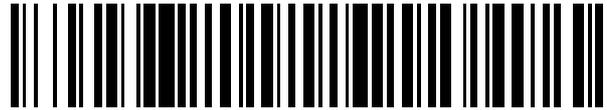


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 246**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2006 E 06703354 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 1838350**

54 Título: **Moduladores de la actividad ubiquitinasa Itch**

30 Prioridad:

20.01.2005 GB 0501202
24.01.2005 US 646425 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2014

73 Titular/es:

RYBOQUIN COMPANY LIMITED (100.0%)
Ettrick Riverside, Dunsdale Road
Selkirk TD7 5EB , GB

72 Inventor/es:

MELINO, GENNARO;
ROSSI, MARIO y
SALOMONI, PAOLO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 524 246 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 la actividad ubiquitinasa Itch

Resumen de la invención

5 La presente invención se refiere a la identificación de nuevas dianas de fármacos para terapias de trastornos que incluyen el cáncer. En particular, la presente invención se refiere a la inhibición de la ligasa de ubiquitina E3, Itch, como medio para tratar trastornos. Además, la presente invención se refiere a la regulación de la estabilidad de p63 y p73 en células. En particular, la invención se refiere a la modulación de la regulación de la estabilidad de p63 y p73 en células mediante la modulación de la expresión o actividad de Itch. Además, la invención se refiere al uso de Itch como una diana para el desarrollo de agentes capaces de modular la estabilidad de p63 o p73, y en especial
10 agentes capaces de modular la interacción de Itch y p63 o p73. Dichos agentes pueden ser útiles en aplicaciones terapéuticas incluyendo el tratamiento del cáncer y la modulación de la diferenciación de la piel.

Antecedentes de la invención

Aunque la comprensión de los mecanismos y el posible tratamiento del cáncer han aumentado a lo largo de los últimos años, el cáncer sigue siendo una causa principal de muerte en todo el mundo desarrollado. Procedimientos
15 no específicos para el tratamiento del cáncer, tales como la cirugía, radioterapia y quimioterapia generalizada, han tenido éxito en el tratamiento de algunos cánceres sólidos en la circulación y de crecimiento lento. Sin embargo, muchos tipos de cánceres son, en general, muy resistentes a los tratamientos convencionales. Por consiguiente, son necesarias terapias para el cáncer adicionales y más eficaces.

El desarrollo de nuevas terapias depende de la identificación de dianas adecuadas para la actividad del fármaco.

20 El gen supresor de tumores p53 induce la detención del ciclo celular y promueve la apoptosis previniendo así la transformación de células. La inactivación del gen supresor de tumores p53 es el defecto genético más común que afecta a más de la mitad de todos los tumores humanos. La proteína p53 es estabilizada en respuesta al estrés genotóxico, cambios metabólicos y otros sucesos potencialmente peligrosos que pueden producir la transformación de células.

25 p63 y p73 son miembros de la familia p53 de factores de transcripción y se ha mostrado que actúan en una ruta paralela a la de p53, siendo regulados por aumento en respuesta al daño al ADN e induciendo detención del crecimiento y apoptosis en una ruta independiente de p53. La regulación y función de p63 y p73 se revisa en Melino et al. 2003. Ambos inducen la detención del ciclo celular y apoptosis y se ha mostrado recientemente que actúan como supresores tumorales in vivo (Flores et al., 2005).

30 La importancia de p63 y p73 en la supresión tumoral se demuestra al encontrar que la alteración de p63 y p73 en células p53^{-/-} aumenta su capacidad de transformación. Recientemente, se ha mostrado que las mutaciones de p53 específicas encontradas normalmente en cánceres tales como el síndrome de Li Fraumeni, conducen a la inactivación funcional de p73 y p63, y por lo tanto la inactivación de p63 y p73 es importante para la carcinogénesis in vivo (Lang et al., 2004; Olive et al., 2004).

35 Tanto p63 como p73, al igual que p53, tienen una estructura modular (figura 1A) (Kaghad, 1997). Comparten un grado alto de homología de la secuencia con p53 y se pueden unir a elementos sensibles a p53 que activan la transcripción de genes diana de p53, tales como los que inducen la detención del ciclo celular y promueven la apoptosis (Catani, 2002; De Laurenzi, 1998; De Laurenzi, 2000).

40 Sin embargo, a diferencia de p53, p73 y p63 son expresados como isoformas diferentes (Kaghad, 1997; Ueda, 1999) algunas de las cuales carecen del dominio de transactivación y se cree que actúan como proteínas negativas dominantes (Melino, G et al.). La mayor parte de la variación generada por el corte y empalme alternativo se produce en el extremo 3', en una parte de la secuencia que no tiene un equivalente en p53. La existencia de estas isoformas variantes ha hecho difícil determinar la importancia de p63 y p73 en la supresión tumoral. Sin embargo, un trabajo reciente usando ratones mutantes para p63/p73 ha demostrado claramente que ambas proteínas tienen funciones
45 supresoras de tumores independientes de p53. Además, los ratones mutantes para p63 y p73 tienen predisposición a tumores epiteliales agresivos comunes en seres humanos (p. ej., adenocarcinomas de pulmón y mamario), a diferencia de los ratones mutantes para p53, que desarrollan principalmente linfomas tímicos y sarcomas (Flores et al., 2005).

50 Al menos seis proteínas diferentes p73 (de α a η) son generadas (De Laurenzi, 1999; De Laurenzi, 1998; Ueda, 1999) mientras que al menos tres proteínas diferentes p63 son generadas como formas isómeras de corte y empalme alternativo C-terminal. Además, tanto los genes de p63 como p73 explotan un promotor alternativo y un exón extra (exón 3') para generar isoformas truncadas N-terminales (Δ Np63 y Δ Np73). Estas variantes carecen del dominio de transactivación y actúan como "negativos dominantes", bloqueando la función de proteínas de longitud completa p53, p63 o p73 (Grob, 2001; Sayan et al., 2004; Yang, 2000). Los niveles relativos de las isoformas TA y
55 Δ N determinan el destino celular, produciendo la detención del crecimiento y muerte o la proliferación no controlada.

