosos e inesperados tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

50

[0006] Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, se ha identificado una serie de ligandos peptídicos ceñidos al dominio PDZ de Dvl usando una biblioteca de péptidos con extremo C expresada en fagos. Además de los ligandos cuyo motivo de unión comprende un grupo carboxilo libre necesario, los resultados descritos en la presente memoria descriptiva demuestran que un subconjunto de ligandos de PDZ de Dvl que carecen de un extremo carboxilo libre son sorprendentemente capaces de unirse a PDZ de Dvl. Los ligandos que carecen de un extremo carboxilo libre representan un extremo N y/o secuencias internas del ligando de PDZ de Dvl que constituyen secuencias con extremo N o secuencias internas de polipéptidos. La caracterización de los ligandos dio como resultado la identificación de motivos de unión únicos que se piensa que confieren a las moléculas afinidad de unión mejorada por PDZ de Dvl. Los ligandos a modo de ejemplo que se describen en la presente memoria descriptiva son

55

útiles para seleccionar los moduladores de la ruta de wnt mediante la modulación de la actividad del PDZ de Dvl. Además, dichos ligandos y sus derivados son por sí mismos pequeñas moléculas candidatas a fármacos para tratar las dolencias patológicas asociadas con la desregulación de las rutas de señalización de Wnt.

5 **[0007]** En un aspecto, la invención proporciona moléculas capaces de unirse específicamente a PDZ de Dvl tal como se define en las reivindicaciones. Estas moléculas son útiles en una variedad de contextos, por ejemplo, como moduladores de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl. Por ejemplo, la invención proporciona moléculas moduladoras que tienen características que imitan las características de los aglutinantes de alta, baja o moderada afinidad de PDZ de Dvl. En una realización, la invención proporciona un polipéptido aislado (por ejemplo, un
10 polipéptido tal como se define a partir de ahora en la presente memoria descriptiva, que incluye específicamente moléculas peptídicas) que se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo C que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia con Gly en la posición -2, Trp en la posición -1, Phe o Leu en la posición 0, y un resto hidrófobo o aromático en la posición -3, en el que la numeración de los aminoácidos está basada en el resto con extremo C que está en la posición 0 tal como se define en las
15 reivindicaciones. En una realización, la posición -6 en dicha región con extremo C es Trp.

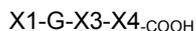
[0008] Se describe en la presente memoria descriptiva un polipéptido aislado (por ejemplo, un polipéptido tal como se define a partir de ahora en la presente memoria descriptiva, que incluye específicamente moléculas peptídicas) que se unen específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con
20 extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de un motivo de unión que comprende Gly-Trp-[Ile o Val]-X1-X2-X3-X4 o Tyr-Gly-Trp-[Ile o Val]-X1-X2-X3-X4, en el que Gly es tanto un resto con extremo N como interno, respectivamente, y X1, X2, X3 y/o X4 son restos internos. En un ejemplo, X1-X2-X3 es G-G-G. En un ejemplo, X1-X2-X3-X4 es D-G-G-G. En un ejemplo, la Tyr está precedida en el extremo N por Asp.

25 **[0009]** Se describe también en la presente memoria descriptiva un polipéptido aislado (por ejemplo, un polipéptido tal como se define a partir de ahora en la presente memoria descriptiva, que incluye específicamente moléculas peptídicas) que se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de un motivo de unión que comprende
30 Trp-[Ser o Thr]-Asp-[Ile o Phe o Leu]-Pro, en el que el Trp es tanto un resto con extremo N como interno, y la Pro es un resto interno. En un ejemplo, el trp está precedido en el extremo N por X1 y/o X2 (es decir, X1-X2-Trp), en el que X1 es Leu o Val y X2 es Leu. En un ejemplo, un polipéptido aislado (por ejemplo, un polipéptido tal como se define a partir de ahora en la presente memoria descriptiva, que incluye específicamente moléculas peptídicas) se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo N o interna que
35 comprende, consta, o consiste esencialmente de un motivo de unión que comprende Trp-[Ile o Val]-Asp-Gly-Pro, en el que el Trp es tanto un resto con extremo N como interno, y la Pro es un resto interno. En un ejemplo, el Trp está precedido en el extremo N por X1 y/o X2 (es decir, X1-X2-Trp), en el que X1 es Glu y X2 es Thr, Val, Met, arg, Ile o Gln.

[0010] En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado que se une específicamente a PDZ de Dvl
40 con una afinidad de unión de la $Cl_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ o mejor. En una realización, la afinidad de unión es $Cl_{50} = 1,2 \mu\text{M}$ o mejor. En una realización, la afinidad de unión es $Cl_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ o mejor. En una realización, la afinidad de unión es $Cl_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ o mejor. En una realización la afinidad de unión es $Cl_{50} = 0,6 \mu\text{M}$ o mejor. En una realización, la afinidad de unión es $Cl_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ o mejor. En una realización, la afinidad de unión es $Cl_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ o mejor. Las afinidades de unión se pueden medir mediante cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la
45 técnica. La afinidad de unión Cl_{50} de los polipéptidos de la invención se determina como la concentración promedio de un polipéptido que bloquea aproximadamente el 50% de la unión a PDZ de Dvl a un ligando peptídico inmovilizado de alta afinidad en un análisis ELISA competitivo (por ejemplo, tal como describen Sidhu y col., Methods Enzymol. (2000), 328: 333-363, y en los siguientes Ejemplos, en los que se utiliza KWYGWL_{-COOH} como un ligando peptídico de alta afinidad). En una realización, un polipéptido de la invención inhibe la interacción de PDZ de
50 Dvl con su molécula de unión, por ejemplo, la interacción de PDZ de Dvl con su molécula de unión en una célula.

[0011] En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido que se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo C que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia con la siguiente fórmula:

55



en la que X1 es Y; X3 es W; y X4 es F o L;

y en la que dicha secuencia no es una secuencia con extremo C que se produce naturalmente de una proteína humana tal como se define en las reivindicaciones.

En una realización, la secuencia comprende KWYGWL, en la que X1 es Y, X3 es W, y X4 es L. En una realización, dicha secuencia no es un ligando natural de Dvl tal como una ubiquitina proteína lipasa E3A humana (UBE3A).

[0012] En una realización, un polipéptido de la invención no comprende, consta, o consiste esencialmente de la secuencia YAKGFGML_{COOH}.

10 **[0013]** En una realización, la invención proporciona un polipéptido aislado que se une específicamente a PDZ de Dvl y comprende una región con extremo carboxilo que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de la Tabla 1 y la Figura 1A para las posiciones -5 a 0, o las posiciones -6 a 0, en el que la numeración de los aminoácidos está basada en el resto del extremo C que está en la posición 0 tal como se define en las reivindicaciones.

15

[0014] Se describe en la presente memoria descriptiva un polipéptido que se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia con la siguiente fórmula:

20 X1-G-X3-X4

en la que X1 es Y, C, L, F o S; X3 es W, M, F, L, V o Y; y X4 es I, V, M o L;

y en la que dicha secuencia no es una secuencia con extremo N o interna que se produce naturalmente de una proteína humana. En un ejemplo, X1 es Y, X3 es W, y/o X4 es I o V. En un ejemplo, X3 es Trp. En un ejemplo, X1 está precedido por D. En un ejemplo, dicha secuencia no es un ligando natural de Dvl tal como una ubiquitina proteína lipasa E3A humana (UBE3A).

25 **[0015]** Se describe también en la presente memoria descriptiva un polipéptido aislado que se une específicamente a PDZ de Dvl y comprende una región con extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de Tipo I y Tipo II que se muestran en la Figura 1B para las posiciones -9 a 0, -8 a 0, -7 a 0, -6 a 0, -5 a 0, en el que los números se refieren al orden de restos tal como se indica en la Figura 1B. En un ejemplo, dicha secuencia de aminoácidos incluye además un tripéptido, GGG, C terminal en el resto indicado para la posición 0 en la Figura 1B. En un ejemplo, dicha secuencia de aminoácidos incluye DGGG C terminal en el resto indicado para la posición 0 en la Figura 1B.

30 **[0016]** Se describe también en la presente memoria descriptiva un polipéptido que se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia con la siguiente fórmula:

40

X1-X2-W-X3-D-X4-P

en la que X1 y/o X2 es cualquier aminoácido que se produce naturalmente; X3 es S, T, A, W, D o I; y X4 es F, I, V, L o G;

45

y en el que dicha secuencia no es una secuencia con extremo N o interna que se produce naturalmente de una proteína humana. En un ejemplo, X3 es S o T; y X4 es I, F o L. En un ejemplo, X1 es L o V. En un ejemplo, X2 es L. En un ejemplo, la secuencia comprende GEIVLWSDIPG, en la que X1 es V, X2 es L, X3 es S, y X4 es I. En un ejemplo, dicha secuencia no es un ligando natural de Dvl tal como la ubiquitina proteína ligasa E3A humana (UBE3A).

50 **[0017]** Se describe también en la presente memoria descriptiva un polipéptido que se une específicamente a PDZ de Dvl, en el que dicho polipéptido comprende una región con extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia con la siguiente fórmula:

55

X1-X2-W-X3-D-X4-P

en la que X1 y/o X2 es cualquier aminoácido que se produce naturalmente; X3 es I, G, V, K o W, y X4 es G, S, Y o W;

y en el que dicha secuencia no es una secuencia con extremo N o interna que se produce naturalmente de una proteína humana. En un ejemplo, X3 es I o V; y X4 es G. En un ejemplo, X1 es E. En un ejemplo, X2 es T, V, M, R, I o Q. en un ejemplo, dicha secuencia no es un ligando natural de Dvl tal como la ubiquitina proteína ligasa E3A humana (UBE3A).

Se describe también en la presente memoria descriptiva un polipéptido aislado que se une específicamente a PDZ de Dvl y comprende una región con extremo N o interna que comprende, consta, o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de Tipo III y Tipo IV que se muestran en la Figura 1B para las posiciones -6 a 0, -5 a 0, en la que los números se refieren al orden de restos tal como se indica en la Figura 1B. En un ejemplo, dicha secuencia de aminoácidos incluye además uno o más de los restos indicados para la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6 y/o 7 en la Figure 1B (Tipo III y Tipo IV).

[0018] En una realización, los polipéptidos de la invención excluyen específicamente los polipéptidos aglutinantes de PDZ de Dvl que no presentan una característica deseable (tal como la afinidad de unión, por ejemplo, en la que un ejemplo de una característica deseable es la unión de moderada a alta afinidad) de un péptido aglutinante tal como se da a conocer en la presente memoria descriptiva (véase, por ejemplo, los Ejemplos). Por ejemplo, en una realización, un polipéptido de la invención no comprende la secuencia YAKGFGML en la que el resto con extremo C está carboxilado (es decir, si la secuencia está en un polipéptido de la invención) el resto con extremo C L no está carboxilado o tiene de otra manera un grupo carboxilo libre).

[0019] Se describe también en la presente memoria descriptiva un polipéptido aislado que comprende, consta o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos que compite con uno o más de los polipéptidos descritos anteriormente por la unión a PDZ de Dvl, y un polipéptido aislado que se une al mismo epítipo de PDZ de Dvl como uno o más de los polipéptidos descritos anteriormente.

[0020] Tal como se muestra en la presente memoria descriptiva, el dominio PDZ de Dvl1, Dvl2 y Dvl3 comparte una extensa homología de la secuencia, y los péptidos aglutinantes descritos en la presente memoria descriptiva son capaces de unirse a al menos uno, al menos dos, o al menos tres proteínas Dvl (1,2,3). En una realización un polipéptido de la invención interactúa con/se une a Dvl 1, 2 y/o 3 humanas.

[0021] En algunos contextos, la naturaleza del resto del extremo terminal en un polipéptido aglutinante puede afectar a la capacidad de unión de un polipéptido. De acuerdo con esto, un polipéptido de unión a PDZ de Dvl aislado puede comprender un resto de aminoácido en el extremo carboxilo que esta carboxilado. Un polipéptido de unión a PDZ de Dvl aislado puede comprender un resto de aminoácido en el extremo carboxilo que ha perdido un grupo carboxilo libre. Un polipéptido de unión a PDZ de Dvl aislado puede comprender un motivo de unión a PDZ que no comprende y/o requiere un grupo o resto carboxilo libre.

[0022] En un aspecto, un polipéptido de la invención comprende un polipéptido aglutinante de PDZ de Dvl unido a una entidad molecular que aumenta la entrada celular del polipéptido. En una realización, dicha entidad molecular comprende una etiqueta de la secuencia de aminoácidos, tal como la secuencia RQIKIWFQNRRMKWKK que en una realización está acetilada en el resto del extremo N. Por ejemplo, en una realización, un polipéptido de la invención comprende la siguiente secuencia:

(i) RQIKIWFQNRRMKWKKKWKYGWL y otras

(ii) RQIKIWFQNRRMKWKKGWKDYGWIDG,

(iii) RQIKIWFQNRRMKKGEIVLWSDIPG,

y (iv) RQIKIWFQNRRMKWKKGSGNEVWIDGPG que se describen en la presente memoria descriptiva

[0023] En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención (tal como se describe en la presente memoria descriptiva)

[0024] En otro aspecto, la invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un polinucleótido y/o polipéptido de la invención (tal como se describe en la presente memoria descriptiva).

[0025] En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende uno o más de los polipéptidos

de la invención tal como se define en las reivindicaciones (tal como se describe en la presente memoria descriptiva). En una realización, la composición comprende un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable.

5 **[0026]** En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende uno o más de los polipéptidos o polinucleótidos de la invención (tal como se describe en la presente memoria descriptiva). Cuando se proporcionan una o más moléculas moduladoras, se pueden proporcionar por separado o conjuntamente, siempre que estén en una formulación adecuada para el uso previsto. El kit puede comprender instrucciones para usar la composición.

10 **[0027]** En un aspecto, la invención proporciona moléculas moduladoras de Dvl que comprenden uno o más de los polipéptidos de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Estas moléculas moduladoras (que incluyen las de los polipéptidos de la invención comprendidos en la anterior) se pueden usar en una variedad de contextos, incluyendo, pero sin limitarse al uso como moléculas de referencia en la selección de moduladores de PDZ de Dvl, uso como moléculas diagnósticas, o uso como agentes terapéuticos.

15

[0028] Las moléculas moduladoras se pueden usar para fines diagnósticos. De acuerdo con esto, se describe en la presente memoria descriptiva un procedimiento de identificación de la desregulación de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto la muestra con un polipéptido de la invención para el cual una diferencia detectable es indicadora de la incidencia y/o cantidad de interacción entre el ligando y PDZ de Dvl en la muestra. Se puede medir la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl de una variedad de formas, por ejemplo, determinando la cantidad/extensión de la señalización de wnt (midiendo, por ejemplo uno o más episodios contracorriente de la función Dvl en la ruta wnt).

20 **[0029]** En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto capaz de modular la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una muestra que comprende:

(i) PDZ de Dvl, un fragmento funcional y/o uno de sus equivalentes,

30 (ii) uno o más de los polipéptidos de la invención como una referencia; y

(iii) un compuesto candidato;

y determinar la cantidad de interacción entre la referencia y PDZ de Dvl en presencia del compuesto candidato;

35

por lo que un cambio en la cantidad de interacción entre la referencia y PDZ de Dvl en presencia del compuesto candidato en comparación con la cantidad en ausencia del compuesto indica que el compuesto candidato es un compuesto capaz de modular la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl tal como se define en las reivindicaciones. En una realización, el compuesto es una pequeña molécula (tal como moléculas orgánicas, péptidos) o anticuerpo

40

[0030] Se describe también en la presente memoria descriptiva un procedimiento para diseñar racionalmente un modulador de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl que comprende diseñar el modulador para comprender o imitar la función de un péptido C terminal que comprende una secuencia con Gly en la posición -2, Trp o Tyr en la

45 posición -1, Phe o Leu en la posición 0, y un resto hidrófobo o aromático en la posición -3, en la que la numeración de los aminoácidos está basada en el resto del extremo C que está en la posición 0, en el que el modulador es capaz de unirse específicamente a PDZ de Dvl; o diseñar el modulador para comprender o imitar la función de un péptido N terminal o interno que comprende la secuencia Gly-Trp-[Ile o Val]-X1-X2-X3-X4 o Tyr-Crly-Trp-[Ile o Val]-X1-X2-X3-X4, en el que Gly es un resto tanto terminal como interno, respectivamente, y X1, X2, X3 y/o X4 son restos

50 internos. En un ejemplo X1-X2-X3 es dicha secuencia es G-G-G. En un ejemplo X1-X2-X3-X4 en dicha secuencia es D-G-G-G. En un ejemplo, la Tyr en dicha secuencia está precedida N-terminalmente por la Asp. En cualquiera de estos ejemplos, se diseña el modulador para ser capaz de unirse específicamente con PDZ de Dvl.

[0031] Se describe también en la presente memoria descriptiva es un procedimiento para diseñar racionalmente un modulador de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl que comprende diseñar el modulador para comprender o imitar la función de un péptido N terminal o interno que comprende la secuencia Trp-[Ser o Thr]-Asp-[Ile o Phe o Leu]-Pro, en la que Trp es tanto un resto con extremo N como interno, y la Pro es un resto interno. En un ejemplo, la Trp en dicha secuencia está precedida en el extremo N por X1 y/o X2 (es decir, X1-X2-Trp), en la que X1 es Leu o Val y X2 es Leu. En cualquiera de estos ejemplos, el modulador se diseña para ser capaz de unirse específicamente

a PDZ de Dvl.