Los niveles en equilibrio de proteína TAp73 son regulados por aumento en respuesta al daño al ADN en una forma distinta de p53 (Agami, 1999; Gong, 1999; Yuan, 1999), mientras que $\Delta Np73$ es degenerada rápidamente (Maisse et al., 2004). La expresión de $\Delta Np63$ es reducida de forma transcripcional por p53 sugiriendo que no inhibe la actividad de supresión tumoral de p53 y TAp73 de la misma forma. Estas observaciones sugieren una función diferencial importante para estos isómeros en la carcinogénesis (Melino, 2002; Melino et al., 2003; Stiewe, 2002; Zaika, 2002).

La función de p63 y p73 en el ciclo celular y apoptosis sugiere que su modificación puede contribuir a potenciar la muerte celular en tumores. Además, varias mutaciones en p63 se asocian con síndromes epidérmicos genéticos mientras que el exceso de expresión de p73 es suficiente para producir la diferenciación neuronal. Por consiguiente, la modificación de la estabilidad de p63 o p73 puede ser una estrategia terapéutica en el tratamiento del cáncer y/o trastornos de desarrollo.

Aunque la ubiquitinación y degradación dependiente de proteosoma de p53 es regulada por su diana transcripcional MDM2, la regulación de la degradación de las proteínas p73 y p63 es controlada por distintas ligasas E3. Hasta ahora, se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación de los niveles en equilibrio de las proteínas p63 y p73 y su modulación como una posible estrategia terapéutica no se ha explorado completamente. Aunque algunos procedimientos han buscado el uso de inhibidores de proteosoma para inhibir la degradación de proteínas de la familia p53 e inducir así la apoptosis, en ensayos clínicos se ha encontrado que estos inhibidores tienen muy poca especificidad y conducen a la regulación por aumento de un gran número de proteínas. Además, aunque se han dirigido una serie de estrategias terapéuticas a p53, más de 50% de los tumores son deficientes en p53. Por consiguiente, son necesarios tratamientos terapéuticos que puedan dirigirse a rutas independientes de p53.

El documento D18 (WO99/40201) describe una proteína ligasa de ubiquitina E3 humana. Se describe una región estructural que codifica el polipéptido así como la secuencia de restos de aminoácidos de la proteína ligasa de ubiquitina humana. Se proporcionan métodos para identificar compuestos que modulan la actividad biológica y por lo tanto regulan la fisiología celular y tisular.

25 **Sumario de la invención**

La presente invención identifica que una modulación de la actividad de Itch puede proporcionar una respuesta celular importante para la terapia de diferentes trastornos. En particular, la presente invención demuestra que una inhibición de la actividad de Itch regula la apoptosis en una célula.

Se exponen aspectos de la invención en las reivindicaciones independientes adjuntas.

30 En una realización, se proporciona un método de modulación de la apoptosis en una célula, que comprende la etapa de disminuir o alterar de otra forma la actividad funcional del polipéptido Itch o el ácido nucleico que lo codifica. Los cambios en la actividad de Itch producen una estabilidad alterada en las proteínas p63 y p73, así como su actividad, tal como por ejemplo, su capacidad para regular la apoptosis. De forma adecuada, dicha modulación de la apoptosis confiere la muerte en una célula.

35 En una realización, se proporciona un método de inducción de apoptosis en una célula por inhibición de Itch.

La inhibición de Itch es mediante la inhibición de la actividad de Itch. En otra realización, la inhibición de Itch es mediante la inhibición de la expresión de ARNm de Itch mediante técnicas tales como ARNi, usando ARNsí o ARNsh.

40 Además, se describe que la inhibición de la actividad de Itch sensibiliza a las células para la muerte celular inducida por agentes citotóxicos tales como agentes que dañan el ADN. Un gran número de agentes que dañan el ADN serán familiares para los expertos en la técnica. En particular, el tratamiento con compuestos que dañan el ADN (tales como, por ejemplo, cisplatino, etopósido, doxorubicina, radiación gamma, campodacina, taxol) así como el tratamiento con UV, produce una regulación por disminución rápida de Itch. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para sensibilizar células frente a agentes que dañan el ADN mediante la inhibición de la actividad de Itch. Dichos métodos pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer.

45 En una realización, se proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar un agente que inhibe la actividad de Itch simultánea o secuencialmente con un agente que daña el ADN. Los agentes que dañan el ADN adecuados incluyen cisplatino, etopósido, doxorubicina, radiación gamma, campodacina, taxol así como el tratamiento con UV.

50 De forma adecuada dicho método comprende las etapas de tratar una célula con una molécula de ARNi capaz de interferir con el ARNm de Itch, de modo que disminuya la expresión de Itch y tratar las células con un agente que daña el ADN. Las moléculas de ARNi adecuadas se describen en la presente memoria.

55 La descripción identifica además una interacción entre Itch, una proteína ligasa de ubiquitina Hect, y las proteínas p63 y p73. En particular, la descripción de la presente memoria demuestra que Itch ubiquitina p73 convirtiéndola en diana para la destrucción proteosómica. Además, se ha determinado que Itch se une selectivamente y ubiquitina p73

pero no p53. Antes de la presente descripción, se conocía muy poco sobre los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación de los niveles en equilibrio de la proteína p73. MDM2, la ligasa de ubiquitina E3 que regula la degradación de la proteína cognada p53 por una ruta dependiente del proteosoma, se une a p73 pero no promueve su degradación (Balint, 1999; Dobbstein, 1999; Lohrum, 1999; Ongkeko, 1999; Zeng, 1999).

5 Itch ubiquitina tras la unión. En particular, Itch se une y ubiquitina proteínas, incluyendo las isoformas TA y ΔN de p73. La ubiquitinación determina la degradación dependiente de proteosoma de las proteínas. Cuando las isoformas TA y ΔN son ubiquitinadas por Itch, se convierten en dianas para la destrucción conduciendo a niveles reducidos de las proteínas en la célula y por lo tanto disminuyendo la detención del ciclo celular y apoptosis. A la inversa, cuando se reduce la ubiquitinación de estas proteínas por inhibición de la actividad de Itch, el nivel de proteína en la célula
10 aumenta, potenciando así la detención del ciclo celular y apoptosis. Por lo tanto, Itch es una diana para fármacos para la regulación de esta ruta y el tratamiento, entre otros, de afecciones tales como el cáncer donde es deseable la apoptosis potenciada.

Por consiguiente, se describe que la regulación por disminución de la actividad de Itch conduce a un nivel mayor de proteínas reguladas, incluyendo p73, lo que da como resultado el aumento de la detención del ciclo celular y apoptosis. Además, se muestra que tras el daño al ADN, el propio Itch se regula por disminución, permitiendo que
15 aumenten los niveles de proteína p73 y por lo tanto interfiere con la función de p73.

En una realización, se proporciona un método de modulación de la estabilidad de p63 o p73 en una célula que comprende modular la actividad o expresión de Itch.

Como se muestra en la presente memoria, Itch se une a $\Delta Np63$, TAp73, $\Delta Np73$ y en menor medida a TAp63. Por consiguiente, un método adecuado de modulación de la actividad de Itch es modificar la unión de Itch a $\Delta Np63$, TAp73 y $\Delta Np73$. Además, se demuestra en la presente memoria, que la unión de Itch a p63 y p73 se produce entre el motivo PY de p63 y p73 y el dominio WW de Itch. Por consiguiente, un método adecuado para modular la actividad de Itch es alterar la unión entre PY y WW.
20

En una realización, el método de modulación de la estabilidad de p63 o p73 puede ser a través de la modulación de la expresión de Itch. Los métodos adecuados de modulación de la expresión de genes serán familiares para los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, ARNi. Se describen en la presente memoria moléculas de ARNi y los métodos de modulación de la expresión adecuados. Los métodos de ARNi producen niveles menores de expresión de la proteína diana. Se ha demostrado en la presente memoria que la inhibición por el ARNi de la expresión de Itch regula por disminución la expresión de Itch y produce la estabilización de sus
25 sustratos incluyendo TA y ΔN p73 que, a su vez, conducen a niveles mayores de p73.

A la inversa, el exceso de expresión de Itch se puede usar para promover la estabilidad menor de sus sustratos, incluyendo TA y ΔN p73, conduciendo a su rápida degradación.

Por consiguiente, en una realización, se proporcionan moléculas de ARNi para usar en un método de modulación de la estabilidad de p63 o p73.

35 El daño al ADN mediante agentes tales como cisplatino, etopósido, doxorubicina, radiación gamma, campodacina, taxol, así como el tratamiento con UV, produce la rápida regulación por disminución de Itch que se correlaciona con aumentos en los niveles de p73. Este aumento de los niveles de p73 se cree que es a través de la estabilización de la proteína. En una realización, se proporciona un método de ensayo para identificar uno o más agentes que modulan la actividad y/o expresión de Itch.

40 De forma adecuada dichos métodos de ensayo permiten identificar agentes que modifican la actividad funcional de Itch modificando su actividad de ubiquitinasa. En la presente memoria se describen ensayos adecuados para medir la ubiquitinación de un sustrato.

En una realización, se proporciona un método para identificar un agente que modula la actividad de Itch, que comprende:

45 incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula de Itch en presencia de un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro,

determinar la cantidad de ubiquitina ligada a Itch en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y

seleccionar aquellos agentes que modulan la cantidad de ubiquitina ligada a Itch comparado con la cantidad de ubiquitina ligada a Itch en ausencia del agente o agentes que se van a ensayar.

50 De forma adecuada, un agente identificado como un modulador de la actividad de Itch se puede ensayar además para determinar su interacción con p63/p73. En particular, dichos ensayos pueden identificar aquellos agentes que modulan los niveles o actividad de p63 o p73. Los ensayos adecuados para determinar dicha interacción incluyen ensayos basados en células en los que el agente candidato se incubaba en células y se determinan los niveles de expresión de p63/p73 por análisis de transferencia Western, por ejemplo.

- 5 También se proporciona un método para identificar un agente que modula la actividad de Itch sobre sus sustratos, que comprende: incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula de Itch y una molécula de ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 en presencia de un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro, determinar la presencia de formas ubiquitinadas de ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y seleccionar aquellos agentes que modulan la cantidad de formas ubiquitinadas de ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 comparado con la cantidad de dichas formas ubiquitinadas obtenidas en ausencia del agente o agentes que se van a ensayar.
- 10 Por un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro, se entiende una selección de reactivos que permiten que se produzca una reacción de ubiquitinación. Dichos reactivos incluyen, por ejemplo, ubiquitina, una fuente de ATP, E2, E1 etc. Se describen ejemplos de sistemas adecuados en la presente memoria.
- 15 Las formas ubiquitinadas de una proteína pueden ser detectables midiendo la presencia de formas de peso molecular mayor de las proteínas ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 . Métodos alternativos para detectar la ubiquitinación de proteínas son familiares para los expertos en la técnica. Se describen métodos adecuados, por ejemplo, en el documento WO 01/75145.
- 15 En una realización, se proporciona un método para identificar uno o más agentes capaces de modular la estabilidad de p63 o p73, que comprende las etapas de:
- (a) incubar una molécula de Itch con el agente o agentes que se van a evaluar; y
- (b) identificar aquellos agentes que influyen en la unión de Itch a p63 o p73.
- 20 Preferiblemente, el agente o agentes se unen a la molécula Itch y/o la molécula p63 o p73 y, en particular, a una molécula ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 .
- 25 En una realización, se proporciona un método para identificar un agente candidato para un producto farmacéutico útil en el tratamiento de una enfermedad, que comprende: incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula Itch y una molécula ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 , en condiciones en las que, salvo por la presencia del agente o agentes que se van a ensayar, Itch y ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 forman un complejo con una afinidad de unión de referencia;
- determinar la afinidad de unión del complejo de Itch y ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 , en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y
- seleccionar aquellos agentes que modulan la afinidad de unión del complejo con respecto a la afinidad de unión de referencia.
- 30 En una realización de los métodos descritos en la presente memoria, se pueden usar moléculas enteras. En otra realización, se pueden usar partes que se unen de las moléculas. Como se expone en la presente memoria, los dominios WW de Itch están implicados en la unión de ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 . De forma similar, el motivo PPxY es la región dentro de ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 que interacciona con el dominio WW. Por consiguiente, el método de la invención puede usar fragmentos de las moléculas que comprenden los dominios de unión adecuados.
- 35 En una realización, el método para identificar agentes que modulan la actividad funcional de Itch modulando su actividad de ubiquitinasa, se puede llevar a cabo in vivo en una célula. En ensayos basados en células, las interacciones se pueden medir en un entorno relevante. Dicho método comprende de forma adecuada: transfectar células con sistemas de expresión para asegurar la expresión de Itch y ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 y ubiquitina y posteriormente determinar la presencia de conjugados de ubiquitina- ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 . Se describen métodos adecuados en la presente memoria. Las interacciones moleculares se pueden detectar, por ejemplo, mediante cribados de dos híbridos, en los que un gen que expresa un marcador detectable se pone bajo el control de un promotor que responde a un factor de transcripción ensamblado por interacción de las dos moléculas que se ensayan. Se pueden usar otros ensayos para detectar interacciones moleculares, por ejemplo, coimmunoprecipitación a partir de lisados de células Hek293 transfectados.
- 40 Se describe un agente identificable por el método de cualquier aspecto de la invención, capaz de modular la unión de Itch a ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 , modular la actividad de ubiquitinasa de Itch o modular la estabilidad de ΔNp63 , TAp73 o ΔNp73 . Por ejemplo, dicho agente puede ser una molécula pequeña inhibidora, un anticuerpo, que preferiblemente es específico para Itch, un polipéptido, tal como un aptámero polipéptido, o una molécula de Itch tal como un mutante negativo dominante de Itch. Se describen otros agentes adecuados en la presente memoria.
- 45 Además, se han generado mutantes tanto de la unión del motivo PY de p73 como del dominio WW de Itch y dan como resultado la pérdida de unión y ubiquitinación de p73. Por consiguiente, otros agentes adecuados incluyen estas moléculas mutantes.
- 50 En una realización, se proporciona un método para tratar un cáncer en un paciente, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que es capaz de modular