- [0032]** Se describe también un procedimiento para diseñar racionalmente un modulador de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl que comprende diseñar el modulador para comprender o imitar la función de un péptido N terminal o interno que comprende la secuencia Trp-[Ile o Val]-Asp-Gly-Pro, en la que Trp es un resto tanto N terminal como interno, y la Pro es un resto interno. En un ejemplo, el Trp en dicha secuencia está precedido en el extremo N por X1 y/o X2 (es decir, X1-X2-Trp), en el que X1 es Glu y X2 es Thr, Val, Met, Arg, Ile o Gln. En cualquiera de estos ejemplos, el modulador se diseña para ser capaz de unirse específicamente a PDZ de Dvl.
- 10 **[0033]** En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de selección de un agente que modula la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl, en el que el procedimiento comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un agente candidato y poner en contacto dicho agente con una mezcla de reacción que comprende PDZ de Dvl y una molécula de unión conocida de dicho PDZ de Dvl (por ejemplo, un polipéptido de la invención), en el que dicha mezcla es una mezcla de células o una mezcla exenta de células, y el contacto se produce en condiciones adecuadas para la interacción entre la molécula de unión y PDZ de Dvl;
- (b) determinar la cantidad de interacción entre la molécula de unión y PDZ de Dvl en presencia y ausencia del agente;
- por lo cual, una diferencia entre la cantidad de interacción que se ha determinado en (b) en presencia y ausencia del agente indica que el agente es un modulador de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl. En una realización, el agente candidato es una pequeña molécula (tal como moléculas orgánicas, péptidos) o un anticuerpo (incluyendo sus fragmentos).
- [0034]** En los anteriores procedimientos, cuando sea apropiado, el ligando de PDZ en una muestra o mezcla de reacción puede ser un ligando que se produce naturalmente (por ejemplo, unos ligandos de PDZ de Dvl endógenos).
- [0035]** Los polipéptidos de la invención son útiles para una variedad de fines y en una variedad de escenarios en los que se desea la modulación de la señalización de wnt mediante la proteína Dvl. Por ejemplo, se puede usar un polipéptido de la invención para inhibir la señalización de Wnt mediada por Dvl, por ejemplo, en una célula, para alterar el curso de cualquier desorden asociado con la desregulación de la señalización de Wnt.
- [0036]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una dolencia patológica con la desregulación de la actividad de la proteína Dvl o wnt que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un modulador del ligando de PDZ de Dvl, en el que el modulador es capaz de modular la interacción entre PDZ de Dvl y un polipéptido de la invención. El modulador puede inhibir la interacción entre PDZ de Dvl y su molécula de unión (por ejemplo, una molécula de unión endógena). De acuerdo con la invención, dicho modulador del ligando de PDZ de Dvl comprende uno o más de los polipéptidos de la invención tal como se describe en la presente memoria descriptiva, y la dolencia patológica es cáncer, tal como se define en una de las reivindicaciones. La dolencia patológica puede ser un trastorno hiperproliferativo, o asociado con la desregulación de la ruta general de señalización de wnt. En una realización, la Dvl es Dvl 1, 2 y/o 3 humana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Péptidos de unión a PDZ de Dvl seleccionados de bibliotecas de expresión en fagos.

[0037] Se seleccionaron las secuencias de bibliotecas fusionadas al extremo C (A) o al extremo N (B) de una proteína revestida por el fago p8. Las posiciones en el ligando peptídico, desde el extremo C al extremo N, se designaron 0, -1, etc.

FIG. 2. (A) Alineación de la secuencia de los dominios PDZ de las Dvl 1, 2 y 3 humanas.

[0038] Las identidades están destacadas con un sombreado oscuro y las similitudes están destacadas con un sombreado gris.

FIG. 2. (B) El ligando peptídico de PDZ de Dvl puede interactuar *in vitro* con las proteínas 3 Dvl endógenas (es decir, 1, 2, 3).

[0039] Se preparó un lisado celular de células HEK293S y se normalizó la concentración de la proteína total a 1 mg/ml. Se unió GST o la proteína de fusión GST-DVLpep a glutatión Sefarosa-4B. Se incubaron las perlas que llevaban la proteína (2-10 µg) con extracto celular de células HEK293S durante la noche a 4°C. Se lavaron las perlas con tampón de lavado (PBS, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%) durante 10 veces y se volvieron a suspender en 5
 10 tampón de muestra SDS, se incubaron a 90°C durante 10 min y el sobrenadante se sometió a SDS-PAGE. El extracto de células brutas también se sometió al mismo SDS-PAGE. Las proteínas Dvl se sometieron a inmunotransferencia mediante anti-Dvll, anti-Dvl2 y anti-Dvl3.

Figura 3. (A) Los ligandos peptídicos de PDZ de Dvl, DVLp_C y Dvlp_N3, bloquearon significativamente el aumento estimulado por Wnt en la señalización de la β-catenina en células HEK293S.

[0040] Se transfectaron células HEK293S con el plásmido indicador pTOPGLOW combinado por el pRL indicador. Se preparó un extracto de células y se midió la actividad de la luciferasa. La unidad relativa de luciferasa (URL) es la actividad de la luciferasa TopGlow dividida por la actividad de la luciferasa Renila. El número de veces de activación 15
 es la relación URL entre las células estimuladas con Wnt3a y las células no estimuladas. Se trataron las células tanto con 10 µM (barra clara) como con 20 µM (barra oscura) de ligandos peptídicos.

Figura 3 (B) y (C). La inhibición del aumento estimulado por Wnt en la señalización de la β catenina en células HEK293S mediante Dvlp_C(B) y Dvlp_N3(C) fue dependiente de la dosis.

[0041] Se obtuvieron los datos mediante medidas en dos experimentos independientes.

Figura 3 (D) y (E). Los ligandos peptídicos de PDZ de Dvl, DVLp_C(D) y Dvlp_N3(E), redujeron el aumento estimulado por Wnt en el nivel de la proteína β catenina.

[0042] Se trataron células HEK293S con 20 µM de DVLp y PEN durante 24 horas. Se preparó un lisado celular y se sometió a SDS-PHAGE. Se transfirió β-catenina mediante anticuerpos policlonales dirigidos contra β catenina (Genentech, Inc., South San Francisco).

Figura 4. El ligando peptídico de PDZ de Dvl, DVLp_C, bloqueó el aumento estimulado por Wnt en la señalización de la β catenina en células NCI-H1703.

[0043] Se transfectaron células NCI-H 1703 con el plásmido indicador pTOPGLOW combinado con el pRL indicador. Se preparó un extracto de células y se midió la actividad de la luciferasa. La unidad relativa de luciferasa 35
 es la actividad de la luciferasa TopGlow dividida por la actividad de la luciferasa Renila. El número de veces de activación es la relación URL entre las células Wnt3a estimuladas y las células no estimuladas.

Figura 5 (A) El tratamiento del ligando de PDZ de Dvl redujo la viabilidad de las células NCI-H1703.

[0044] Se sembraron las células por triplicado en placas de 96 pocillos de paredes negras y se trataron con diversas dosis de péptido en el Día 0 y se incubaron a 37°C en un incubador húmedo con CO₂ al 5%. Después de 72 horas, se llevó a cabo la prueba Alamar Blue.

Figura 5 (B) El tratamiento del ligando de PDZ de Dvl suprimió el crecimiento celular de células NCI-H 1703.

[0045] Se sembraron las células en placas de 96 pocillos de paredes negras por triplicado y se trataron con 10 µM de péptido o DMSO en el Día 0, y se midió la viabilidad celular mediante la prueba Alamar Blue después de 24, 48 y 72 horas.

50 **MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION**

[0046] La invención proporciona moléculas, y procedimientos para identificar y usar moléculas, capaces de modular las interacciones de unión entre el dominio PDZ de las proteínas Dvl y su(s) molécula(s) de enlace celular(es). En un aspecto, estas moléculas están generadas con una estrategia combinatoria que da como resultado la identificación de péptidos aglutinantes capaces de unirse al PDZ de Dvl con diversas afinidades. La 55
 identificación de estas moléculas aglutinantes, y la dinámica estructural de la interacción de unión entre PDZ de Dvl y estos polipéptidos aglutinantes, tal como se describe extensamente en la presente memoria descriptiva, proporciona además un medio para identificar otros moduladores capaces de interactuar con PDZ de Dvl. A la luz de la importancia de Dvl en algunos procesos celulares y fisiológicos, estos moduladores serían de significativa utilidad,

tal como en escenarios profilácticos, terapéuticos y/o diagnósticos.

Técnicas generales

5 **[0047]** La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que se encuentran dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como en, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987, y en las actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988).

15 **[0048]** Se pueden generar oligonucleótidos, polinucleótidos, péptidos, polipéptidos y pequeñas moléculas empleadas o descritas en la presente invención usando las técnicas normalizadas conocidas en la materia.

Definiciones

20 **[0049]** "Secuencias control", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, son secuencias de ADN que permiten la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operable en un organismo hospedador concreto. Las secuencias control procarióticas incluyen promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

25 **[0050]** El ácido nucleico se "une de manera operable" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une de manera operable a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión a ribosoma se une de manera operable a una secuencia de codificación si se sitúa para facilitar la traducción. Generalmente, "unido de manera operable" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de una líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porqué ser contiguos.

30 **[0051]** Un polipéptido "activo", o sus fragmentos, retiene una actividad biológica del homólogo nativo o que se produce naturalmente del polipéptido activo. La actividad biológica se refiere a una función mediada por el homólogo nativo o que se produce naturalmente del polipéptido activo. Por ejemplo, la interacción de unión o proteína-proteína constituye una actividad biológica.

35 **[0052]** Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan de manera indistinta en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que presenten la actividad biológica deseada) y pueden incluir también algunos fragmentos de anticuerpos (tal como se describe en mayor en la presente memoria descriptiva).

40 **[0053]** Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

45 **[0054]** Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes tipos. Existen cinco tipos principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunos de estos pueden dividirse adicionalmente en subtipos (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgA-1, IgA-2, y etc. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a los diferentes tipos de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de los diferentes tipos de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas y col. Cellular and Mol. Immunology, 4^a ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

55 **[0055]** Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

[0056] "Fragmentos de anticuerpo" comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene preferiblemente al menos una, preferiblemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esta porción cuando están presentes en un anticuerpo intacto.

- [0057]** El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de sustancialmente anticuerpos homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único antígeno. Además, en contraste a las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.
- 10 **[0058]** Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria descriptiva incluyen específicamente los anticuerpos “quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica con u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenece a otro tipo o subtipo de anticuerpo, así como a los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 15 6851-6855 (1984)).
- [0059]** Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región hipervariable del receptor están sustituidos por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseada. En algunos ejemplos, los restos de la región de estructura (framework) (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante.
- 20 Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales véanse Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 30 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisiones y las referencias citadas anteriormente: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma. & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).
- 35 Un “anticuerpo humano” es el que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado utilizando cualquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos tal como se ha dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humano.
- 40 Un “anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en uno en una o más de sus CDR que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante transposiciones genéticas de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o los restos de la región de estructura se describe en: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813 (1994); y col. Gene 169: 147-155 (1995); Yelton y col. J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins y col, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).
- 50 Un “epítomo etiquetado” de un polipéptido se refiere a un polipéptido quimérico fusionado a un “polipéptido etiqueta”. Dichas etiquetas proporcionan epítomos contra los que se puede preparar o están disponibles los Ab, pero no interfieren sustancialmente con la actividad del polipéptido. Para reducir la actividad del anticuerpo dirigido contra la etiqueta con epítomos endógenos, el polipéptido etiqueta es normalmente único. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos, usualmente entre aproximadamente 8 y 50 55 restos de aminoácidos, preferiblemente entre 8 y 20 restos de aminoácidos. Los ejemplos de secuencias de epítomos etiquetas incluyen HA del virus de la gripe A, GD, y c-myc, poli-His y FLAG.

“Polinucleótido”, o “ácido nucleico” Tal como se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva, se refieren

a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen, pero no se limitan a, ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante la ADN o la ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura del nucleótido se puede impartir antes o después del montaje del polímero. La secuencia de nucleótido se puede interrumpir mediante componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como mediante conjugación con una etiqueta. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (caps; por sus siglas en inglés)", sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen naturalmente con un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, Fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos pendientes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácido nucleicos alfa anoméricos, etc.) así como formas no modificadas del(de los) polinucleótido(s). Además, puede estar sustituido cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegido mediante los grupos protectores habituales, o activado para preparar enlaces adicionales a los nucleótidos adicionales, o se puede conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituirse con restos de grupos terminales orgánicos o aminados de entre 1 a 20 átomos de carbono. Se pueden derivatizar también otros hidroxilos con grupos protectores habituales. Los polinucleótidos pueden contener también formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está sustituido por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitoato"), "(O)NR.sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2 ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C.) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los nucleótidos referidos en la presente memoria descriptiva, incluyendo ARN y ADN.

[0060] "Oligonucleótido", tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que tienen de manera general, pero no necesariamente, menos de 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La anterior descripción para los polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

[0061] El término "péptido" se refiere generalmente a una secuencia contigua y relativamente corta de aminoácidos unidos por enlaces peptídico. De manera normal, pero no necesariamente, un péptido tiene una longitud de aproximadamente 2 a 50 aminoácidos, 4-40 aminoácidos o 10-30 aminoácidos. Aunque el término "polipéptido" se refiere generalmente a formas más largas de un péptido, los dos términos pueden ser y se usan de manera indistinta en algunos contextos en la presente memoria descriptiva.

[0062] Una "región" de un polipéptido es una secuencia contigua de 2 o más aminoácidos. En otras realizaciones, una región tiene al menos cualquiera de 3, 5, 10, 15 aminoácidos contiguos.

[0063] "Región con extremo C", "secuencia con extremo C", y sus variaciones, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una secuencia de aminoácidos que está localizada en o en estrecha proximidad al extremo C (generalmente 3') de un polipéptido. Generalmente, la secuencia incluye un aminoácido que tiene un grupo carboxilo libre. En una realización, una región o secuencia con extremo C se refiere a una región de un polipéptido que incluye los aproximadamente 1-15 restos localizados más cerca del extremo C del polipéptido.

[0064] "Región con extremo N", "secuencia con extremo N", y sus variaciones, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una secuencia de aminoácidos que está localizada en o en estrecha proximidad al extremo N (generalmente 5') de un polipéptido. Generalmente, la secuencia incluye un aminoácido que tiene un grupo amino libre. En una realización, una región o secuencia con extremo N se refiere a una región de un polipéptido que incluye los aproximadamente 1-15 restos localizados más cerca del extremo N del polipéptido.

- [0065]** “Región interna”, “Secuencia interna”, y sus variaciones, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una secuencia de aminoácidos que está localizada en el interior de un polipéptido y está flanqueada en sus extremos N y C por uno o más aminoácidos que no son parte de la secuencia. Generalmente, las 5 secuencias no incluyen un aminoácido tanto con un grupo carboxilo como amino libre. En una realización, una región o secuencia interna se refiere a una región de un polipéptido que incluye los aproximadamente 1-15 restos localizados en el interior de un polipéptido, en el que la región no incluye tanto el aminoácido con extremo C como el aminoácido con extremo N.
- 10 **[0066]** Un “dominio PDZ” que se conoce también como RHD (región de homología DLG) o la repetición GLGF, es un dominio de proteína originalmente descrito como elementos estructurales conservados en la proteína de densidad postsináptica de 95 kDa (PSD-95), los discos grandes con actividad supresora de tumores de *Drosophila*, y las proteínas de unión estrecha de Zonula occludens-1 (ZO-1), que se encuentran en un gran y diverso conjunto de 15 proteínas, que incluye las proteínas Dvl. Los dominios PDZ se unen generalmente a secuencias peptídicas carboxiterminales cortas localizadas en el extremo carboxiterminal de las proteínas interactuantes. Normalmente, los dominios PDZ comprenden dos hélices α y seis láminas β .
- [0067]** El “dominio RDZ de Dvl” “PDZ de Dvl”, y sus variaciones, se refiere a parte o a todas las secuencias de la SEQ ID NO: 1, 2 y 3 (Figura 2) que está implicado directa o indirectamente en las interacciones celulares del ligando 20 de PDZ de Dvl. “PDZ de Dvl” se refiere al dominio PDZ de Dvl1; “PDZ de Dvl2” se refiere al dominio PDZ de Dvl2; y “PDZ de Dvl3” se refiere al dominio PDZ de Dvl3.
- [0068]** El término “Dishevelled” o “Dvl” se refiere a un miembro de una familia de las proteínas Dishevelled, las secuencias de longitud completa de las que posee normalmente tres dominios conservados, un dominio DIX, 25 presente en la proteína Axin antagonizante de Wnt; un dominio PDC implicado en las interacciones proteína-proteína, y un dominio DEP, que se encuentra en las proteínas que regulan las Rho GTPasas. Las proteínas Dvl incluyen, por ejemplo, Dvl-1, Dvl-2, y Dvl-3. El ácido nucleico y la secuencia de la proteína Dvl se conocen de una variedad de especies, incluyendo ratón y ser humano. Las secuencias de las proteínas Dvl-1, Dvl-2, y Dvl-3 humanas a modo de ejemplo están disponibles en las secuencias de referencia NP_004412, NP_004413, y 30 NP_004414, respectivamente. Véase también, documento WO2006/007542.
- [0069]** Un “ligando” se refiere a una molécula o resto que se produce naturalmente o sintética que es capaz de una interacción de unión con un sitio específico en una proteína u otra molécula; un ligando del dominio PDZ de Dvl es una molécula o resto que interactúa específicamente con el dominio PDZ de Dvl. Los ejemplos de ligandos incluyen 35 proteínas, péptidos, y pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas.
- [0070]** Una “proteína de fusión” se refiere a un polipéptido que tiene dos porciones unidas covalentemente entre sí, en la que cada una de las porciones se deriva de diferentes proteínas. Las dos porciones pueden estar unidas directamente por un único enlace peptídico o mediante un péptido aglutinante que contiene uno o más restos de 40 aminoácidos. Generalmente, las dos porciones y el aglutinante estarán en un marco de lectura entre sí y se producirán utilizando técnicas recombinantes.
- [0071]** Un “trastorno” o “dolencia patológica” es cualquier dolencia que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o procedimiento de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos que 45 incluyen aquellas dolencias patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en la presente memoria descriptiva incluyen tumores o cánceres malignos y benignos, neoplasias no leucemias y linfoides, trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, y otros trastornos glandulares macrofagales, epiteliales, estromales y blastocóelicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos, neurodegenerativos, trastornos relacionados con la angiogénesis y trastornos relacionados con 50 defectos mitocondriales o metabólicos.
- [0072]** Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la dolencia fisiológica en mamíferos que está normalmente caracterizada por crecimiento/proliferación celular no regulados. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más concretos de dichos cánceres 55 incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o de útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de

próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, y diversos tipos de cáncer de cabeza y de cuello.