la actividad de ubiquitinación de p73 de Itch, en concreto ARNsi o ARNsh contra Itch.

p73 es un regulador crítico de la respuesta a la quimioterapia en varias líneas de células tumorales (Irwin et al., 2003). Esto implica que el tratamiento de tumores resistentes a quimioterapia con inhibidores de Itch daría como resultado niveles de expresión de p73 aumentados y la consiguiente sensibilización a la quimioterapia. Por consiguiente, en una realización, dicho cáncer es un tumor resistente a la quimioterapia.

Itch es activado por JNK para inducir la degradación de c-Jun. Tanto JNK como c-Jun están implicados en la regulación de la respuesta celular al daño del ADN. Por lo tanto, la inhibición de Itch tendría un impacto en cómo responden las células al daño al ADN. En particular, podría producir la sensibilización dependiente de c-Jun (y p73) a los efectos citotóxicos de agentes quimioterapéuticos.

En particular, se muestra en la presente memoria que Itch se une y ubiquitina selectivamente p73 pero no p53. Por consiguiente, el método como se ha descrito antes, es particularmente adecuado para tratar células de una forma independiente de p53. Esto es particularmente relevante en el contexto de potenciar la respuesta a la quimioterapia en tumores resistentes que contienen el mutante de p53. Puesto que p53 es inactivado en >50% de tumores, la inactivación de p73 en células tumorales se propone como un buen mecanismo para dirigirse a células tumorales.

La regulación por aumento de TAp73 por la regulación por disminución de Itch produce una mayor sensibilidad in vivo a fármacos. Por lo tanto, los autores de la invención proponen que la inhibición farmacológica de Itch se puede usar para sensibilizar células tumorales al tratamiento. El efecto de Itch en otras dianas tales como c-Jun puede contribuir al efecto final de la apoptosis dependiente del daño al ADN. Además, un inhibidor específico de Itch puede ser una herramienta extremadamente valiosa para los científicos en este campo.

p63 es expresada en el compartimento de las células estaminales de la epidermis, y en los ratones que no la expresan se produce la ausencia total de epidermis. Además, se ha identificado la expresión alterada de proteínas p63 en cánceres de piel y se ha mostrado una desregulación de p63 en enfermedades cutáneas (psoriasis, ictiosis).

Las mutaciones en p63 están asociadas con una serie de anomalías del desarrollo incluyendo una combinación de anomalías en manos y pies y aplasia o hipoplasia de glándulas mamarias, que caracterizan los siguientes síndromes: síndrome de ectrodactilia, displasia ectodérmica, fisura labiopalatina (EEC), síndrome cubital mamario, síndrome de miembros y mamas (LMS), síndrome de anquilobléfaron, displasia ectodérmica, fisura labiopalatina (AEC), malformación de mano/pie hendida no sindrómica (SHFM) y síndrome acro-dermato-ungual-lacrimonasal-dental (ADULT).

En particular, se han detectado mutaciones en el gen de p63 en 3q27 en pacientes con síndrome de EEC, en malformación de mano/pie hendida no sindrómica (SHFM) y posteriormente en el síndrome de anquilobléfaron, displasia ectodérmica, fisura labiopalatina (AEC) y en el síndrome ADULT y en LMS. Estos se describen, por ejemplo, en Han G. Brunner, Ben C.J. Hamel, Hans van Bokhoven. *American Journal of Medical Genetics*. Volume 112, Issue 3, páginas 284-290).

Más recientemente, se han encontrado mutaciones adicionales en otro síndrome caracterizado por características clínicas similares, el síndrome de Rapp Hodgkin. Otros síndromes, tales como el síndrome lacrimo-auriculo-dentodigital (LADD), el síndrome de ectrodactilia-paladar hendido (ECP), el síndrome recesivo Bowen-Armstrong y el síndrome de displasia ungueal-anquilobléfaron-pelo rizado (CHANDS), también se pueden asociar con mutaciones de p63.

Otras enfermedades de la piel incluyen enfermedades de la piel agudas o crónicas tales como psoriasis, ictiosis, queratosis seborreica y lesiones de Bowens. Se ha identificado la expresión aumentada de p63 en queratosis seborreica y lesiones de Bowens. Aunque esta estaba principalmente restringida a la capa basal, también se observó tinción difusa significativa. Además, la expresión de p63 está aumentada en carcinomas de células escamosas.

Las moléculas capaces de regular la actividad enzimática de Itch pueden tener un uso potencial en la epidermis. Esto se basa en dos descubrimientos: (i) Itch es altamente expresada en la epidermis, (ii) Itch regula la degradación dependiente de ubiquitina de TAp63 y Δ Np63, dos proteínas que son cruciales para el desarrollo de la piel y homeostasia de la piel, como se describe en la presente memoria.

Por consiguiente, las moléculas que regulan (inhibición o inducción) la actividad de Itch tendrán un efecto profundo en la piel y pueden afectar a la homeostasia epidérmica aumentando/reduciendo el estado de proliferación. Esto predecirá el uso potencial tanto en la psoriasis como la ictiosis y permitirá un mejor crecimiento in vitro y diferenciación terminal de queratinocitos y piel artificial.

En una realización, se proporciona un método para aumentar la sensibilidad de una célula tumoral a un agente quimioterapéutico, que comprende reducir la actividad, expresión, niveles o función de Itch. De forma adecuada, la reducción de Itch es mediante ARNi. En otra realización, la actividad de Itch en p73 es mediante la alteración de la asociación por los dominios WW.

Se podrían usar anticuerpos específicos para predecir tumores con diferentes quimiosensibilidad, de acuerdo con la capacidad de Itch para regular la quimiosensibilidad y daño celular al ADN mediados por p63/p73. Se pueden usar para el mismo propósito métodos específicos para identificar el ARNm de Itch, tales como procedimientos de PCR. La expresión relativa de Itch y sus sustratos (TAp73, ΔNp73, ΔNp63) se podría usar para predecir la quimiosensibilidad para diseñar quimioterapia de cáncer individual.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 p73 se une a Itch.

(A) Representación esquemática de la estructura modular de las proteínas p73α, p73δ, p53 e Itch. Están indicados los dominios estructurales principales: dominio de transactivación (TA), dominio de unión a ADN (DBD), dominio de oligomerización (OD), motivo alfa estéril (SAM), dominio C2 amino terminal (C2), dominios WW (WW), dominio Hect carboxilo terminal (HECTc). También se muestra la región de p73 desde Met452 a Ala489, que contiene el motivo PPxY, usado como cebo en el experimento de cribado de biblioteca de fagos. Las barras indican regiones de Itch expresadas por los clones seleccionados en el cribado.

(B) Se muestran placas de T7 de la biblioteca no seleccionada y de conjunto de fagos enriquecido, transferidos a una membrana de celulosa e hibridados con GST-PY. En el panel inferior se muestra la PCR que demuestra el enriquecimiento en clones que contienen los dominios WW de Itch.

(C) Ensayo "pull-down" de GST. Se transfectaron células Hek293 con HA TAp73α □(TAp73α) o vector vacío (pCDNA) y los lisados se incubaron con GST solo o una proteína de fusión con GST que contiene los cuatro dominios WW de Itch (GST-WW). Las proteínas retenidas se detectaron con un anticuerpo anti-p73 (panel superior). La misma transferencia se volvió a hibridar con suero policlonal anti-GST (panel inferior). Coinmunoprecipitación de proteínas expresadas en exceso: HA-TAp73α o HA TAp53 (D) o HA-ΔNp73α (E) o TAp73αY487F, TAp73αY407F y TAp73αY407F/Y487F (F) se transfectaron de forma transitoria en células Hek293 con vectores de expresión Myc-Itch o Myc-Itch MUT. Las células se trataron con o sin MG132 antes de lisis. Los extractos celulares se IP (inmunoprecipitaron) con anticuerpo anti-Myc. Los inmunocomplejos se sometieron a análisis por transferencia Western con anticuerpo anti-HA (paneles superiores). Las mismas transferencias se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-Myc (paneles medios). Partes alícuotas de los extractos celulares totales de células no procesadas (25 μg/banda) se sometieron directamente a análisis de inmunotransferencia con anticuerpo anti-HA (paneles inferiores).

(G) Co-IP de p73 endógeno y proteínas Itch. Las células se IP con anticuerpos contra p73 (mezcla de clones C17 y C20, Santa Cruz) o p53 (mezcla de clones D01 y 1801, Santa Cruz) y se llevó a cabo transferencia Western con anticuerpo contra: Itch, p73, p53 y actina. Como control, se llevó a cabo la IP también con un anticuerpo anti-actina.

Figura 2. Itch ubiquitina p73. (A) Las proteínas TAp73α y TAp73δ y p53 se tradujeron in vitro en presencia de [³⁵S]-metionina y se incubaron con Itch purificado (GST-Itch) o su mutante catalíticamente inactivo (GST-Itch MUT) en presencia de ATP, ubiquitina, y E1 y E2 expresadas en bacterias (UbcH7). Las bandas 10 a 12 muestran la traducción in vitro con el vector vacío (pCDNA). Las bandas 13 a 16 muestran una parte alícuota (1/10) de las proteínas traducidas in vitro usadas en la reacción de ubiquitinación. Para demostrar que la ubiquitinación de p73 también se puede producir en un sistema más fisiológico, células Hek293 se cotransfectaron de forma transitoria con plásmidos de expresión para la ubiquitina marcada con HA (Ub-HA), Flag-TAp73α o Flag-p53 (B) Flag-ΔNp73α (C) o Flag-TAp73αY487F, Flag-TAp73αY407F y Flag-TAp73αY407F/Y487F (D) y Myc-Itch o Myc-Itch MUT. 48 horas después de la transfección, las células se trataron con MG132 y después se recogieron. Los lisados se sometieron a IP usando un anticuerpo anti-Flag. Los inmunocomplejos se revelaron con anticuerpo anti-HA (paneles superiores). No hay presentes conjugados de Ub-HA cuando se omite Ub-HA de la reacción (B - bandas 10-18). Los niveles de expresión de las proteínas p73 y p53 se demuestran por hibridación de las mismas membranas con anticuerpos anti-Flag (paneles medios) y los de Itch por hibridación de la misma membrana con anticuerpos anti-Myc (paneles inferiores).