[0073] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o de las células que se están tratando, y se puede llevar a cabo tanto para profilaxis como durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la incidencia o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación del estado de enfermedad, y la remisión o pronóstico mejorados. En algunas realizaciones, se utilizan compuestos moduladores de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

[0074] Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseados. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula agonista o antagonista tienen mayor peso debido a los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normal, pero no necesariamente, debido a que la dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor de la cantidad terapéuticamente eficaz.

Moduladores de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl

[0075] La invención proporciona moduladores, y procedimientos para identificar moduladores de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl *in vivo*. Una manera de modular la interacción entre el dominio PDZ de Dvl y su ligando es inhibir la interacción. Cualquier molécula que perturbe la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl puede ser un inhibidor candidato. Las técnicas de selección bien conocidas por los expertos e la técnica pueden identificar estas moléculas. Los ejemplos de inhibidores incluyen: (1) pequeños compuestos orgánicos e inorgánicos, (2) pequeños péptidos, (3) anticuerpos y los derivados, (4) péptidos estrechamente relacionados con el ligando del dominio PDZ (5) aptámeros de ácidos nucleicos. "Inhibidor de la interacción entre el ligando y el dominio PDZ de Dvl" incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente la interacción entre el dominio PDZ de Dvl y su ligando. Las moléculas que pueden actuar como tales inhibidores incluyen péptidos que se unen al dominio PDZ de Dvl, tal como los péptidos aglutinantes relacionados en la Tabla I (por ejemplo, y en los péptidos concretos KWYGWL; KWYGF; WKWYGWL; WKWYGF), Tabla II (por ejemplo y en los péptidos concretos GWKDYGWIDG ; GEIVLWSDIPG), los péptidos aglutinantes relacionados en la Figura 1; anticuerpos (Ab) o fragmentos de anticuerpos, y otras pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas.

Pequeñas moléculas moduladoras de PDZ de Dvl

[0076] Las moléculas pequeñas pueden ser moduladores útiles de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl. Las pequeñas moléculas que inhiben esta interacción son inhibidores potencialmente útiles. Los ejemplos de pequeñas moléculas moduladoras incluyen pequeños péptidos, moléculas similares a péptidos, compuestos orgánicos o inorgánicos sin peptidilo, solubles, y sintéticos. Una "pequeña molécula" se refiere a una composición que tiene un peso molecular de por ejemplo, menos de aproximadamente 5 kD, menos de aproximadamente 4 kD y menos de 0,6 kD. Las pequeñas moléculas pueden ser ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. Se conocen en la técnica bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos, o de algas y se pueden seleccionar con cualquiera de los ensayos. Se han descrito ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares (Carell y col., *Angewandte Chemie International Edition*. 33: 2059-2061 (1994); Carell y col., *Angewandte Chemie International Edition*. 33: 2061-2064 (1994); Cho y col., *Science*. 261: 1303-5 (1993); DeWitt y col., *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 6909-13 (1993); Gallop y col., *J Med Chem*. 37: 1233-51 (1994); Zuckermann y col., *J Med Chem*. 37: 2678-85 (1994).

[0077] Se pueden presentar bibliotecas de compuestos en disolución (Houghten y col., *Biotechniques*. 13: 412-21 (1992)) o en perlas (Lam y col., *Nature*. 354: 82-84 (1991)), en obleas (Fodor y col., *Nature*. 364: 555-6 (1993)), bacterias, esporas (Ladner y col., *Patente de los Estados Unidos N°*. 5.223.409, 1993), plásmidos (Cull y col., *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 1865-9 (1992)) o en fagos (Cwirla y col., *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 6378-82 (1990); Devlin y col., *Science*. 249: 404-6 (1990); Felici y col., *J Mol Biol*. 222: 301-10 (1991); Ladner y col., *Patente de los Estados*

Unidos N° 5.223.409, 1993; Scott y Smith, Science. 249: 386-90 (1990)). Un ensayo exento de células comprende poner en contacto PDZ de Dvl con una molécula aglutinante conocida (tal como uno o más de los polipéptidos aglutinantes de la invención descritos en la presente memoria descriptiva) para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo de interactuar con PDZ de Dvl o la molécula aglutinante, en el que determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con PD7 de Dvl o la molécula aglutinante comprende determinar si está modulada una característica detectable del complejo aglutinante de PDZ de Dvl. Por ejemplo, la interacción de unión a PDZ de Dvl y la molécula aglutinante, tal como se determina por la cantidad de complejo que se forma, puede ser indicadora de si el compuesto de ensayo es capaz de modular la interacción entre PDZ de Dvl y la molécula aglutinante. Se puede evaluar la cantidad de complejo mediante los procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en la presente memoria descriptiva, por ejemplo ELISA (que incluye el ELISA de unión competitiva), ensayos de híbridos de doble levadura y proximidad (por ejemplo, transferencia de energía mediante resonancia fluorescente, enzima-sustrato).

15 **Moduladores polipéptido/péptido y anticuerpos de PDZ de Dvl**

[0078] Un aspecto de la invención pertenece a moduladores péptido/polipéptido aislados de la interacción entre PDZ de Dvl y su(s) molécula(s) de unión celular(es) y/o fisiológica(s). Los polipéptidos aglutinantes de la invención descritos en la presente memoria descriptiva, y los moduladores de polipéptidos obtenidos mediante los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva son también adecuados para el uso como inmunógenos para aumentar los moduladores de anticuerpos de esta interacción. Los moduladores (tales como péptidos y anticuerpos) se pueden aislar de fuentes celulares o tisulares mediante un esquema de purificación adecuado utilizando técnicas normalizadas de purificación de proteína. Los moduladores se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante. Los moduladores de la expresión alternativa a recombinante se pueden sintetizar químicamente utilizando técnicas normalizadas de síntesis peptídica.

[0079] Las moléculas aglutinantes de PDZ de Dvl descritas en la presente memoria descriptiva incluyen las descritas en la Tabla I, II, y la Figura 1. Se describe también una proteína mutante o variante cualquiera de cuyos restos se puede cambiar a partir de los restos correspondientes de estos péptidos, codificando además a la vez un péptido que mantiene la actividad moduladora. Una variante de un péptido/polipéptido/ligando aglutinante puede tener al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de un péptido/polipéptido/ligando aglutinante de referencia. En general, la variante presenta sustancialmente la misma o mayor afinidad de unión que el péptido/polipéptido/ligando de referencia, por ejemplo, al menos 0,75X, 0,8X, 0,9X, 1,0X, 1,25X o 1,5X de la afinidad de unión del péptido/polipéptido/ligando aglutinante de referencia, basándose en la cuantificación unitaria/métrica del ensayo de unión aceptado por la técnica.

[0080] En general, las variantes incluyen variantes en las que los restos en una posición concreta en la secuencia que se ha sustituido por otros aminoácidos, e incluye adicionalmente la posibilidad de insertar un resto o restos adicionales entre dos restos de la proteína/péptido parental así como la posibilidad de eliminar uno o más restos de la secuencia parental o añadir uno o más restos a la secuencia parental. Queda incluida cualquier sustitución, inserción, o delección de aminoácidos. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservativa tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0081] "Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" se define como el porcentaje de restos de aminoácidos que son idénticos con los restos de aminoácidos en una secuencia polipéptidica (parental) de referencia cuando se alinean las dos secuencias. Para determinar el % de identidad de los aminoácidos, se alinean las secuencias y si es necesario, se introducen huecos para conseguir el máximo % de identidad de la secuencia; no se consideran las sustituciones conservativas como parte de la identidad de la secuencia. Los procedimientos de alineación de la secuencia de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad son bien conocidos por los expertos en la técnica. A menudo se utiliza software informático públicamente disponible tal como BLAST, BLAST2, ALIGN2 o Megalign (DNASTAR) para alinear la secuencias peptídicas. Estos expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

[0082] Cuando se alinean las secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada, para, con, o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que se puede enunciar alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se puede calcular como:

$$\% \text{ de identidad de la secuencia de aminoácidos} = X/Y * 100$$

en la que

5

X es el número de restos de aminoácidos puntuados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de la secuencia o el algoritmo de alineación de A y B

e

10 Y es el número total de restos de aminoácidos en B.

[0083] Si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

15

[0084] Un péptido, polipéptido, proteína o fragmento biológicamente activo "aislado" o "purificado" se separa y/o recupera de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes incluyen materiales que interferirían normalmente con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros materiales proteínicos o no proteínicos. Las preparaciones que tienen preferiblemente menos de un 30% de peso en seco de material contaminante no deseado (contaminantes), preferiblemente menos de un 20%, 10%, y preferiblemente menos de un 5% de contaminantes se consideran que están sustancialmente aisladas. Un péptido/polipéptido o porción biológicamente activa del mismo aislado producido de manera recombinante está de manera preferible sustancialmente exento de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa preferiblemente menos del 20%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, y preferiblemente menos de

20

25 aproximadamente el 5% del volumen de una preparación de péptido/polipéptido. Los ejemplos de contaminantes incluyen desechos celulares, medios de cultivo, y sustancias usadas y producidas durante la síntesis *in vitro* del péptido/polipéptido.

[0085] En la Tabla A se muestran sustituciones conservativas de péptidos polipéptidos con el encabezado de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces, se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla A, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a los tipos de aminoácidos y seleccionarse los productos.

35

Tabla A

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val, met; ala; phc; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ilc; val; met; ala, phc	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ilc; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr, ser	phe
Val (V)	ile; leu, met; phe; ala, norleucina	leu

[0086] Se llevan a cabo modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del péptido/polipéptido

seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena secundaria. Los restos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena

5 secundaria.

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, scr, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

10 (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0087] Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de uno de estos tipos por otro

15 tipo.

[0088] Se pueden preparar también variantes de moduladores de anticuerpos de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl basándose en la información conocida en la técnica, sin afectar sustancialmente la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, las variantes de anticuerpos pueden tener al menos un resto de aminoácido en la molécula

20 de anticuerpo sustituido por un resto diferente. Para los anticuerpos, los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la región de estructura (FR).

[0089] Para los anticuerpos, un tipo de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo adicional mejorarán las propiedades biológicas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes sustitucionales implica la maduración por afinidad usando la expresión en fago. De manera breve, algunos sitios de la región hipervariable (por ejemplo, los sitios 6-7) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de

30 aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se expresan en partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III del M13 empaquetado en el interior de cada partícula. Las variantes de expresión en fago se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se ha dado a conocer en la presente memoria descriptiva. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de

35 alanina para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y los restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se someten a

40 selección tal como se describe en la presente memoria descriptiva y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

[0090] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero

45 no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al emplazamiento), mutagénesis mediante la PCR, y mutagénesis mediante casete de una variante preparada más temprano o de una versión no variante del anticuerpo.

[0091] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de la inmunoglobulina de la invención, generando por tanto una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (*por ejemplo*, una región Fc de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (*por ejemplo*, una sustitución) en una o más

50 posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0092] En una realización, la variante de la región Fc puede presentar una afinidad de unión alterada por el receptor Fc neonatal (FcRn). Dichas regiones Fc variantes pueden comprender una modificación de aminoácidos en uno cualquiera o más de los aminoácidos de las posiciones 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435,

436, 439 o 447 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Las variantes de la región Fc con unión reducida a un FcRn puede comprender una modificación de aminoácidos en uno cualquiera o más de los aminoácidos de las posiciones 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 o 447 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Las variantes de la región Fc anteriormente mencionadas pueden, alternativamente, presentar unión aumentada por FcRn y comprender una modificación de aminoácidos en uno cualquiera o más de los aminoácidos de las posiciones 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

10

[0093] La variante de la región Fc con unión reducida a un Fc γ R puede comprender una modificación de aminoácidos en uno cualquiera o más de los aminoácidos de las posiciones 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la de el índice EU como en Kabat.

15

[0094] Por ejemplo, la variante de la región Fc puede presentar unión reducida a un Fc γ RI y comprender una modificación de aminoácidos en uno cualquiera o más de los aminoácidos de las posiciones 238, 265, 269, 270, 327 o 329 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

20

[0095] La variante de la región Fc puede presentar unión reducida a un Fc γ RII y comprender una modificación de aminoácidos en uno cualquiera de los aminoácidos de las posiciones 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

25

[0096] La variante de interés de la región Fc puede presentar unión reducida a un Fc γ RIII y comprender una modificación de aminoácidos en uno o más de los aminoácidos de las posiciones 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437 de la región Fc, en la que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

30

[0097] Las variantes de la región Fc con unión C I q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/o Citotoxicidad dependiente del Complemento (CDC) se describen en el documento WO99/51642. Dichas variantes pueden comprender una sustitución de aminoácidos en uno o más de los aminoácidos de las posiciones 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 o 334 de la región Fc. Véanse, también, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); Patente de los Estados Unidos N° 5.648.260; Patente de los Estados Unidos N° 5.624.821; y Documento WO94/29351.

35

Construcción del vector

[0098] Se pueden obtener secuencias de los polinucleótidos que codifican los péptidos y polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva utilizando técnicas sintéticas y/o recombinantes normalizadas. Se pueden aislar las secuencias de polinucleótidos deseadas y secuenciarse a partir de fuentes celulares adecuadas. Las fuentes celulares de anticuerpos incluirían células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Alternativamente, se pueden sintetizar polinucleótidos utilizando técnicas sintetizadoras de nucleótidos o de la PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican el péptido o el polipéptido se insertan en un vector recombinante capaz de replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en una célula hospedadora. Se pueden usar muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica a fines de la presente invención. La selección de un vector adecuado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se inserten en el vector y de la célula hospedadora concreta que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de un polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora concreta en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a: un origen de replicación (en particular cuando el vector se inserta en una célula procariota), un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, la inserción de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

40

45

50

55

[0099] En general, los vectores plásmidos que contienen un replicón y las secuencias control que se derivan de una especie compatible con la célula hospedadora se usan junto con estos hospedadores. El vector transporta ordinariamente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un

plásmido derivado de especies de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y la tetraciclina (Tet) y de esta manera proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos o bacteriófagos microbianos pueden contener también, o estar modificados para contener, promotores que se puedan usar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas.

5

[0100] Además, se pueden usar vectores de fagos que contengan replicones y secuencias control que sean compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes junto con estos hospedadores. Por ejemplo, se pueden utilizar bacteriófagos tales como λ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar las células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

10

[0101] En la presente invención se pueden usar promotores tanto constitutivos como inducibles, de acuerdo con las necesidades de una situación concreta, que pueden determinarse por un experto en la técnica. Son bien conocidos un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede estar unido de manera operable a un ADN cistronico que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria descriptiva eliminando el promotor de la fuente de ADN mediante digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de elección. Se pueden usar la secuencia promotora natural y muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o la expresión de los genes diana. Sin embargo, se prefieren los promotores heterólogos, ya que permiten generalmente una transcripción mayor y rendimientos más altos del gen diana expresado en comparación con el promotor natural del polipéptido diana.

20

[0102] Los promotores adecuados para el uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de la β -galactamasa y la lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o el *trc*. Sin embargo, son así mismo adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, permitiendo por tanto a un operario experto ligarlos de manera operable a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada dianas (Siebenlist y col. (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores que suministran cualquier sitio de restricción requerido.

25

[0103] En algunas realizaciones, cada cistrón dentro de un vector recombinante comprende un componente de una secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el objetivo de esta invención debe ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda mediante una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconozcan y procesen las secuencias señal naturales de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal está sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, *lpp*, o las secuencias líderes de la enterotoxina II térmicamente estable (STII), *LamB*, *PhoE*, *PclB*, *OmpA* y *MBP*.

35

[0104] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. Preferiblemente, se utilizan células gram negativas. Preferiblemente la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y puede ser deseable incorporar en el cultivo inhibidores de la proteasa adicionales.

45

Producción de péptidos o polipéptidos

[0105] Las células hospedadoras se transforman o transfectan con los vectores de expresión anteriormente descritos y cultivados en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

50

[0106] La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora tanto si cualquier secuencia de codificación se expresa de hecho como si no. Un técnico normalmente experto conoce numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo, precipitación y electroporación mediante CaPO_4 . Se reconoce generalmente una transfección satisfactoria cuando se produce cualquier indicación del funcionamiento de este vector en el interior de la célula hospedadora.

55

[0107] La transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de tal manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como mediante un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se lleva a cabo utilizando técnicas normalizadas adecuadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen paredes celulares que suponen una barrera a las sustancias. Otro procedimiento de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más utilizada es la electroporación.

[0108] Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención se hacen crecer en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (LB) más suplementos nutritivos necesarios. En las realizaciones preferidas, los medios contienen también un agente de selección, escogido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir crecer selectivamente las células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a la ampicilina.

[0109] Se puede incluir también cualquier suplemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno, y fosfato inorgánico a las concentraciones adecuadas introducido solo o como una mezcla con otros suplementos o medio tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados entre el grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitrol.

[0110] Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferiblemente desde aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, incluso de manera más preferible a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es de manera preferible de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferiblemente, de aproximadamente 7,0.

[0111] Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión, se induce la expresión de la proteína en condiciones adecuadas para la activación del promotor. Por ejemplo, si se usa un promotor PhoA para controlar la transcripción, se pueden cultivar las células hospedadoras transformadas en un medio limitante de fosfato para la inducción. Se puede usar una variedad de diferentes inductores, de acuerdo con el vector construido empleado, tal como se conoce en la técnica.