Figura 3. Efecto de la expresión de Itch en los niveles en equilibrio de p73. (A) Se transfectaron células Hek293 con HA-TAp73α y p53 o HA-TAp73δ (A) o Flag-TAp73αY487F, Flag-TAp73αY407F y Flag-TAp73αY407F/Y487F (B) junto con Myc-Itch o Myc-Itch MUT. 48 horas después de transfección, las células se trataron o no con MG132. Cantidades iguales de lisados celulares de proteínas totales se sometieron a análisis por transferencia Western usando anticuerpo anti-HA o anticuerpo anti-Flag (filas superiores) para detectar los niveles en equilibrio de las proteínas p73s y p53. Las mismas transferencias se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-Myc con el fin de detectar los niveles de expresión de Itch (filas medias) y con anticuerpo anti-actina para mostrar la misma carga (filas inferiores). Seguimientos de pulsos radiactivos ³⁵S. Se transfectaron células H1299 con HA-TAp73α (C) o HA-ΔNp73α (D) junto con Myc-Itch o pCDNA-Myc. 48 horas después de transfección, las células se marcaron con 250 μCi/ml de Redivue PRO-MIX (L-[³⁵S] mezcla de marcaje celular in vitro). Se añadieron Met y Cys sin marcar (1 mg/ml) y se recogieron células en los tiempos de medición indicados. Se llevó a cabo la inmunoprecipitación con anticuerpo policlonal anti-HA (Y-11). Los inmunoprecipitados se lavaron y se llevaron a SDS-PAGE y se detectaron por autorradiografía. Para los experimentos de bloqueo con cicloheximida, las células Hek293 se transfectaron con HATAp73α (E), HA-ΔNp73α (F), o HA-p53 (G) junto con Myc-Itch o pCDNAMyc. 24 horas después de transfección,

las células se trataron con cicloheximida y se recogieron a diferentes tiempos de medición. Cantidades iguales de lisados celulares de proteínas totales se sometieron a análisis por transferencia Western usando anticuerpo anti-HA. Para demostrar la misma carga, las mismas inmunotransferencias se lavaron de anticuerpos y se volvieron a hibridar con anticuerpos anti- β -tubulina o anti-Hsp-70 para transferencias de p73s y p53 respectivamente. (C) Las transferencias Western se sometieron a análisis densitométrico y los resultados se normalizaron basándose en los niveles de expresión de β -tubulina o Hsp-70, respectivamente, y se dieron en forma gráfica (paneles inferiores).

Figura 4. Efectos de la regulación por disminución de Itch en los niveles de proteína p73.

(A) Células inducibles Saos-2-TAp73 α se transfectaron con oligonucleótidos ARNs dirigidos a la secuencia de Itch o con un oligonucleótido desordenado. 48 horas después las células se indujeron para expresar TAp73 α para los tiempos de medición indicados con doxiciclina (inductor). Los niveles de p73 aumentan más rápidamente y alcanzan niveles mayores cuando Itch es regulado por disminución. El panel inferior muestra los niveles de Itch endógeno. Las gráficas muestran análisis densitométricos de transferencias Western de p73 normalizados para la β -tubulina.

(B) Células inducibles Saos-2-TAp73 α se transfectaron con oligonucleótidos dirigidos a la secuencia de Itch o con un oligonucleótido desordenado. Las células se indujeron para expresar TAp73 α durante 14 h con doxiciclina, el inductor se separó y se recogieron las células en los tiempos de medición indicados. Los niveles de p73 disminuyen más rápidamente en células transfectadas con el oligonucleótido desordenado comparado con aquellos en los que Itch es regulado por disminución. El panel inferior muestra los niveles de Itch endógeno. Las gráficas muestran análisis densitométricos de las transferencias Western de p73 normalizados para la β -tubulina.

(C) Células Saos-2 se transfectaron con oligonucleótidos dirigidos a la secuencia de Itch o con un oligonucleótido desordenado y se recogieron 48 h más tarde. La regulación por disminución de Itch (panel inferior) produce un aumento de los niveles de TA y Δ N p73a (paneles superiores).

(D) Transferencia Western para p73 endógeno de MEF naturales (MEF+/+), MEF deficientes en Itch no agouti-leletal 18H (MEF Itch -/-) y un clon inmortalizado espontáneamente de estos MEF (MEF Itch -/- inmortalizado). Los niveles de Δ Np73 (la única forma detectable en estas células) son mayores en MEF Itch -/-. (E) Se transfectaron MEF Itch -/- inmortalizados con Myc-Itch WT y se recogieron 48 h más tarde. La reintroducción de Itch produjo la regulación por disminución de Δ Np73.

Figura 5. Nedd4 se une a p73 pero no se ubiquitina.

(A) Se transfectaron células Hek293 con HATAp73 α HA-ANp73 α HA-p53 o un vector vacío junto con Myc-Itch o Myc-Nedd4 en presencia de MG132. Las células se sometieron a IP usando anticuerpo anti-HA y se analizaron por transferencia Western usando un anticuerpo contra Myc. Itch y Nedd4 co-IP con p73.

(B) Se transfectaron células Hek293 con HA-TAp73 α HA-ANp73 α o HA-p53 junto con Myc-Itch o Myc-Nedd4. Los extractos celulares se analizaron por transferencia Western usando un anticuerpo contra HA. La expresión de Itch pero no de Nedd4 produce la regulación por disminución de TA y Δ N p73. (C) Se analizaron células transfectadas con los plásmidos indicados junto con un plásmido que expresa ubiquitina marcada con HA (Ub-HA), por transferencia Western usando un anticuerpo contra HA. Aparecen las bandas moleculares mayores características de la ubiquitinación cuando Itch es expresada en exceso pero no Nedd4.

Figura 6. La expresión de Itch reduce la actividad transcripcional de p73. Se transfectaron células H1299 con las combinaciones indicadas de plásmidos (en las diferentes relaciones indicadas) que codifican TAp73 α , junto con Myc-Itch WT (Itch wt) o Myc-Itch MUT (Itch Mut), o vector de control vacío (pCDNA) junto con un plásmido indicador de luciferasa *Bax*- (A-B) o *MDM2*- (C-D) o *p21*- (E-F) y plásmido indicador de luciferasa de Renilla. Se prepararon extractos celulares 36 h más tarde y se determinó la actividad de luciferasa. Los resultados se representan como número de veces de inducción de la actividad de luciferasa comparado con las células de control. Los histogramas muestran la media de tres experimentos independientes; las barras indican la desviación típica. (G) Se transfectaron células H1299 con HA-TAp73 α junto con Myc-Itch en las proporciones indicadas. Cantidades iguales de extractos celulares se sometieron a transferencia Western con anticuerpo anti-p21 (panel superior), anti-HA (panel medio) y anti-Myc (panel inferior).

Figura 7. Itch es regulado por disminución por agentes que dañan al ADN. Se trataron células Saos-2 con doxorubicina 2 μ M (Doxo) durante 24 o 48 horas y después se recogieron por tripsinización. Las células se lisaron para la transferencia Western (A) y la mitad de las células se fijaron con etanol para el análisis de la apoptosis (B). Las transferencias Western se llevaron a cabo con anticuerpos anti-Itch (panel superior) o anti-p73 (panel inferior). Las transferencias se lavaron de anticuerpos y se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-lámina B para mostrar la misma carga. La apoptosis se evaluó por análisis de citometría de flujo de células teñidas con PI. Se muestran los controles no tratados (N.T.). Células H1299 transfectadas con HA-TAp73 α (Con) se cargan como un control para la transferencia Western de p73.

(C) Transferencia Western usando anticuerpo anti-Itch en células Hela, H1299, Hek293 y Saos-2 tratadas durante 24 horas con doxorubicina 2 μ M. Las transferencias se lavaron de anticuerpos y se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-tubulina β para mostrar la misma carga.

(D) Transferencia Western usando anticuerpo anti-Itch en células Saos-2 tratadas durante 24 y 48 horas con etopósido 15 μ M (Etopo) o cisplatino 5 μ M (Cisp). También se muestran las células de control no tratadas (N.T.). Las transferencias se lavaron de anticuerpos y se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-p73 y anticuerpo anti-lámina B para mostrar la misma carga.

5 (E) Saos- 2-TAp73 α (panel superior) o Saos-2- Δ Np73 α (panel inferior) se indujeron con doxociclina durante 14 h. Después se separó la doxociclina y las células se trataron con los fármacos indicados y se analizaron en los tiempos de medición indicados por transferencia Western usando anticuerpo anti-HA. Las transferencias se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-tubulina β para mostrar la misma carga.

10 (F) Se transfectaron Saos-2- Δ Np73 α con oligonucleótidos para ARNsi contra la secuencia Itch o con una secuencia desordenada y después se indujeron con doxociclina durante 14 h. Después se separó la doxociclina y las células se trataron con doxorubicina y se analizaron en los tiempos de medición indicados por transferencia Western usando anticuerpo anti-HA. Las transferencias se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-tubulina β para mostrar la misma carga.

Figura 8. Itch controla los niveles de p73 en condiciones de reposo y en respuesta al daño del ADN.

15 (A) Representación esquemática de la interacción funcional entre p73 e Itch. En condiciones no estresadas, los niveles basales tanto de TAp73 como de Δ Np73 se mantienen bajos; en esta situación Itch se une a p73 y promueve su ubiquitinación y degradación dependiente de proteosoma.

20 (B) En respuesta al daño al ADN Itch se degrada rápidamente, reduciendo el recambio de p73. Los niveles de Tap73 aumentan mientras que Δ Np73 permanece bajo debido a la activación de una ruta de degradación específica de Δ N dependiente del daño al ADN. El resultado final es la inducción de la detención del ciclo celular y apoptosis por p73.

La figura 9 muestra células Saos-2 que se transfectaron o no con oligonucleótidos ARNsi específicos de Itch y después se trataron o no con doxorubicina (2 μ M). Después de 24 horas (barras 1-4) y 48 horas (barras 5-8) las células se tripsinizaron y se incubaron con yoduro de propidio para cuantificar la muerte celular. Los histogramas representan los resultados medios de tres experimentos independientes.

25 La figura 10 muestra que ITCH interacciona con p63. Se transfectaron células 293T con diferentes combinaciones de vectores de expresión para ITCH WT marcado con Myc (Myc-ITCH WT), ITCH enzimáticamente inactiva (Myc-ITCH MUT), TAp63 α marcada con Flag (Flag-TAp63 α) y Δ Np63 α (Flag- Δ Np63 α). Los inmunoprecipitados anti-Myc se hibridaron con anticuerpos anti-Flag. El panel superior muestra proteínas inmunoprecipitadas. El panel medio muestra niveles de ITCH en los inmunoprecipitados. El panel inferior muestra niveles de p63 en los lisados de entrada. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia del inhibidor de proteosoma MG132.

30 La figura 11 muestra que ITCH induce la ubiquitinación de Δ Np63 α . Se transfectaron células 293T con vectores que expresaban ITCH WT marcada con Myc (Myc-ITCH WT), ITCH enzimáticamente inactiva (Myc-ITCH MUT), TAp63 α marcada con Flag (Flag-TAp63 α), Δ Np63 α (Flag- Δ Np63 α) y ubiquitina marcada con HA (Ub HA). Los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Flag y se hibridaron con anticuerpo anti-HA. El panel superior muestra las proteínas p63 conjugadas con ubiquitina. El panel medio muestra niveles de p63 en los inmunoprecipitados. El panel inferior muestra los niveles de ITCH en los lisados de entrada. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia del inhibidor de proteosoma MG132.

35 La figura 12 muestra que el exceso de expresión ITCH produce la regulación por disminución de Δ Np63 α . Se transfectaron células 293T con vectores que expresaban ITCH WT marcada con Myc (Myc-ITCH WT), ITCH enzimáticamente inactiva (Myc-ITCH MUT), TAp63 α marcada con Flag (Flag-TAp63 α), Δ Np63 α (Flag- Δ Np63 α) y se analizaron los niveles en equilibrio de p63 usando anticuerpo anti-Flag (panel superior). El panel medio muestra los niveles de ITCH, mientras que el panel inferior muestra los niveles de tubulina como control de carga.