[0112] Los polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva expresados en un microorganismo se pueden secretar en y recuperarse del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de la proteína implica normalmente la perturbación del microorganismo, generalmente mediante dichos medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se perturban, se pueden eliminar los desechos celulares o las células completas mediante centrifugación o filtración. Se pueden purificar además las proteínas, por ejemplo, mediante resina para cromatografía por afinidad. Alternativamente, se pueden transportar las proteínas en los medios de cultivo y aislarse de los anteriores. Se pueden eliminar las células del cultivo y del sobrenadante del cultivo filtrándose y concentrándose para la purificación adicional de las proteínas producidas. Se pueden aislar e identificar adicionalmente los polipéptidos expresados usando procedimientos comúnmente conocidos fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre gel de sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidad hidrofóbicas, afinidad de ligando usando un antígeno adecuado inmovilizado en una matriz y ensayo de transferencia Western.

[0113] Además de las células hospedadoras procariotas, los sistemas de células hospedadoras eucariotas están bien establecidos en la técnica. Los hospedadores adecuados incluyen líneas celulares de mamíferos tales como CHO, y células de insectos como las descritas a continuación.

Purificación de polipéptidos/péptidos

[0114] Los polipéptidos/péptidos que se han producido se pueden purificar para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Se pueden emplear los procedimientos normalizados de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de los procedimientos de purificación adecuados; fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o

intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en gel de sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

Identificación y caracterización de moduladores de PDZ de Dvl – Estrategia general

5

[0115] Se pueden identificar los moduladores de PDZ de Dvl candidatos, por ejemplo, los péptidos de unión, mediante numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Se pueden evaluar las características moduladoras de los moduladores determinando la capacidad de los moduladores de modular la interacción entre PDZ de Dvl y sus moléculas de enlace (tales como los polipéptidos de unión de la invención). Una de las características importantes es la afinidad de unión. Se pueden evaluar las características de unión de los moduladores candidatos (por ejemplo, los péptidos) de interés en cualquiera de las numerosas maneras conocidas en la técnica.

10

[0116] Una etapa inicial del proceso puede incluir generar uno o más péptidos candidatos que comprendan las secuencias de interés, que a continuación se expresan en las condiciones adecuadas para determinar sus características de unión al dominio PDZ de Dvl. Por ejemplo, los péptidos candidatos se pueden expresar en forma de bibliotecas de expresión con extremo carboxilo (extremo C) de péptidos en la superficie de un fago o fagémido, por ejemplo, un fago(fagémido) filamentoso utilizando proteínas de fusión con una proteína revestida tal como p3 o p8. Se conoce en la técnica la expresión del extremo C. Véanse, por ejemplo, Jespers y col., *Biotechnology (N Y)*, 13: 378-82 y documento WO 00/06717. Estos procedimientos se pueden usar para preparar los genes de fusión, proteínas de fusión, vectores, partículas de fagos recombinantes, células hospedadoras y sus bibliotecas de la invención. Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, en algunas realizaciones, puede ser útil expresar péptidos candidatos como bibliotecas de expresión con extremo amino (extremo N) de péptidos sobre la superficie de un fago o fagémido. Los procedimientos de expresión de fagos(fagémidos) con extremo N incluyen aquellos descritos en la presente memoria descriptiva, y aquellos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.750.373 (y las referencias citadas en la anterior). Se conocen también en la técnica los procedimientos de caracterización de moléculas aglutinantes obtenidas mediante estos procedimientos, incluyendo los datos a conocer en las referencias citadas anteriormente (Jespers y col., documento WO 00/06717 y Patente de los Estados Unidos N° 5.750.373) y que se describen en la presente memoria descriptiva.

30

(i) Aislamiento del fago de unión a PDZ de Dvl

[0117] Una biblioteca de expresión en fago con los péptidos de unión a PDZ de Dvl candidatos expresados se pone en contacto con las proteínas del dominio de PDZ de Dvl o las proteínas de fusión *in vitro* para determinar aquellos miembros de la biblioteca que se unen al dominio PDZ de Dvl diana. Se puede usar cualquier procedimiento conocido por el técnico experto para el ensayo de unión de la proteína *in vitro*. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo 1, 2, 3 o 4 ciclos o más de selección de la unión, después de lo cual se aíslan fagos individuales y, opcionalmente, se analizan en un ELISA de fago. Se pueden determinar las afinidades de unión de las partículas de fagos que expresan péptidos en proteínas diana de PDZ inmovilizadas usando un ELISA de fago (Barrett y col., *Anal Biochem.* 204: 357-64 (1992)).

40

[0118] En una situación en la que se está evaluando el candidato por su capacidad para competir con un aglutinante de PDZ de Dvl conocido para la unión a PDZ de Dvl, se proporcionan condiciones adecuadas de competición por la unión. Por ejemplo, en una realización, se puede llevar a cabo un cribado/selección/ciclos de selección de fagos por afinidad en presencia de una o más concentraciones del aglutinante de PDZ de Dvl conocido. En otra realización, los aglutinantes candidatos aislados de la biblioteca se pueden evaluar posteriormente en un ensayo ELISA competitivo en presencia del aglutinante de PDZ de Dvl conocido.

45

(ii) Preparación de dominios de PDZ de Dvl

50

[0119] Se pueden producir dominios de PDZ de Dvl convenientemente como fragmentos de una proteína que contienen el dominio o como polipéptidos de fusión utilizando técnicas sintéticas o recombinantes convencionales. Los polipéptidos de fusión son útiles en la expresión en fago(fagémido) en la que el dominio PDZ de Dvl es un antígeno diana, en estudios de expresión, localización de células, bioensayos, ELISA (que incluye ensayos de competición por la unión), etc. Una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" del dominio PDZ de Dvl comprende el dominio PDZ de Dvl fusionado a un polipéptido de un dominio no de PDZ. Un polipéptido de un dominio no de PDZ no es sustancialmente homólogo con el dominio PDZ. Una proteína de fusión del dominio PDZ de Dvl puede incluir cualquier porción en el dominio PDZ completo, incluyendo cualquier número de las porciones biológicamente activas. La proteína de fusión puede a continuación purificarse de acuerdo a procedimientos conocidos utilizando

55

cromatografía de afinidad y un reactivo de captura que se una al polipéptido del dominio no de PDZ. El dominio PDZ de Dvl puede fusionarse con una secuencia de afinidad, por ejemplo, el extremo C de las secuencias GST (glutación S transferasa). Dichas proteínas de fusión facilitan la purificación del dominio PDZ de Dvl recombinante utilizando, por ejemplo, el glutatión unido a un soporte sólido y/o la unión a un soporte sólido (por ejemplo, una matriz para el cribado/selección/ciclos de selección de fagos por afinidad). En la Tabla B se presentan las fusiones adicionales a modo de ejemplo, que incluyen algunos usos comunes de dichas fusiones.

[0120] Se pueden crear fácilmente proteínas de fusión utilizando procedimientos recombinantes. Se puede fusionar un ácido nucleico que codifica el dominio de PDZ de Dvl (o una de sus porciones) en marco con un dominio no de PDZ que codifica el ácido nucleico, en el extremo N, el extremo C o internamente del dominio PDZ. Se pueden sintetizar también genes de fusión mediante técnicas convencionales, que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Es también útil la amplificación mediante la PCR usando cebadores de anclaje que proporcionan un aumento de salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que se pueden hibridar posteriormente y volverse a amplificar para generar una secuencia de un gen quimérico (Ausubel y col., Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Nueva York 1987). Están comercialmente disponibles muchos vectores que facilitan la subclonación del dominio PDZ de Dvl en marco con una proteína de fusión.

Tabla B Polipéptidos de fusión del dominio no de PDZ útiles

Molécula de unión	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Hormona del crecimiento humana (hGH)	Radioinmunoensayo	Ninguno
B-glucuronidasa (GUS)	Colorimétrico, fluorescente, o quimioluminiscente	Colorimétrico (tinción histoquímica con X-gluc)
Proteína fluorescente verde (GFP) y moléculas relacionadas (RFP, BFP, dominio YFP, etc.)	Fluorescente	Fluorescente
Luciferasa (luciérnaga)	Bioluminiscente	Bioluminiscente
Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)	Cromatografía, extracción diferencial, fluorescente, o inmunoensayo	Ninguno
B galactosidasa	Colorimétrico, fluorescencia, quimioluminiscencia	Colorimétrico (tinción histoquímica con X-gal), bioluminiscente en células vivas
Secreta fosfatasa alcalina	Colorimétrico, bioluminiscente, quimioluminiscente	Ninguno
Tat de VIH	Media en la liberación en el citoplasma y los núcleos	Media en la liberación en el citoplasma y los núcleos

[0121] Como ejemplo de una fusión del dominio PDZ de Dvl, se puede preparar la fusión de PDZ de GST-Dvl a partir de un gen de interés de la siguiente manera. Con el gen de longitud completa de interés como molde, se usa la PCR para amplificar fragmentos de ADN que codifican el dominio PDZ usando cebadores que introducen los sitios convenientes de las endonucleasas de restricción para facilitar la subclonación. Cada fragmento amplificado se digiere con las enzimas de restricción adecuadas y se clona en un plásmido digerido de manera similar, tal como pGEX6P-3 o pGEX-4T-3, que contiene GST y se diseña de tal manera que los fragmentos subclonados estarán en marco con el GST y unidos de manera operable a un promotor, dando como resultado plásmidos que codifican las proteínas de fusión de PDZ de GST-Dvl.

[0122] Para producir la proteína de fusión, los cultivos de E. coli que hospedan los plásmidos de expresión adecuados se hacen crecer generalmente hasta la fase semilogarítmica ($A_{600} = 1,0$) en caldo LB, por ejemplo, a aproximadamente 37°C, y se pueden inducir con IPTG. Se aglomeran las bacterias mediante centrifugación, se vuelven a suspender en PBS y se lisan mediante sonicación. Se centrifuga la suspensión, y se purifican las proteínas de fusión de PDZ de GST-Dvl a partir del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad en 0,5 ml de glutatión-sefarosa.

[0123] Será evidente para un experto en la técnica que muchas variaciones conseguirán la meta de aislar la proteína del dominio PDZ de Dvl y se pueden usar en esta invención. Por ejemplo, se pueden construir fusiones del dominio PDZ de Dvl y un epítipo etiqueta tal como se ha descrito anteriormente y usarse las etiquetas para purificar mediante afinidad el dominio PDZ de Dvl. Se pueden preparar también proteínas/péptidos del dominio PDZ de Dvl

sin ninguna fusión; además, en vez de usar los vectores microbianos para producir la proteína, se puede utilizar en vez de esto la síntesis química *in vitro*. Se pueden utilizar otras células para producir las proteínas/péptidos del dominio PDZ de Dvl, tales como otras bacterias, células de mamíferos (tales como COS), o sistemas baculovíricos. Está también disponible una amplia variedad de vectores de polinucleótidos para producir una variedad de fusiones.

- 5 La purificación final de una proteína de fusión de un dominio de PDZ de Dvl dependerá generalmente de la molécula de unión; por ejemplo, se puede purificar una etiqueta de fusión de polihistidina en columnas de níquel.

(iii) Determinación de la secuencia del péptido expresado

- 10 **[0124]** El fago(fagémido) que se une a PDZ de Dvl con las características deseadas (y opcionalmente, no se une a las secuencias no relacionadas), se puede someter al análisis de la secuencia. Las partículas de fago(fagémido) que expresan los péptidos de unión candidatos se amplifican en las células hospedadoras, el ADN aislado, y la porción adecuada del genoma (que codifica el péptido candidato) secuenciada utilizando cualquier técnica de secuenciación conocida adecuada.

15

Otras estrategias para identificar moduladores de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl

- [0125]** Otra estrategia para identificar moduladores de la unión del ligando de PDZ de Dvl es incorporar un diseño racional del fármaco; esto es, entender y aprovechar la biología de la interacción de PDZ. En esta estrategia, se determinan los restos críticos en un ligando de PDZ, como es, opcionalmente, la longitud óptima del péptido. A continuación, se diseñan pequeñas moléculas con esta información en la mano; por ejemplo, si se encuentra que una tirosina es un resto crítico para la unión a un dominio PDZ, entonces, moléculas pequeñas que contienen un resto de tirosina se prepararán y probarán como inhibidores. Generalmente, se determinarán 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácidos que son críticos para la unión y se prepararán pequeñas moléculas inhibitoras que contienen estos
- 20 restos o las cadenas secundarias de los restos. A continuación se seleccionan los compuestos de ensayo para su capacidad de inhibir las interacciones del ligando del dominio de PDZ de Dvl utilizando protocolos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, un ensayo de inhibición competitiva.
- 25

- [0126]** Los compuestos que modulan las interacciones de unión del ligando del dominio PDZ de Dvl son útiles para tratar enfermedades y dolencias que están asociadas con la desregulación de las interacciones de unión a PDZ de Dvl. Las enfermedades y dolencias que se asocian con la regulación de las interacciones del dominio PDZ de Dvl incluyen la apoptosis dependiente e independiente de caspasa, y el control de calidad de la proteína mitocondrial.
- 30

1. Determinación de los restos críticos en un polipéptido de unión a PDZ de Dvl

35

(a) Barrido de alanina

- [0127]** Se puede usar el barrido de alanina de una secuencia peptídica de unión al dominio PDZ de Dvl para determinar la contribución relativa de cada resto en el ligando de unión a PDZ. Para determinar los restos críticos en un ligando de PDZ, se sustituyen los restos con un único aminoácido, normalmente un resto de alanina, y se evalúa el efecto sobre la unión al dominio PDZ. Véase documentos US 5.580.723; US 5.834.250; y los Ejemplos.
- 40

(b) Truncamientos (series de delección)

- [0128]** El truncamiento del péptido de unión al dominio PDZ de Dvl puede elucidar no solo los restos críticos de la unión, sino también determinar la longitud mínima para alcanzar la unión. En algunos casos, el truncamiento desvelará un ligando que se une más estrechamente que el ligando natural; tal como un péptido es útil para modular las interacciones del dominio PDZ de Dvl el ligando de PDZ.
- 45

- [0129]** Preferiblemente, se prepara una serie de truncamientos de péptidos de unión al dominio PDZ de Dvl. Una serie truncará los aminoácidos aminoterminales secuencialmente; en otra serie, los truncamientos comenzarán en el extremo carboxilo. Como en el caso del barrido de alanina, se pueden sintetizar los péptidos *in vitro* o prepararse mediante procedimientos recombinantes.
- 50

(c) Diseño racional del modulador

55

[0130] Basándose en la información obtenida del barrido de la alanina y del análisis del truncamiento, el técnico experto puede diseñar y sintetizar pequeñas moléculas o seleccionar bibliotecas de pequeñas moléculas que están enriquecidas en compuestos que es probable que modulen la unión. Basándose, por ejemplo, en la información que

se describe en los Ejemplos, se puede diseñar un péptido modulador para incluir 2 restos hidrófobos separados de manera adecuada.

(d) Ensayos de unión

5

[0131] La formación de un complejo de un péptido de unión a PDZ de Dvl y PDZ de Dvl facilita la separación de las formas complejadas de sus formas sin complejar y de las impurezas. Se pueden formar complejos del ligando de unión al dominio PDZ de Dvl en disolución, utilizando, por ejemplo, cromatografía en columna, y se pueden separar a la vez unidos a un soporte sólido mediante filtración, centrifugación, etc., usando técnicas bien conocidas. La unión del dominio PDZ que contiene el polipéptido o del ligando del anterior a un soporte sólido, facilita ensayos de elevado rendimiento.

[0132] Se pueden seleccionar los compuestos de ensayo por la capacidad de modular (por ejemplo, inhibir) la interacción de un polipéptido aglutinante con un dominio PDZ de Dvl, tal como placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. Se pueden preparar también proteínas de fusión para facilitar el ensayo o la separación, en el que la proteína de fusión contiene un dominio adicional que permite a una o a ambas proteínas unirse a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión del péptido de unión a GST-PDZ o las proteínas de fusión al dominio GST-PDZ se pueden adsorber sobre perlas de glutatión sefarosa (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión que se combinan a continuación con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y cualquiera de la proteína del dominio PDZ de Dvl no adsorbida o del péptido de unión a PDZ, y se incuban la mezcla en condiciones que permiten la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Tras la incubación, las perlas o las paredes de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz inmovilizada en el caso de las perlas, y el complejo determinado tanto directa como indirectamente. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz, y determinarse el nivel de unión o la actividad utilizando técnicas normalizadas.

[0133] Se pueden usar también técnicas de los polipéptidos de fusión para inmovilizar proteínas sobre matrices en ensayos de selección. Se pueden inmovilizar tanto un péptido de unión a PDZ de Dvl como PDZ de Dvl usando sistemas de biotina-avidina o biotina-estreptavidina. Se puede llevar a cabo la biotilación usando muchos reactivos, tales como biotina-N-hidroxisuccinimida (NHS; PIERCE Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizarse en las paredes de placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina (PIERCE Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reaccionan con los péptidos de unión a PDZ de Dvl o con el dominio PDZ de Dvl, pero no interfieren con la unión de un péptido de unión con su molécula diana y se pueden derivatizar en los pocillos de la placa, y no unirse a PDZ de Dvl o atraparse con el péptido aglutinante en los pocillos mediante la conjugación del anticuerpo. Los procedimientos para detectar dichos complejos, además de los descritos para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de los complejos usando anticuerpos reactivos con los péptidos aglutinantes o el dominio PDZ de Dvl.

(e) Ensayo de unión: ELISA de competición

40

[0134] Para evaluar las afinidades de unión de un péptido, proteínas u otros ligandos de PDZ de Dvl, se pueden usar ensayos de unión por competición, en los que se evalúa la capacidad del ligando de unirse al dominio PDZ de Dvl (y la afinidad de unión, si se desea) y compara con la de un compuesto que se sabe que se une al dominio PDZ, por ejemplo, un péptido aglutinante de alta afinidad determinado por la expresión en fago tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0135] Se conocen muchos procedimientos, y se pueden usar para identificar las afinidades de unión de las moléculas de unión (por ejemplo, péptidos, proteínas, pequeñas moléculas, etc.) por ejemplo, se pueden determinar las afinidades de unión como valores CI_{50} usando los ELISA de competición. El valor CI_{50} se define como la concentración de aglutinante que bloquea el 50% de la unión del dominio PDZ de Dvl a un ligando. Por ejemplo, en ensayos en fase sólida, se pueden preparar placas de ensayo revistiendo las placas de microtitulación (tratadas preferiblemente para adsorber eficazmente la proteína) con neutravidina, avidina o estreptavidina. A continuación se bloquean los sitios de unión no específica mediante la adición de una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) u otras proteínas (por ejemplo leche desnatada) y a continuación se lavan preferiblemente con un tampón que contiene un detergente tal como Tween-20. Se prepara un aglutinante de PDZ de Dvl conocido biotilado (por ejemplo, péptidos de fago como fusiones con GST u otra de dichas moléculas para facilitar la purificación y la detección) y se une a la placa. Se preparan diluciones en serie de la molécula que se va a ensayar con el dominio PDZ de Dvl y se ponen en contacto con el aglutinante unido. La placa revestida con el aglutinante inmovilizado se lava antes de añadir cada reacción de unión a los pocillos y se incuban de manera breve. Después de lavar

adicionalmente, se detectan las reacciones de unión, a menudo con un anticuerpo que reconoce la molécula de fusión no PDZ y un anticuerpo secundario marcado (tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), o una etiqueta fluorescente tal como fluoresceína) que reconoce el anticuerpo primario. A continuación, se desarrollan las placas con el sustrato adecuado (dependiendo de la etiqueta) y se cuantifica la señal, tal como usando un lector de placas espectrofotométrico. La señal de absorción puede ajustarse a la curva de unión un ajuste de mínimos cuadrados. De esta manera, se puede medir la capacidad de diversas moléculas de inhibir la unión del dominio PDZ a un aglutinante del dominio PDZ conocido.

[0136] Serán evidente para un experto muchas variaciones del anterior ensayo. Por ejemplo, en vez de sistemas basados en avidina-biotina, los aglutinantes del dominio PDZ pueden unirse químicamente a un sustrato, o sencillamente adsorberse.

2. Se encuentran ligandos peptídicos del dominio PDZ durante la expresión del fago

[0137] Los ligandos peptídicos del dominio PDZ son inhibidores útiles potenciales de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl, incluyendo los descritos en los Ejemplos (y la Tabla I, II y la Figura 1).

[0138] La ELISA de unión competitiva es un medio útil de determinar la eficacia de cada péptido de unión del dominio PDZ expresado en fago.

3. Aptámeros

[0139] Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos cortos que se pueden usar para reconocer y unirse específicamente a casi cualquier molécula. Se puede usar la evolución sistemática de los ligandos mediante el procedimiento de enriquecimiento exponencial (SELEX) (Ausubel y col., Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Nueva York (1987); Ellington y Szostak, Nature. 346: 818-22 (1990); Tuerk y Gold, Science. 249: 505-10 (1990)) para encontrar dichos aptámeros. Los aptámeros tienen muchos usos diagnósticos y clínicos; para casi cualquier uso en el que se haya utilizado un anticuerpo clínica o diagnósticamente, se pueden usar también aptámeros. Además, los aptámeros son menos costosos de fabricar una vez que se han identificado y se pueden aplicar fácilmente en una variedad de formatos, que incluye la administración en composiciones farmacéutica, bioensayos y pruebas diagnósticas (Jayasena, Clin Chem. 45: 1628-50 (1999)).

[0140] En el ensayo de unión competitiva ELISA descrito anteriormente, la selección de los aptámeros candidatos incluye incorporas los aptámeros en el ensayo y determinar su capacidad para modular la unión del ligando al dominio PDZ de Dvl.

4. Anticuerpos (Ab)

[0141] Cualquier anticuerpo que module (por ejemplo, inhiba) la unión del dominio PDZ de Dvl con el ligando puede ser un modulador (por ejemplo, inhibidor) de la interacción del ligando con el dominio de PDZ de Dvl. Los ejemplos de anticuerpos adecuados incluyen Ab policlonales, monoclonales, monocatenarios, antiidiotípicos, quiméricos, o versiones humanizadas de dichos anticuerpos o de sus fragmentos. Los anticuerpos pueden ser de cualquier forma adecuada, incluyendo de origen sintético y de cualquier especie en la que se pueda potenciar una respuesta inmune.

Procedimientos de selección

[0142] Esta invención abarca procedimientos de selección de compuestos para identificar aquellos que modulas la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl. Los ensayos de selección se diseñan para identificar los compuestos que se unen o complejan con PDZ de Dvl y/o el ligando, o que interfieren de otra manera con la interacción de PDZ de Dvl y los factores celulares. Una estrategia para determinar la capacidad de un compuesto candidato de ser un modulador es evaluar la actividad del compuesto candidato en un ensayo de inhibición competitiva en presencia de un aglutinante de PDZ de Dvl conocido, tal como cualquiera de los péptidos aglutinantes (por ejemplo, los aglutinantes de alta afinidad descritos en los Ejemplos) dados a conocer en la presente memoria descriptiva. Dichos ensayos de selección incluirán ensayos flexibles para la selección de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndoles particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas de fármacos candidatos.

[0143] Los ensayos se pueden llevar a cabo en una variedad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos bioquímicos de selección, y ensayos basados en células, que están bien caracterizados

en la técnica.

[0144] Todos los ensayos de los moduladores son comunes en que requieren poner en contacto el fármaco candidato con PDZ de Dvl (o su equivalente) y/o el ligando de unión que está implicado en la interacción de unión de PDZ de Dvl y el ligando de unión, en las condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir interactuar a estos componentes.

[0145] En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, se inmoviliza una sustancia o molécula candidata en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante enlaces covalentes o no covalentes. El enlace covalente se lleva a cabo generalmente revistiendo la superficie sólida con una disolución de la sustancia/molécula y secándola. Alternativamente, se puede usar una molécula de afinidad inmovilizada tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específica de la sustancia/molécula que se va a inmovilizar, anclándola a su soporte sólido. El ensayo se lleva a cabo añadiendo el componente no inmovilizado, que se va a etiquetar mediante una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie revestida que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta una etiqueta detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada sobre la superficie indica que se ha producido la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta una etiqueta, se puede detectar la complejación, por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0146] Si el compuesto candidato interactúa con, pero no se une a, PDZ de Dvl o su molécula de unión, se puede evaluar su interacción con el polipéptido mediante procedimientos bien conocidos para detectar la interacción proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen soluciones tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, inmunoprecipitación simultánea, y purificación simultánea mediante gradientes o columnas cromatográficas. Además, se pueden vigilar las interacciones proteína-proteína usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (Londres), 340: 245-246 (1989); Chien y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)) tal como se da a conocer por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores de la transcripción, tales como la levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno como el dominio de unión del ADN, funcionando el otro como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones anteriores (denominado generalmente como el "sistema doble híbrido" aprovecha esta propiedad, y emplea proteínas doble híbridas, una en la que la proteína diana esta fusionada al dominio de unión del ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor GAL4 activado depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen los polipéptidos interactuantes se detectan con un sustrato cromógeno para la β galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica doble híbrida está comercialmente disponible de Clontech. Este sistema se puede extender también a los dominios de la proteína map implicados en las interacciones específicas de la proteína así como los restos de aminoácidos localizados que son cruciales para estas interacciones.

[0147] En cualquiera de los procedimientos de selección anteriores, es a menudo deseable evaluar la capacidad moduladora de un compuesto candidato determinando su capacidad de unión a PDZ de Dvl y un aglutinante de alta afinidad conocido (tal como uno de los descritos en la presente memoria descriptiva).

[0148] Se pueden generar compuestos candidatos mediante bibliotecas combinatorias y/o mutaciones de aglutinantes conocidos basándose en la información descrita en la presente memoria descriptiva, en la información concreta que relaciona las contribuciones y la importancia con las interacciones de unión con el ligando de PDZ de Dvl de los residuos y restos individuales dentro de un ligando o la propia secuencia de PDZ de Dvl.

[0149] Se pueden probar los compuestos que interfieren con la interacción de PDZ de Dvl y el ligando de unión como sigue: normalmente se prepara una mezcla de reacción que contiene PDZ de Dvl y un ligando en las condiciones y durante el tiempo que permita la interacción y la unión de las dos moléculas. Para probar la capacidad de un compuesto candidato de inhibir la interacción de unión, se hace avanzar la reacción en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, que sirva como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto de ensayo y PDZ de Dvl y/o el ligando de unión presente en la mezcla se vigila tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria

descriptiva. La formación de un complejo en la(s) reacción(es) del control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción de PDZ de Dvl y el ligando de unión.

[0150] Tal como se describe en la presente memoria descriptiva, una sustancia/molécula de la invención puede ser un péptido. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para obtener dichos péptidos, e incluyen el cribado de bibliotecas de péptidos para los aglutinantes con un antígeno diana. Los antígenos diana adecuados pueden comprender PDZ de Dvl (o una de sus porciones que comprende el sitio de unión de un ligando de PDZ de Dvl), que se describe en detalle en la presente memoria descriptiva. Son bien conocidas en la técnica las bibliotecas de péptidos, y se pueden preparar también de acuerdo con los procedimientos de la técnica. Véase, por ejemplo, Clark y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.121.416. Son bien conocidas en la técnica las bibliotecas de péptidos fusionados a un componente de proteína heteróloga, tal como una proteína revestida de fago, por ejemplo, tal como se describe en Clark, y col, más arriba. Un péptido de que tiene la capacidad de bloquear la interacción proteína-proteína de PDZ de Dvl puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos aglutinantes dados a conocer en la presente memoria descriptiva. Un péptido que tenga la capacidad de bloquear la interacción proteína-proteína de PDZ de Dvl puede comprender la secuencia de aminoácidos de un péptido aglutinante obtenido de un ensayo de selección de un modulador tal como se ha descrito anteriormente. El péptido puede tener la capacidad de competir con uno o más de los péptidos aglutinantes dados a conocer en la presente memoria descriptiva (véanse los Ejemplos) para unirse a PDZ de Dvl. El péptido puede unirse al mismo epítipo en PDZ de Dvl al cual se unen uno o más de los péptidos aglutinantes dados a conocer en la presente memoria descriptiva (véanse los Ejemplos). Se pueden generar variantes de un primer péptido seleccionando mutantes del péptido para obtener las características de interés (por ejemplo, potenciando la afinidad de unión a la diana, farmacocinética mejorada, toxicidad reducida, índice terapéutico mejorado, etc.). Son bien conocidas en la técnica las técnicas de mutagénesis. Además, las técnicas de mutagénesis de barrido (tales como las basadas en el barrido de alanina) pueden ser especialmente útiles para evaluar la importancia estructural y/o funcional de los restos de aminoácidos individuales dentro de un péptido.

[0151] La determinación de la capacidad de una sustancia/molécula candidata, tal como un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un péptido aglutinante dado a conocer en la presente memoria descriptiva, para modular la actividad de PDZ de Dvl, se puede llevar a cabo probando la capacidad moduladora de la sustancia/molécula en ensayos *in vitro* o *in vivo*, que se encuentran bien establecidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Martins y col. (J. Biol. Chem. 278(49): 49417-49427 (2003)) y Faccio y col. (J. Biol. Chem. 215(4): 2581-2588 (2000)).

Ejemplos de usos para los aglutinantes de PDZ de Dvl y los moduladores de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl

[0152] La identificación y caracterización de los aglutinantes peptídicos de PDZ de Dvl tal como se describe en la presente memoria descriptiva proporcionan una valiosa comprensión de las funciones celulares de la proteína Dvl, y proporcionan composiciones y procedimientos para modular las interacciones *in vivo* entre esta importante proteína celular y su(s) molécula(s) de unión. Por ejemplo, se pueden utilizar estos péptidos y sus homólogos para interferir con las interacciones de unión *in vivo* que implican a PDZ de Dvl. Se pueden generar homólogos convenientemente basándose en sus características de unión y/o funcionales con respecto a los péptidos bien caracterizados proporcionados en la presente memoria descriptiva. Estos péptidos puede utilizarse adicionalmente para elucidar los polipéptidos celulares y fisiológicos que constituyen complejos PDZ de Dvl *in vivo*.

[0153] El control bien caracterizado de los aglutinantes de alta afinidad de PDZ de Dvl tal como se describe en la presente memoria descriptiva puede usarse adicionalmente para elucidar importantes características estructurales del propio PDZ de Dvl. El conocimiento de las mismas proporciona el desarrollo de agentes moduladores basados en la modificación de la propia secuencia de PDZ de Dvl. Se dan a conocer en la presente memoria descriptiva variantes de PDZ de Dvl que tienen una capacidad aumentada o reducida de unirse a moléculas de unión de PDZ de Dvl. Se pueden identificar de forma similar otras variantes.

[0154] Se pueden usar moduladores de las moléculas de unión de PDZ de Dvl basados en los ligandos peptídicos descritos en la presente memoria descriptiva para conseguir el efecto modulador de interés. Por ejemplo, dicha manipulación puede incluir la inhibición de la asociación entre el dominio PDZ de Dvl y su proteína de unión análoga. En otro ejemplo, dicha manipulación puede incluir efectos agonísticos a través, por ejemplo, de la inducción de funciones celulares como resultado de la unión de los moduladores de PDZ de Dvl o mediante la potenciación de la asociación entre el dominio PDZ de Dvl y su proteína de unión análoga por los moduladores.

[0155] Otros usos de los moduladores de PDZ de Dvl incluyen ensayos diagnósticos para las enfermedades relacionadas con Dvl y sus moléculas de asociación, el uso del dominio y los ligandos de PDZ de Dvl en las proteínas de fusión como palancas y anclas de purificación de sustratos.

5 **[0156]** La identificación de aglutinantes capaces de unirse al dominio PDZ de Dvl a afinidades variables, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, proporciona vías útiles para modular importantes interacciones proteína-proteína biológicamente activas *in vivo*. Como está bien establecido en la técnica, la proteína Dvl está implicada en importantes procesos biológicos, que incluyen la regulación de la apoptosis y el control de calidad de la proteína en la mitocondria. La proteína Dvl contiene un dominio PDZ, que es un dominio que se ha notificado como
10 esencial en las interacciones de unión proteína-proteína. De esta manera, la identificación de moléculas que sean capaces de modular estas interacciones apunta a vías de aplicaciones terapéuticas y/o diagnósticas y estrategias que no serían posibles en ausencia del conocimiento de dichas moléculas e interacciones. Se pueden administrar compuestos moduladores (por ejemplo, inhibidores o agonísticos) en células vivas usando rutas adecuadas de administración conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante microinyección, péptido de antenapedia o reactivos
15 de transfección de lípidos, que sirven como moduladores competitivos específicos del dominio de PDZ de Dvl con el fin de modular, y en algunos casos validar la importancia fisiológica de la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl en un tejido, célula, órgano o dolencia patológica concretos. Los ensayos adecuados existen para vigilar la interacción entre el ligando y PDZ y el efecto fisiológico de la modulación de dicha interacción. Esto no requiere que se descubra el ligando fisiológico del dominio PDZ de Dvl mediante la expresión en fago, únicamente que el modulador sea específico del dominio PDZ y con suficiente afinidad para perturbar la interacción de dicho ligando con el
20 dominio PDZ. Finalmente, como con cualquier proteína unida con un proceso de enfermedad, se debe establecer cómo un fármaco afectaría a la proteína para conseguir el beneficio terapéutico. Los compuestos moduladores, tales como péptidos/ligandos, pueden administrarse en células vivas o en modelos animales que son modelos de una enfermedad (por ejemplo, imitan algunas propiedades de una enfermedad) para determinar si la perturbación de la
25 interacción entre el ligando y PDZ de Dvl por el compuesto modulador de interés proporciona un resultado consistente con las expectativas del beneficio terapéutico.

[0157] Son conocidos en la técnica los procedimientos para detectar interacciones proteína-proteína (o péptido) *in vivo*. Por ejemplo, se pueden usar los procedimientos descritos por Michnick y col. en las Patentes de los Estados
30 Unidos N^{os} 6.270.964 B1 y 6.294.330 B1 para analizar las interacciones de la proteína que contiene el dominio PDZ de Dvl (que incluye cualquiera descrita en la presente memoria descriptiva) y un ligando análogo o un péptido sintético (que incluye cualquiera descrito en la presente memoria descriptiva). Además, estos procedimientos se pueden usar para evaluar la capacidad de una molécula, tal como un péptido sintético, de modular la interacción de
35 unión de la proteína del dominio de PDZ de Dvl y su ligando análogo *in vivo*.

Aplicaciones terapéuticas/profilácticas

[0158] Son útiles los compuestos que tienen la propiedad de aumentar o disminuir la actividad de la proteína PDZ de Dvl. Este aumento de la actividad puede darse en una variedad de formas, por ejemplo, administrando a un
40 sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de uno o más de los moduladores descritos en la presente memoria descriptiva.

[0159] “Antagonistas” o “moduladores negativos” incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de PDZ de Dvl y/o su(s) ligando(s) endógeno(s). De manera similar,
45 “agonistas” o “moduladores positivos” incluye cualquier molécula que imita o potencia una actividad biológica de PDZ de Dvl y/o su(s) ligando(s) endógeno(s). Las moléculas que pueden actuar como agonistas o antagonistas incluyen los moduladores de la interacción entre el ligando/aglutinante y PDZ de Dvl descrita en la presente memoria descriptiva, que incluye, pero no se limita a Ab o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de
50 ligandos/aglutinantes de PDZ de Dvl, péptidos, pequeñas moléculas orgánicas, etc.

[0160] La invención proporciona diversos procedimientos basados en el descubrimiento de diversas moléculas de unión capaces de interactuar específicamente con PDZ de Dvl, y la identificación de características únicas de las interacciones de unión entre PDZ de Dvl y los péptidos de unión al ligando.

55 **[0161]** Se pueden emplear diversas sustancias o moléculas (incluyendo péptidos, etc.) como agentes terapéuticos. Estas sustancias o moléculas se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mientras que el producto de las mismas se combina en una premezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o

estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; 5 polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, 10 PLURONICS™ o PEG.

[0162] Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución.

15

[0163] Las composiciones terapéuticas en la presente memoria descriptiva se colocan generalmente en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

20 **[0164]** La ruta de administración está de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión mediante rutas intravenosas, intraperitoneales, intracerebrales, intramusculares, intraoculares, intraarteriales o intralesionales, administración tópica, o mediante sistemas de liberación continua.

[0165] Las dosificaciones y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso concreto previsto. La determinación de la dosificación o ruta de administración adecuada está comprendida dentro de los conocimientos normales del técnico experto. Los experimentos animales proporcionan directrices precisas para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. Se puede llevar a cabo la comparación interespecífica de dosis eficaces siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" En Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi y col., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, pp. 42-96.

[0166] Cuando se emplea la administración *in vivo* de una sustancia o molécula de la invención, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Se proporcionan en la bibliografía las guías de dosificaciones y procedimientos particulares de administración; véanse, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que tiene por objetivo un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la administración de una manera diferentes de la de otro órgano o tejido.

40

[0167] Cuando se desea la administración con liberación continua de una sustancia o molécula en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración de la sustancia o molécula, se contempla la microencapsulación de la sustancia o moléculas. Se ha llevado a cabo satisfactoriamente la microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación continua con la hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleucina-2, y MN rgp120. Johnson y col., Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora y col., Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," En Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell and Newman, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), pp. 439-462; documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Patente de los Estados Unidos N^o 5.654.010.

[0168] Las formulaciones de liberación continua de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poliláctico-glicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplio intervalo de propiedades biodegradables. Los productos de degradación del PLGA, los ácidos láctico y glicólico, se pueden aclarar rápidamente en el interior del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años dependiendo de su peso y composición molecular. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), pp. 1-41.

55

Composiciones farmacéuticas

[0169] Se puede incorporar una molécula/sustancia moduladora de la invención en las composiciones, que en algunas realizaciones son adecuadas para el uso farmacéutico. Dichas composiciones comprenden normalmente la molécula de ácido nucleico, el péptido/proteína, la molécula pequeña y/o anticuerpo, y un vehículo aceptable, por ejemplo, uno que sea farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica (Gennaro, Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000)). Los ejemplos de dichos vehículos y diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, solución de Finger, disolución de dextrosa, y albúmina de suero humano al 5%. Se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. Excepto cuando un medio o agente convencional es incompatible con un compuesto activo, se contempla el uso de estas composiciones. Se pueden incorporar también compuestos activos suplementarios en las composiciones.

15

1. Consideraciones generales

[0170] Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su ruta de administración prevista, que incluye la administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal, y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicoles u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

2. Formulaciones inyectables

30

[0171] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida con el fin de administrarse usando una jeringuilla. Dichas composiciones deben ser estables durante la fabricación y el almacenamiento y deben preservarse contra la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (tal como glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y las mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, usando un revestimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas necesario en el caso de la dispersión y utilizando tensioactivos. Diversos agentes antibacterianos y antifúngicos; por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y timerosal, pueden contener contaminación de microorganismos. Los agentes isotónicos; por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio pueden estar incluidos en la composición. Las composiciones que pueden retardar la absorción incluyen agentes tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

[0172] Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (por ejemplo, cualquier sustancia/molécula moduladora de la invención) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes según se necesite, seguido por esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico, y otros ingredientes necesarios. Polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación incluyen el secado al vacío y la criocongelación que da como resultado un polvo que contiene el ingrediente activo y cualquier ingrediente deseado procedente de disoluciones estériles.

3. Composiciones orales

[0173] Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el objetivo de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en la forma de comprimidos, comprimidos

masticables, o cápsulas. Se pueden preparar también composiciones orales usando un vehículo fluido para uso como lavado bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica oralmente. Se pueden incluir agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes. Comprimidos, píldoras, cápsulas, comprimidos masticables y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina, un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido alginico, PRIMOGEL, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o STEROTES; un agente de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, o aroma de naranja.

10

4. Composiciones para inhalación

[0174] Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran como una pulverización en aerosol procedente de un nebulizador o un recipiente presurizado que contiene un propelente adecuado, *por ejemplo*, un gas tal como dióxido de carbono.

15

5. Administración sistémica

[0175] La administración sistémica puede ser también transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica, se seleccionan penetrantes que puedan permear la(s) barrera(s) diana(s). los penetrantes transmucosales incluyen, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. Se pueden usar pulverizadores nasales o supositorios para la administración transmucosal. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles, o cremas.

20

[0176] Se pueden preparar también compuestos en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

25

6. Vehículos

[0177] En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegen el compuesto frente a la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables o biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Dichos materiales se pueden obtener comercialmente de ALZA Corporation (Mountain View, CA) y NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), o prepararse por un experto en la técnica. Se pueden usar también suspensiones liposomales como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo a los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como en (Eppstein y col., Patente de los Estados Unidos N°. 4.522.811, 1985).

30

35

7. Dosificación unitaria

40

[0178] Se pueden crear formulaciones orales o composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones únicas para el sujeto que se va a tratar, que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto activo en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias está dictada por, y es directamente dependiente de, las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico deseado concreto, y de las limitaciones inherentes de la composición del compuesto activo.

45

8. Composiciones de terapia génica

50

[0179] Se pueden insertar moléculas de ácido nucleico en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Se pueden administrar vectores de terapia génica a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (Nabel y Nabel, Patente de los Estados Unidos N° 5.328.470, 1994), o mediante inyección estereotáctica (Chen y col., Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 3054-7 (1994)). La preparación farmacéutica de un vector de terapia génica puede incluir un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el vehículo de administración génica está sumergido. Alternativamente, cuando el vector de administración génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema de administración génica.

55

9. Dosificación

[0180] La composición y el procedimiento farmacéutico puede comprender además otros compuestos terapéuticamente activos que se aplican normalmente en el tratamiento de las dolencias relacionadas con la proteína Dvl (específicamente relacionadas con PDZ de Dvl).

[0181] En el tratamiento o prevención de las dolencias que requieren la modulación del ligando de PDZ de Dvl, un nivel de dosificación apropiado será aproximadamente de 0,01 a 500 mg por kg de peso corporal del paciente por día que se puede administrar en dosis individuales o múltiples. Preferiblemente, el nivel de dosificación será aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 250 mg/kg por día; más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/kg por día. Un nivel de dosificación adecuado puede ser aproximadamente de 0,01 a 250 mg/kg por día, aproximadamente de 0,05 a 100 mg/kg por día, o aproximadamente de 0,1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este intervalo, la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, 0,5, a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones se proporcionan preferiblemente en la forma de comprimidos que contienen 1,0 a 1000 miligramos del ingrediente activo, particularmente 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, y 1000,0 miligramos del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Los compuestos se pueden administrar en un régimen de 1 a 4 veces por día, preferiblemente una o dos veces por día.

[0182] Sin embargo, el nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular puede variarse y dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la extensión de la acción de este compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación del fármaco, la gravedad de la dolencia concreta, y la terapia a la que se somete el hospedador.

10. Kits de composiciones

[0183] Se pueden incluir las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) en un kit, recipiente, envase, o dispensador junto con las instrucciones de administración. Cuando se suministran como un kit, los diferentes componentes de la composición pueden envasarse en recipientes separados y premezclarse inmediatamente antes del uso. Dicho envasado de los componentes por separado permite el almacenamiento a largo plazo sin perder las funciones del componente activo.

[0184] Los kits pueden incluir también reactivos en recipientes separados que facilitan la ejecución de una prueba específica, tal como pruebas diagnósticas o tipificación de tejidos.

(a) Recipientes o frascos

[0185] Los reactivos incluidos en kits se pueden suministrar en recipientes de cualquier clase de tal forma que se preserve la vida de los diferentes componentes y no se absorba o altere por los materiales del recipiente. Por ejemplo, ampollas de vidrio selladas pueden contener la sustancia/molécula moduladora liofilizada y/o tampón que se haya envasado en gas neutro, no reactivo, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir de cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc., material cerámico, metálico o cualquier otro empleados normalmente para contener los reactivos. Otros ejemplos de recipientes adecuados incluyen botellas sencillas que se pueden fabricar de sustancias similares, como ampollas, y envolturas, que pueden consistir de un revestimiento interior de lámina, tal como aluminio o una aleación. Otros recipientes incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringuillas, o similares. Los recipientes pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que tiene un tapón que se puede perforar mediante una aguja de inyección hipodérmica. Otros recipientes pueden tener dos compartimentos que está separados mediante una membrana fácilmente retirable que tras la retirada permite a los componentes mezclarse. Las membranas retirables pueden ser de vidrio plástico, caucho, etc.

(b) Materiales para formación

[0186] Se pueden suministrar también kits con materiales de formación. Las instrucciones pueden estar impresas en papel u otro sustratos, y/o se pueden suministrar como un medio de lectura electrónica, tal como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de vídeo, disco de láser, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas no pueden estar físicamente asociadas con el kit; en vez de esto, un usuario se puede dirigir a un sitio web de Internet especificado por el fabricante o distribuidor del kit, o facilitarse como correo electrónico.

[0187] Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar las realizaciones preferidas de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones y los ejemplos relacionados que se describen en la presente memoria descriptiva. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos que siguen representan las técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención, y de esta manera, puede considerarse que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y obtener además un resultado del mismo tipo o similar.

10

EJEMPLOS

Material y Procedimientos:

15 [0188] *Materiales*- Las enzimas y el fago auxiliar M 13-KO7 eran de New England Biolabs (Ipswich, MA). Las placas Maxisorp immunoplates eran de Nalgen NUNC International (Naperville, IL). *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue y *E. coli* BL21(DE3) eran de Stratagene (La Jolla, CA). El plásmido pGEX, el anticuerpo dirigido contra GST conjugado con peroxidasa de rábano picante, la glutatión Sefarosa-4B, y Superdex-75 eran de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). 3,3', El sustrato 5,5'-Tetrametil-benzidina/H₂O₂ (TMB) peroxidasa era de Kirkegaard y Perry Laboratories, Inc. (Gaithersburg, MD). NeutrAvidin era de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL). Anti-Dv11,2,3 se adquirió de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo policlonal dirigido contra la β catenina era de Genentech, Inc. (South San Francisco, CA). La línea de células HEK293S y la línea de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas H1703 humanas eran de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). FuGene 6 era de Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania). La lipofectamina era de Invitrogen (Carlsbad, CA). Alamar Blue™ era de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

[0189] *Oligonucleótidos*- Las degeneraciones equimolares del ADN se encontraban representadas en el código IUB (K = G/T, N = A/C/G/T, V = A/C/G, W = A/T). se muestran en texto en negrita los codones degenerados Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para la construcción de bibliotecas de péptidos expresados en fagos:

30

X10a: ACATCGACAGCGCCCCCGGTGGCGA(**NNK**)₁₀TGATAAACCGATACA

[0190] *Péptidos sintéticos*- Se sintetizaron los péptidos usando los protocolos normalizados del 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Se escindieron de la resina con triisopropilsilano al 2,5% y ácido trifluoroacético en H₂O al 2,5%, y se purificaron en cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa. La pureza y la masa de cada péptido se verificaron mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas.

35

[0191] *Construcción y clasificación de la biblioteca*- Se expresaron las bibliotecas de péptidos como fusiones en el extremo C de una proteína mutante con revestimiento principal M13 diseñada para la expresión de valencia elevada [10] tal como se ha descrito. Se construyó la biblioteca del extremo N tal como se ha descrito anteriormente [11]. Cada biblioteca contenía 2 x 10¹⁰ miembros únicos.

40

[0192] Las bibliotecas se ciclaron mediante ciclos de selección de la unión con una proteína de fusión GST-Dvl2PDZ revestida en inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos como la diana de captura. Se propagaron los fagos en *E. coli* XL1-blue con el fago auxiliar M 13-KO7 e IPTG 10 μM. después de cuatro ciclos de selección de la unión, se analizaron los clones de fagos individuales en un ELISA de fagos de alto rendimiento, y los clones positivos se sometieron al análisis de la secuencia de ADN.

45

[0193] *Purificación de las proteínas*- Se produjeron proteínas de fusión GST-Dvl2PDZ y se purificaron usando el sistema de expresión pGEX *E. coli*, tal como recomendaba el fabricante. Para el dominio Dvl2PDZ, los fragmentos de proteínas se dividieron en los aminoácidos 248-364 de los que se produjeron Dv12 de longitud completa.

50

[0194] *Ensayos de afinidad*- Se determinaron las afinidades de unión de los péptidos de Dvl2PDZ como valores Cl₅₀ usando un ELISA de competición, tal como se ha descrito anteriormente [12]. El valor Cl₅₀ se definió como la concentración del péptido que bloqueó el 50% de la unión del dominio PDZ al péptido inmovilizado. Se prepararon placas de ensayo inmovilizando un péptido biotinilado amino terminalmente (KWYGWL-COOH) sobre inmunoplasmas Maxisorp revestidas con neutravidina y se bloquearon con BSA. Se preincubó una concentración fija de proteína de fusión GST-PDZ (600 nM) en PBS, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1% (tampón PBT) durante 1 h con diluciones en serie del péptido y a continuación se transfirió a las placas de ensayo. Después de 15 min de incubación, se lavaron

55

las placas con PBS, Tween 20 al 0,05%, se incubaron con una mezcla de anticuerpo dirigido contra GST (0,5 µg/ml) y anticuerpo dirigido contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (dilución 1:2000) en tampón PBT, se lavaron de nuevo, y se detectaron con sustrato de peroxidasa TMB.

- 5 **[0195]** Se midieron también las afinidades de unión de los péptidos sintéticos mediante ensayo de polarización de fluorescencia. Se incubó una dilución en serie del polipéptido del dominio Dvl2PDZ (1-10 µM) con 10 nM del péptido de la sonda (FAM-KWYGWLCOOH) en PBS, Triton X100 al 0,1% como 30 µl de volumen en placas HE96 de 96 pocillos negros (LJL Biosystems, Inc, CA), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo las medidas de polarización en un lector de placas Analyst (LJL Biosystems, Inc., Sunnyvale, CA). Se derivó K_S
- 10 = 536 nM de este ensayo mediante el ajuste de regresión no lineal con KaleidaGraph™. Se llevaron a cabo experimentos de competición mediante la adición de una dilución en serie de los péptidos libres (0-500 µM) a una disolución con 10 nM de sonda y 1 µM de Dvl2PDZ. Se midió la polarización y se derivaron los valores K_i tal como se ha descrito anteriormente. Se calcularon los valores K_i tal como se ha descrito anteriormente [15].
- 15 **[0196]** *Ensayos de interacción de proteínas in vitro*- La proteína de fusión GST o GST-DVLpep (GST fusionada con el péptido GGGKWYGWL en su extremo C) se unió a la glutatión Sefarosa-4B siguiendo los protocolos normalizados, y las proteínas unidas se cuantificaron mediante SDS-PAGE usando cantidades conocidas de BSA como patrones. Las perlas que llevaban la proteína (2-10 µg) se incubaron con un extracto celular de células HEK293S durante la noche a 4°C. Se prepararon los extractos celulares lisando las células en tampón de lisis SJC.
- 20 Se determinó la concentración de la proteína completa mediante el kit de la proteína BCA (Promega; Madison, WI) y se normalizó a 1 mg/ml. Se lavaron las perlas con tampón de lavado (PBS, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%) durante 10 veces y se volvieron a suspender en tampón de muestra SDS, se incubaron a 90°C durante 10 min y se sometió el sobrenadante a SDS-PAGE. Las proteínas unidas se transfirieron mediante anti-Dvl1, anti-Dvl2 y anti-Dvl3 y se analizaron mediante Li-core™:
- 25 **[0197]** *Cultivo celular, transfección y tratamiento peptídico*. Se propagaron HEK293 y H 1703 de acuerdo con las instrucciones de la American Type Culture Collection. Se transfectaron células HEK293 con FuGene& de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Molecular Biochemicals) hasta una confluencia celular del 50%. Se transfectaron células H1703 con Lipofectamina de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta una
- 30 confluencia celular del 80%. Se trataron las células con medio que contenía péptido (5 µM-40 µM) 24 horas después de la transfección, y se recogieron de manera rutinaria 24 horas después del tratamiento peptídico para los ensayos adicionales.
- [0198]** *Ensayo TOPGLOW*: Se plaquearon las células en placas de 12 pocillos. Se transfectó el plásmido indicador
- 35 TOPGLOW transitoriamente en células tal como se ha descrito anteriormente. Se determinó la transcripción génica mediada por TCF mediante la actividad de la luciferasa pTOPGLOW, que se normalizó para las actividades relativas a la luciferasa del pRL indicador (control interno transfectado simultáneamente). Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.
- 40 **[0199]** *Western Blot*: Las células recogidas se lisaron con tampón de lisis SJC, se sometió el sobrenadante a SDS-PAGE, que se transfirió, bloqueó e inmunotransfirió con un anticuerpo primario adecuado mediante un protocolo normalizado de transferencia western. Se añadieron anticuerpos secundarios marcados para la fluorescencia (anticuerpo de cabra Alexa dirigido contra IgG de ratón o de conejo) y se analizaron los resultados mediante Licore™.
- 45 **[0200]** *Ensayo de viabilidad celular*: Se sembraron las células en placas de 96 pocillos de paredes negras por triplicado y se trataron con diversas dosis de péptidos en el Día 0 y se incubaron a 37°C en una estufa de incubación húmeda a 37°C con CO₂ al 5%. Después de 72 horas, se llevó a cabo el ensayo Alamar Blue de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el perfil del crecimiento celular, se sembraron las células en placas de 96 pocillos
- 50 de paredes negras por triplicado y se trataron con 10 µM de péptido o DMSO en el Día 0, y se midió la viabilidad celular mediante el ensayo Alamar Blue después de 24, 48 y 72 horas.

RESULTADOS

- 55 **[0201]** *Péptidos seleccionados para la unión a Dvl2PDZ*- Se utilizaron bibliotecas de péptidos expresadas en fagos para seleccionar ligandos que se unan a Dvl2PDZ, tal como se ha descrito anteriormente [12]. Se utilizaron bibliotecas de decapeptidos fusionadas al extremo C o al extremo N de la proteína revestida de fago. La biblioteca contenía codones degenerados NNK que codificaban los 20 aminoácidos naturales. La posible incidencia de codones de detención ámbar en el codón degenerado proporcionó también la expresión de péptidos más cortos para

la biblioteca C terminal. Cada biblioteca se cicló a través de cuatro ciclos de selección de la unión con la proteína de fusión GST-Dvl2PDZ inmovilizada como el objetivo de la captura.

[0202] La secuenciación de los 90 clones de la biblioteca C terminal desveló un único motivo de unión (Fig. 1A).

5 Los motivos de unión contienen una Gly muy conservada en la posición -2, Trp/Tyr en la posición -1, Phe/Leu en la posición 0 y un resto hidrófobo o aromático en la posición -3, que es diferente de cualquier motivo de unión a PDZ general conocido. De manera interesante, este motivo de unión se conserva en la proteína disheveled ortóloga en *C. elegans*. (no se muestran los datos).

10 **[0203]** La secuenciación de los 127 clones de la biblioteca N terminal desveló 4 tipos de motivos de unión internos (Fig. 1B). Los motivos de tipo I y tipo II son similares a los derivados de la biblioteca C terminal. Para facilitar la referencia en la presente memoria descriptiva, los inventores designaron el mismo sistema de numeración de posiciones de la secuencia consenso, esto es, la secuencia central del tipo I y el Tipo II es Tyr⁻³Gly⁻²Trp [Ile/Val]⁰ (Fig. 1B). Los dos tipos de motivos difieren en el resto que sigue a la posición 0. Para el tipo I, una secuencia
15 enlazadora de tri-glicina invariable sigue a Ile/Val⁰, mientras que el tipo II tiene una ASP muy conservada en la posición 1 seguida por un enlazador de tri-glicina. Además, el tipo I tiene una preferencia ligeramente mayor por Asp en la posición -4 que el tipo II.

[0204] Los motivos de tipo III y tipo IV representan modelos de unión completamente diferentes. Estos dos tipos
20 comparten un motivo WXDXP central, con diferencias principales en X así como posiciones flanqueantes. Usando el mismo sistema de numeración de posiciones que se ha descrito anteriormente, los inventores designaron las posiciones centrales como Trp⁻¹X⁰Asp¹X²P³. El motivo de tipo III prefiere Ser/Thr en la posición 0, Ile/Phe/Leu en la posición 2, Leu en la posición -2, y en general Leu/Val en la posición -3; mientras que el motivo de tipo IV prefiere Ile/Val en la posición 0, Gly en la posición 2, promiscuo (una variedad de aminoácidos) en la posición -2 y en general
25 Glu en la posición -3. La Pro muy conservada en la posición 3 para ambos tipos indica que se requiere un péptido estructurado para dicho tipo de interacción entre el ligando y el dominio PDZ de Dvl. Trp se conserva en todos los tipos de ligandos de PDZ de Dvl, sugiriendo su papel como punto de anclaje para la unión del ligando. La Asp¹ muy conservada puede imitar la interacción general entre los dominios PDZ con un grupo carboxilo libre. Las diferencias de la posición -3, -2, 0 y/o 2 entre el motivo de tipo III y el motivo de tipo IV sugieren que la coordinación de estas
30 posiciones está asociada con la especificidad diferente de los ligandos.

[0205] *Ensayos de afinidad con péptidos sintéticos*- Los péptidos que corresponden a la secuencia seleccionada dominante (KWYGWL_{COOH} (D1)) y sus derivados con una única mutación, así como la extensión N-terminal (D2-4) se sintetizaron y probaron para la unión a Dvl2PDZ (Tabla 1). El péptido D1 se unió con alta afinidad (CI₅₀ = 1,3 μM),
35 mientras que un péptido con sustitución de Leu con Phe en la posición 0 (2) se unió con aproximadamente similar afinidad (CI₅₀ = 0,93 μM). Se encontró también que un resto hidrófobo o aromático, especialmente un Trp, en las posiciones en la dirección 5' del ligando aumentaría la afinidad de unión significativamente, tal como se observa con los péptidos con una extensión de Trp en la posición -6 (D3 y D4). Las afinidades de unión de estos péptidos aumentaron hasta 10 veces. Wong y col., han notificado que la afinidad de unión entre un ligando peptídico interno
40 Frizzled y DvlPDZ eran de 9,5 μM, y que dicha interacción juega un importante papel en la transducción de la señal Wnt [3]. Los ligandos peptídicos DvlPDZ derivados de fago de los inventores se unen a DvlPDZ con hasta 100 veces mayor afinidad en comparación con las interacciones naturales, y son por tanto, potenciales antagonistas para la ruta de señalización de Wnt.

45 **Tabla I. Valores CI₅₀ para la unión de los péptidos sintéticos a Dvl2PDZ**

[0206] Los valores CI₅₀ son las concentraciones promedio de péptidos que bloquearon el 50% de la unión de Dvl2PDZ a un ligando peptídico de alta afinidad en un ELISA de competición. Los extremos N de los péptidos en la serie se acetilaron.

50

ID del péptido	Secuencia							CI ₅₀ (μM)
D1		K	W	Y	G	W	L	1,34 ± 0,21
D2		K	W	Y	G	W	F	0,93 ± 0,20
D3	W	K	W	Y	G	W	L	0,14 ± 0,01
D4	W	K	W	Y	G	W	F	0,31 ± 0,06
D5		K	G	F	G	M	L	242,9 ± 73,8

[0207] Mediante una búsqueda en la base de datos con el motivo consenso de [YLFII]G[WMFY][FL]_{COOH}, los

inventores identificaron un ligando natural potencial de Dvl, una ubiquitina proteína ligasa E3A humana (UBE3A), que contenía la secuencia con extremo C de YAKFGMLCOOH [13]. Se sintetizó el hexapéptido que correspondía a esta secuencia (KGFGMLCOOH) (D5) y se probó para la afinidad. Se unió a Dvl2PDZ con una afinidad mucho más débil ($CI_{50} = 242 \mu\text{M}$) en comparación con D1 o D2, indicando que Trp en la posición -1 es energéticamente importante para una estrecha unión. Sin embargo, debido a que la interacción proteína-ligando incluso a $200 \mu\text{M}$ se ha pensado que es biológicamente relevante basándose en estudios previos sobre la interacción MagiPDZ2-PTPN [14], la débil interacción entre UBE3A y Dvl es por tanto posible.

[0208] Se usó el ensayo de polarización de la fluorescencia para medir la afinidad de dos ligandos peptídicos internos N2 y N3 con el dominio DvlPDZ. Véase la Tabla II. El valor K_i de D1 medido mediante este procedimiento es de 725 nM, que es consistente con el valor CI_{50} medido mediante el ELISA de competición (Tabla I). Debido a que los motivos de N2 y D1 son bastante similares, se esperaba que la afinidad de N2 con DvlPDZ sería similar a la de D1 ($K_i = 1,2 \mu\text{M}$), mientras que N3 tiene un motivo de unión distinto entre D1 y N2, y la afinidad de N3 ($K_i = 4,6 \mu\text{M}$) fue 6 veces menor que la de D1, indicando un modelo de unión distinto entre el dominio DvlPDZ y el ligando N3 procedente del de D1 o N2

Tabla II. Valores de K_i medidos mediante el ensayo de polarización de la fluorescencia para la unión de los péptidos sintéticos a Dvl2PDZ.

Los valores de K_i se midieron y calcularon tal como se describe en materiales y Procedimientos. Se acetilaron los extremos N de los péptidos en la serie. Los extremos C de N2 y N3 se amidaron.

ID del péptido	Secuencia											K_i (nM)
D1	K	W	Y	G	W	L						725,1
N2	G	W	K	D	Y	G	W	I	D	G		1211,1
N3	G	E	I	V	L	W	S	D	I	P	G	4618,9

[0209] El ligando peptídico de DvlPDZ interactúa con los 3 Dvl endógenos: Existen 3 genes en la codificación humana de tres proteínas Disheveled (Dvl1, Dvl2 and Dvl3). Las homologías globales entre estas proteínas son ~60%. En particular, los dominios PDZ de las tres proteínas Dvl son muy homólogos entre sí (>85%). Por tanto, aunque el péptido D1 sea el ligando derivado del fago con Dvl2PDZ, los inventores creen que se uniría también igualmente a los otros dos dominios PDZ de Dvl. Para confirmar que D1 se uniría a las tres proteínas Dvl endógenas *in vivo*, se construyó una construcción de fusión con GST en la que el extremo C de GST se fusionaba con la secuencia D1 unida con 3 Gly (GST-Dvlpep) y se conjugó a la glutatión sefrosa-4B. Se ensayó el lisado celular de HEK293 para la interacción de proteínas *in vitro* mediante tanto perlas de GST solas como conjugadas con GST-Dvlpep. Se pudieron detectar las tres Dvl endógenas en el lisado celular bruto de HEK293, y se pudo ensayar la interacción de las proteínas *in vitro* mediante GST-Dvlpep tal como se esperaba (Fig. 2B).

[0210] Inhibición de la ruta Wnt general mediante el ligando peptídico DvlPDZ: para investigar los efectos de los ligandos peptídicos de DvlPDZ sobre las células que son sensibles a la señalización de Wnt, los inventores sintetizaron ligandos peptídicos penetradores de las células para DvlPDZ que tenían las siguientes secuencias:

(i) Ac-RQIKIWFQNRMMKWKKKWYGWL (DVLp_C),

(ii) Ac-RQIKIWFQNRMMKWKKGWIDYGWIDG (DVLp_N2),

(iii) Ac-RQIKIWFQNRMMKKGIVLWSDIPG (DVLp_N3),

(iv) Ac-RQIKIWFQNRMMKWKKGSGNEVWIDGPG (DVLp_N4); y

(v) Ac-RQIKIWFQNRMMKWKK (PEN) – un péptido del control negativo solo con una secuencia penetradora de las células.

[0211] Los inventores ensayaron los efectos usando el ensayo TopGlow normalizado. Se transfectaron células HEK293 con el gen TopGlow y se trataron las células con diferentes dosis de péptidos DVLp_C, DVLp_N2, DVLp_N3, DVLp_N4 o PEN (5-20 μM en el medio) 24 horas después de la transfección. A concentraciones de hasta 20 μM , dos de cuatro ligandos peptídicos de DvlPDZ, DVLp_C y DVLp_N3, inhibió la actividad transcripcional

estimulada por Wnt3a significativamente (Fig 3A) y los efectos de inhibición fueron de manera dependiente de la dosis (Fig 3B y 3C). Concretamente, DVLp_N3 podría inhibir hasta un 80% de la actividad transcripcional estimulada por Wnt3a, mientras que DVLp_C consiguió aproximadamente un 50% de inhibición. Las células tratadas con PEN no muestran en efecto de inhibición. Véase la Fig. 3. Los inventores compararon el nivel de la β catenina en el lisado celular completo con tratamientos de DMSO, DVLp_C, DVLp_N3 o PEN, y se encontró que las células tratadas con DVLp_C and DVLp_N3 tuvieron niveles de β -catenina significativamente menores en comparación con los de las células tratadas con DMSO y PEN tras la estimulación con Wnt3a. Véanse las Figs. 3D y 3E. la inhibición de la señalización de la β -catenina estimulada por Wnt y la reducción del aumento estimulado por Wnt en el nivel de la proteína β -catenina producido por el tratamiento con los péptidos del ligando de DvlIPDZ sugiriendo que el dominio PDZ de Dvl está comprometido en una interacción que está implicada en la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina, que puede estar antagonizada mediante, por ejemplo, los ligandos peptídicos de DvlIPDZ DVLp_C y DVLp_N3.

[0212] El ligando peptídico de DvlIPDZ puede suprimir el crecimiento de células cancerosas: Se ha notificado la expresión en exceso de Dvl3 en (6 de 8) muestras tumorales de cánceres de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [7]. Se demostró que la supresión de Dvl con ARNip bloqueaba la señalización de la β -catenina estimulada por Wnt y suprimía el crecimiento de la línea de células NCI-H 1703 del NSCLC [7]. Para evaluar el efecto del ligando peptídico de DvlIPDZ sobre una línea de células del NSCLC, se trataron células NCI-H1703 con DVLp_C, y se midió la señalización de la β -catenina estimulada por Wnt mediante el ensayo TopGlow. Similar a las células HEK293D, la actividad transcripcional estimulada por Tcf de NCI.H1703 se inhibió significativamente mediante el tratamiento con DVLp (Fig 4). Para probar el efecto del ligando peptídico de DvlIPDZ sobre el crecimiento celular del NSCLC, los inventores trataron NCI-H 1703 con DVLp_C o PEN a las dosis de 0,25 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M en el día 0, se incubó durante 72 horas, y se evaluó la viabilidad celular con la técnica Alamar blue tal como se ha descrito anteriormente. Sin la estimulación de Wnt3a, las células tratadas con DVLp_C mostraron mucha menor viabilidad que las células tratadas con PEN a una dosis peptídica de 10 μ M; con estimulación de Wnt3a, podría observarse una menor viabilidad de las células tratadas con DVLp_C en comparación con las células tratadas con PEN a una dosis peptídica de 5 μ M (Fig 5A). Además, tal como se ha indicado en la Figura 5B, el perfil de crecimiento celular de las células NCI-H1703 tratadas con DVLp-C fue mucho más lento que el de las células tratadas con DMSO o PEN. Estos resultados indicaron que los ligandos peptídicos de DvlIPDZ de alta afinidad descritos en la presente memoria descriptiva podrían suprimir eficazmente el crecimiento de células tumorales, tales como de células de NSCLC.

CONCLUSIÓN

[0213] Los ligandos peptídicos de DvlIPDZ derivados de fagos presentan una alta afinidad de unión con Dvl2PDZ *in vitro*, con afinidades aproximadamente 100 veces mayores que la afinidad de unión notificada entre el dominio PDZ de Dvl y su ligando natural, la secuencia interna en la región con extremo C de Frizzled [3]. Los datos notificados en la presente memoria descriptiva muestran que los dos ligandos peptídicos de DvlIPDZ penetradores de células (DVLp_C y DVLp_N3) bloquearon la señalización de la β -catenina estimulada por Wnt en células HEK293S y una (DVLp_C) también en NCI-H 1703, probablemente mediante una interacción mediada por el dominio PDZ de Dvl. En particular, el bloqueo de la señalización de la β -catenina estimulada por Wnt de NCI-H1703, una línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas, mediante el ligando peptídico de DvlIPDZ, DVLp_C suprimió eficazmente el crecimiento celular. Los ligando peptídicos de DvlIPDZ derivados de fagos descritos en la presente memoria descriptiva son pequeñas moléculas que conducen potencialmente al tratamiento del cáncer, y se pueden usar además para identificar moduladores de PDZ de Dvl adicionales para su uso como agentes diagnósticos y terapéuticos.

LISTADO PARCIAL DE REFERENCIAS

[0214]

1. Polakis, P., Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000. 14(15): p. 1837-51.
2. Wharton, K.A., Jr., Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol*, 2003. 253(1): p. 1-17.
3. Wong, H.C., y col., Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C terminal region of Frizzled. *Mol Cell*, 2003. 12(5): p. 1251-60.
4. Oshita, A., y col., Identification and characterization of a novel Dvl-binding protein that suppresses Wnt signalling pathway. *Genes Cells*, 2003. 8(12): p. 1005-17.

5. Cheyette, B.N., y col., Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev Cell*, 2002. 2(4): p. 449-61.
- 5 6. Zhang, L., y col., Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *J Biol Chem*, 2006.
7. Uematsu, K., y col., Activation of the Wnt pathway in non-small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene*, 2003. 22(46): p. 7218-21.
- 10 8. Uematsu, K., y col., Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res*, 2003. 63(15): p. 4547-51.
9. Shan, J., y col., Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain. *Biochemistry*, 2005. 44(47): p. 15495-503.
- 15 10. Held, H.A. y S.S. Sidhu, Comprehensive mutational analysis of the M13 major coat protein: improved scaffolds for C-terminal phage display. *J Mol Biol*, 2004. 340(3): p. 587-97.
11. Sidhu, S.S. y col., Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol.*, 2000. 328: p. 333-20 63.
12. Laura, R.P., y col., The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF. *J Biol Chem*, 2002. 277(15): p. 12906-14.
- 25 13. Huang, L., y col., Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, 1999. 286(5443): p. 1321-6.
14. Fuh, G., y col., Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. *J Biol Chem*, 2000. 275(28): p. 21486-91.
- 30 15. Keating, S., y col., Putting the pieces together: Contribution of fluorescence polarization assays to small molecule lead optimization. *Proceedings of SPIE*, 2000. 3913: p. 128-137.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que comprende un extremo C que se une específicamente a PDZ de Disheveled (Dvl), en el que dicho extremo C consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
5 consiste en: KWYGWL, KWYGF, WKWYGWL, y WKWYGF, y en el que el polipéptido se une a PDZ de Dvl con una afinidad de unión de $CI_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ o mejor, en el que CI_{50} es la concentración de polipéptido que bloquea el 50% de la unión del dominio PDZ de Dvl a KWYGWL-COOH tal como se determinó usando el ELISA de competición.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido inhibe la señalización de Wnt mediada por Dvl endógena.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une específicamente a PDZ de Dvl con una afinidad de unión de $CI_{50} = 1,0 \mu\text{M}$ o mejor.
- 15 4. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une específicamente a PDZ de Dvl con una afinidad de unión de $CI_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ o mejor.
5. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido se une específicamente a PDZ de Dvl con
20 una afinidad de unión de $CI_{50} = 0,2 \mu\text{M}$ o mejor.
6. El polipéptido aislado de la reivindicación, en el que Dvl es Dvl 1, 2 y/o 3 humanas.
7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido está unido a una
25 etiqueta de la secuencia de aminoácidos que potencia la entrada del polipéptido a la célula.
8. El polipéptido de la reivindicación 7, en el que la etiqueta de la secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de RQIKIWFQNRRMKWKK.
- 30 9. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en KWYGWL, KWYGF, WKWYGWL, WKWYGF y RQIKIWFQNRRMKWKKKWYGWL.
10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido aislado de cualquiera de las
reivindicaciones anteriores.
- 35 11. Un polipéptido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicho polipéptido.
- 40 12. Un procedimiento para identificar un compuesto capaz de modular la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una muestra que comprende:
- (i) PDZ de Dvl o uno de sus fragmentos;
- 45 (ii) uno o más de los polipéptidos de cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
- y
- (iii) un compuesto candidato;
- 50 y determinar la cantidad de interacción entre PDZ de Dvl y dicho polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en presencia del compuesto candidato;
- por lo que un cambio en la cantidad de interacción entre PDZ de Dvl y dicho polipéptido de cualquiera de las
55 reivindicaciones anteriores en presencia del compuesto candidato en comparación con la cantidad en ausencia del compuesto indica que el compuesto candidato es un compuesto capaz de modular la interacción entre el ligando y PDZ de Dvl.

FIG. 1A

POS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
S	W	W	N	K	C	Y	G	W	F	
N	K	R	Y	T	V	L	G	W	F	
I	V	R	W	T	L	L	G	I	F	
T	S	S	W	K	W	Y	G	W	L	
P	R	I	F	K	D	Y	G	M	F	
Y	W	T	R	T	F	Y	G	F	F	
	N	R	W	R	L	L	G	W	F	
T	S	W	C	K	W	Y	G	W	L	
F	W	I	Y	K	Y	Y	G	R	F	
	D	R	I	R	F	L	G	W	F	
A	V	R	W	L	F	L	G	W	F	
R	S	G	H	R	F	L	G	W	F	
		S	W	K	L	L	G	F	F	
T	S	F	L	K	G	Y	G	W	L	
S	I	S	Y	W	F	Y	G	W	L	
L	L	F	L	K	Y	Y	G	W	L	
S	T	R	H	Y	R	T	W	W	F	
	N	V	F	R	F	F	G	W	L	
		T	W	R	V	L	G	W	F	
		N	W	K	W	Y	G	F	F	
			Y	T	F	F	G	W	F	
	S	H	F	K	F	F	G	W	F	
	N	R	I	P	C	L	G	G	W	
S	P	R	F	T	F	L	G	W	F	
R	I	V	S	F	F	Y	G	W	L	
			Y	F	F	Y	G	W	F	
T	P	L	Y	N	Y	F	G	G	L	
T	V	R	W	V	F	F	G	F	F	
R	T	R	F	T	C	F	G	W	F	
M	T	K	W	I	W	Y	G	W	L	
R	I	S	W	T	F	L	G	Y	F	
R	P	F	C	T	F	L	G	W	F	
S	W	Y	F	K	F	Y	G	W	L	
I	T	R	Y	T	F	F	G	F	F	

Figura 2

A.

hDvl1	D A I V RHH D	60
hDvl2	E T V I KYII E	60
hDvl3	E S I I KYII E	60
wDsh-1	---AA I E S DVI I I DTVII TSHC I I VAI	56

hDvl1	DV I RHH E SQT S T	112
hDvl2	DM I D HKP V	112
hDvl3	E I E I E HKP T	112
wDsh-1	A ETSR FT Q D EA SRR K SFENGQSCFT	112

B.

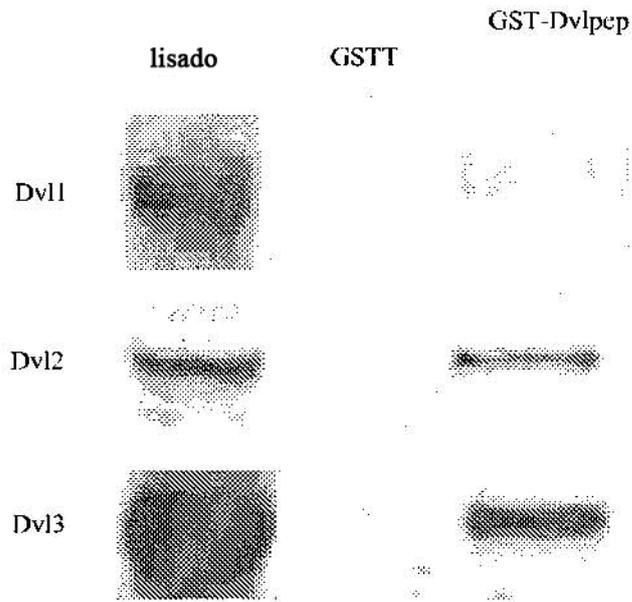
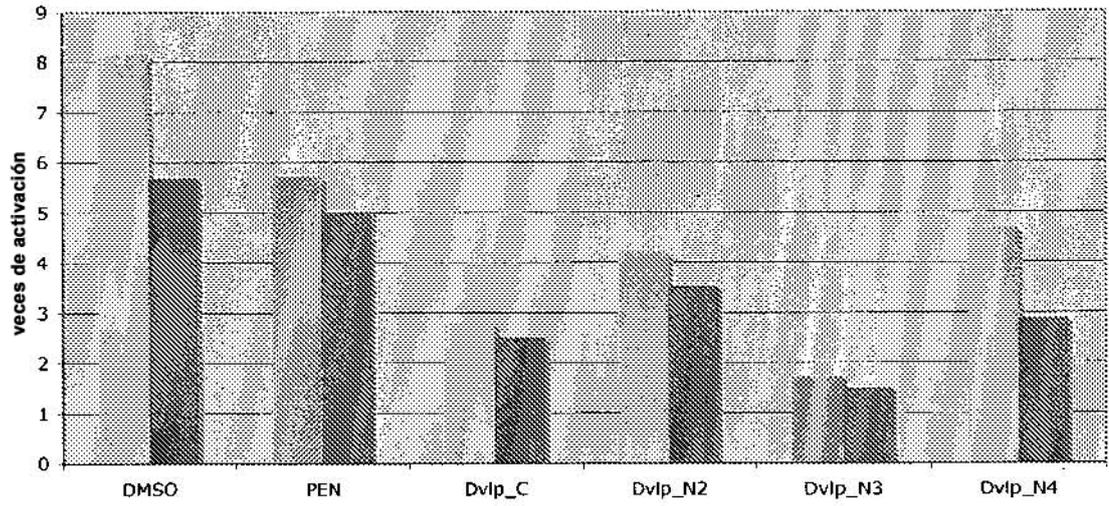
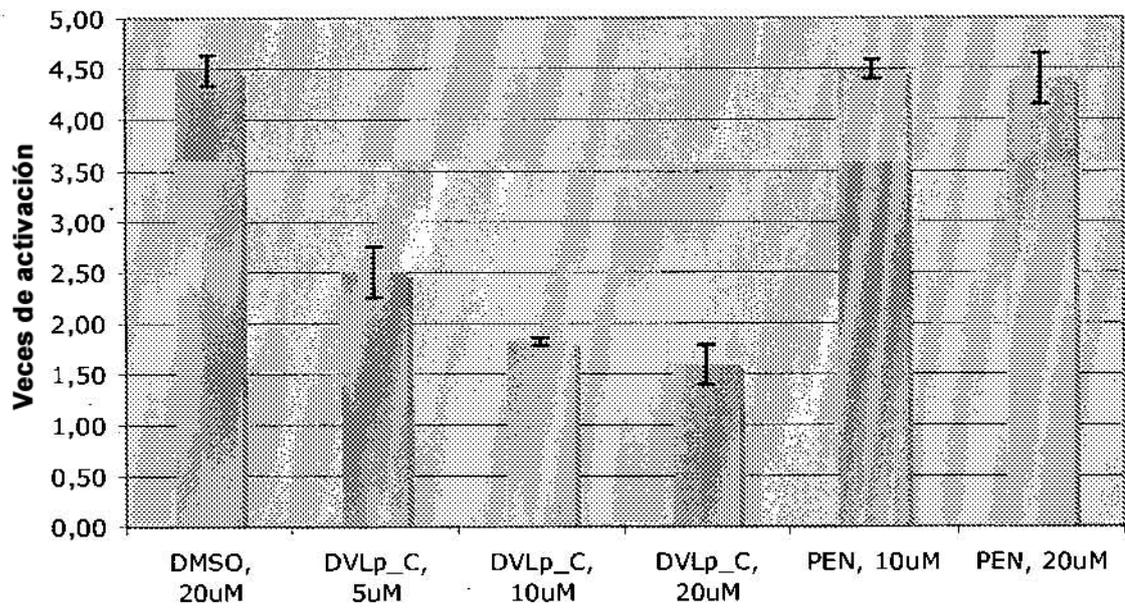


Figura 3

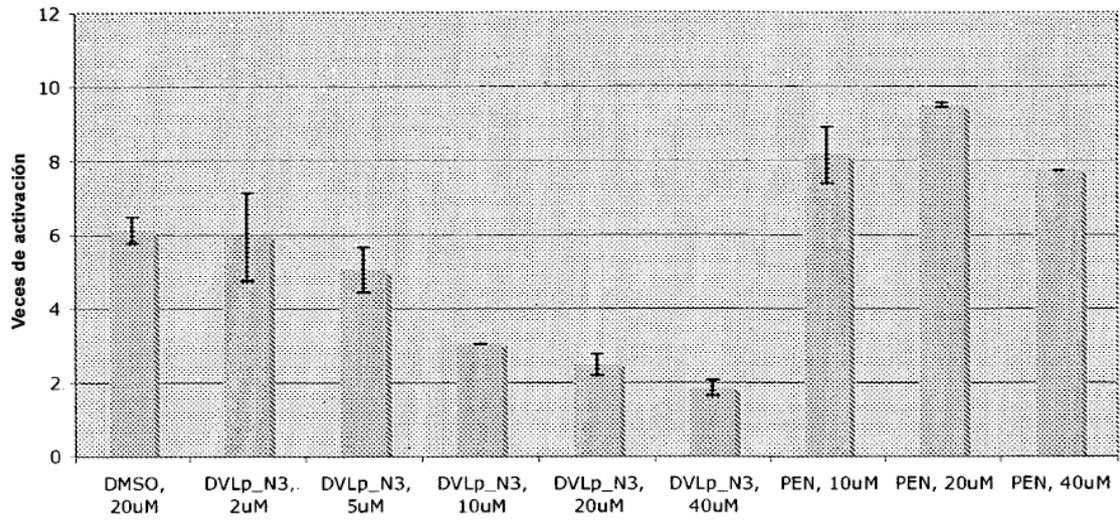
A.



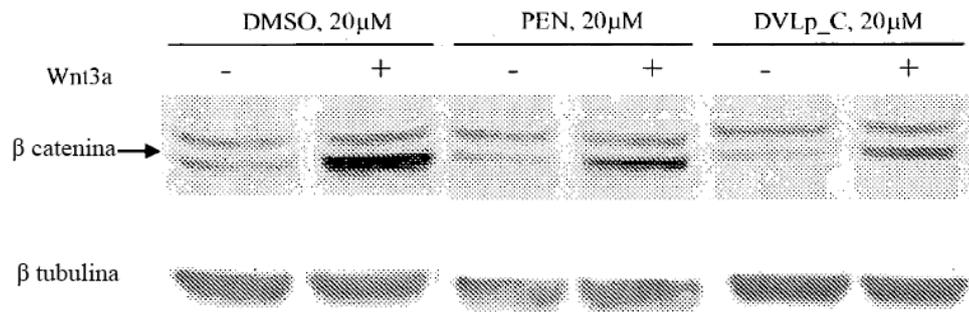
B.



C.



D.



E.

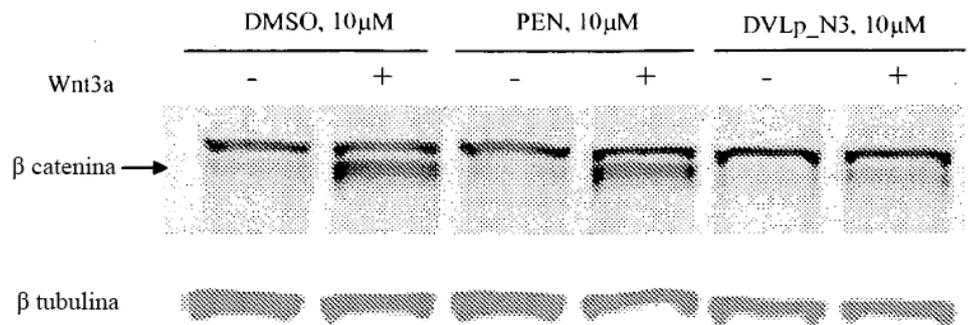


Figura 4

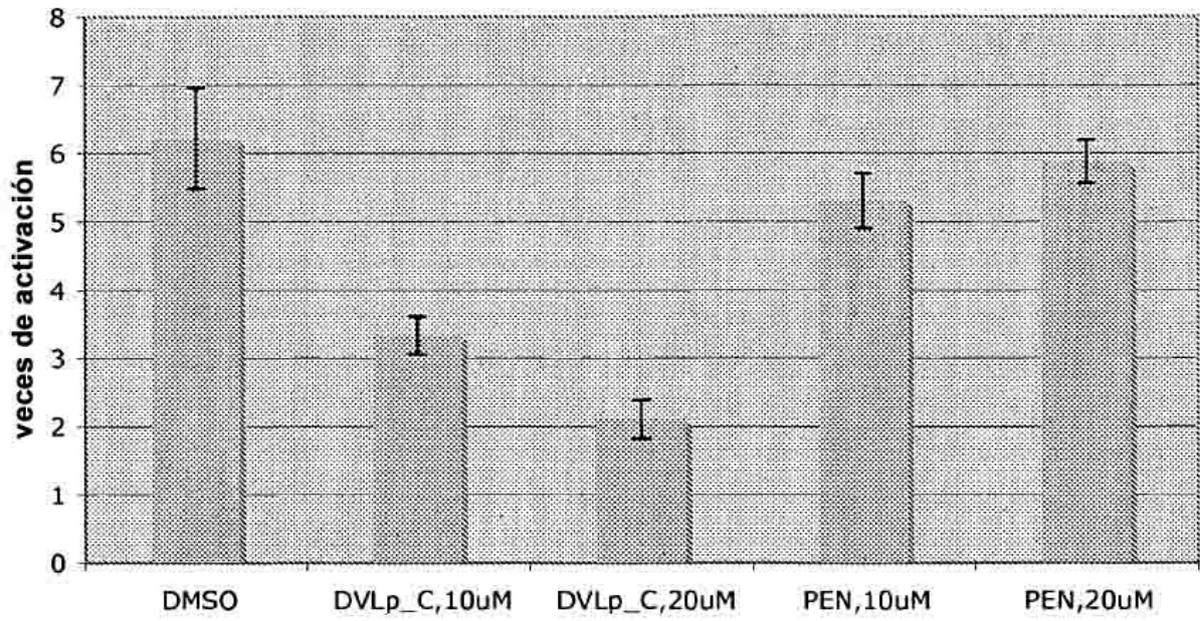
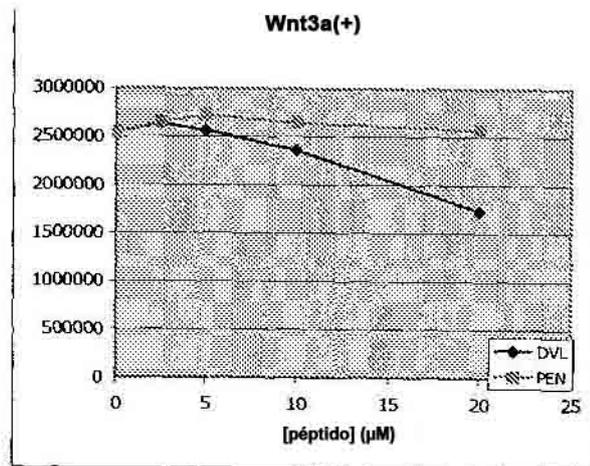
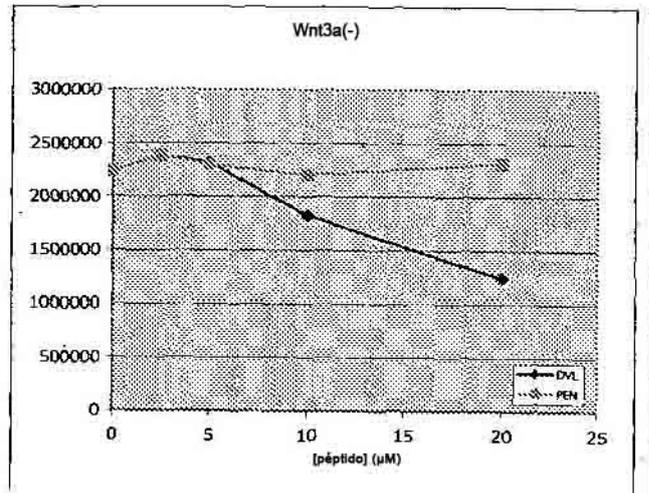


Figura 5

A.



B.