40 La figura 13 muestra que ITCH regula selectivamente la semivida de Δ Np63 α . (A) Se transfectaron células 293T con el vector de expresión de TAp63 α marcado con Flag en presencia de vector de control (panel superior) o vector de expresión de ITCH WT marcado con Myc (Myc-ITCH WT, panel inferior). 24 horas después las células transfectadas se incubaron con cicloheximida y se recogieron en los diferentes tiempos de medición indicados, se lisaron y se analizaron los niveles de p63 usando un anticuerpo anti-Flag. (B) Se transfectaron células 293T con el vector de expresión de Δ Np63 α marcado con Flag en presencia de vector de control (panel superior) o vector de expresión de ITCH WT marcado con Myc (Myc-ITCH WT). 24 horas después de transfección las células se incubaron con cicloheximida (20 μ g/ml) y se recogieron en los diferentes tiempos de medición indicados, se lisaron y se analizaron los niveles de p63 usando un anticuerpo anti-Flag. En todos los casos se midieron los niveles de tubulina como control de carga.

45 Figura 14 (A). Transferencia Western de 12 líneas celulares que muestran el efecto en la expresión de Itch (B) de ARNsh (oligonucleótidos n° 2 y 18) en los niveles de Itch en (i) cos1, (ii) h1299, (iii) HeLa, y (iv) HEK293T. 1 = células no transfectadas; 2 = células transfectadas con ARN desordenado; 3 = células transfectadas con el clon 2 de ARNsh; 4 = células transfectadas con el clon 18 de ARNsh.

Figura 15. Histogramas que muestran el ciclo celular de células transfectadas con oligonucleótido desordenado, o ARNsh contra Itch 48 horas después de transfección, (a) Cos1, (b) H1299, (c) HEK293T.

Figura 16. Células que muestran regulación por disminución de Itch en respuesta a la transfección con ARNsh dirigido a Itch, y niveles aumentados de p73, (a) Cos1, (b) HEK293T, (c) H1299.

- 5 Figura 17. Transferencias Western de muestras de células H1299, que se transfectaron con oligonucleótido desordenado o ARNsh contra Itch y después se trataron durante 24 y 48 horas con agentes que dañan el ADN. Se muestran los niveles de p73 en las células de control y tratadas.

10 Figura 18. Ensayo ELISA para la autoubiquitinación de Itch. Itch natural (E3) o Itch catalíticamente inactivado que contiene la mutación puntual C830A (E3m), se inmovilizaron sobre pocillos de placa de microvaloración revestida con glutatión. Los pocillos no revestidos recibieron solo tampón de revestimiento. Las reacciones de ubiquitinación se llevaron a cabo en presencia o ausencia de E1, E2, E3(m) o FLAG-ubiquitina como se indica.

Figura 19. Representación gráfica de los datos obtenidos de un cribado piloto de 1280 moléculas pequeñas de la biblioteca de LOPAC¹²⁸⁰™ en el ELISA de alta capacidad. Se identificaron los éxitos en los pocillos que mostraban actividad de 70% o menos de la media de los controles positivos.

15 Descripción detallada de la invención

Ventajas

20 Las ligasas de ubiquitina son dianas tratables con fármacos que ofrecen un gran potencial para el diseño de fármacos. Primero, son enzimas y por lo tanto representan moléculas fáciles a las que dirigirse para el diseño de moléculas pequeñas inhibitoras. Además, las moléculas pequeñas que se dirigen a enzimas que, a su vez, regulan la degradación, se pueden usar para aumentar la actividad de una diana, donde de otro modo podría no ser posible el diseño de moléculas para actuar directamente en esa diana.

Definiciones

25 Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente el experto en la técnica (p. ej., en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se usan técnicas convencionales para los métodos moleculares, genéticos y bioquímicos. Véase, en general, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., y Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999), 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc.; así como Guthrie et al., *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Vol. 194, Academic Press, Inc., (1991), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, Calif.), McPherson et al., *PCR Volumen 1*, Oxford University Press, (1991), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 2ª Ed. (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, N.Y.), y *Gene Transfer and Expression Protocols*, pp. 109-128, ed. E. J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.). Estos documentos se incorporan en la presente memoria por referencia.

35 Itch

40 La ubiquitina es una proteína que se puede unir covalentemente a restos de lisina en proteínas diana. Esta reacción requiere la acción secuencial de 3 enzimas, las enzimas E1, E2 y E3. Después de modificación con una serie de restos de la ubiquitina unidos a través de la Lys 48 de la ubiquitina, la proteína ubiquitinada está dirigida a la degradación dependiente de ATP por el proteosoma 26S. En este procedimiento, las ligasas de ubiquitina E3 catalizan la transferencia final de la ubiquitina a un sustrato específico, gobernando así la especificidad del reconocimiento de sustrato (Hicke, 2001; Kloetzel, 2001; Weissman, 2001). Por lo tanto, el direccionamiento terapéutico de ligasas E3 particulares producirá alteraciones selectivas en las velocidades de degradación de grupos pequeños de proteínas, en lugar de inhibir la ubiquitinación y degradación de todas las proteínas en el proteosoma. Las enzimas E3 contienen dos actividades separadas: una actividad de ligasa de ubiquitina para conjugar la ubiquitina a sustratos y formar cadenas de poliubiquitina por enlaces isopeptídicos, y una actividad de direccionamiento o unión para poner físicamente juntos la ligasa y el sustrato.

45 Además de su función en la ubiquitinación y degradación, la ubiquitina también puede conferir una etiqueta de dirección subcelular en proteínas, dando como resultado cambios en su localización intracelular, y por lo tanto, la función.

50 Itch es un ejemplo de una ligasa de ubiquitina E3 que pertenece a la familia E3 similar a Nedd4 y se caracteriza por una organización modular que incluye: dominio C2 relacionado con proteína quinasa C N-terminal; múltiples dominios WW; y un dominio de proteína ligasa de ubiquitina (Ub) HECT (homólogo de la proteína asociada E6 carboxilo terminal) C-terminal (Harvey, 1999) (Fig. 1A). El gen homólogo de ratón de Itch está ausente en ratones no agouti-lethal 18H (Itchy) que presentan defectos inmunitarios profundos (Fang, 2002; Perry, 1998).

- 5 Itch ubiquitina Jun-B dirigiéndola para su degradación (Fang et al., *Nat. Immunol.* 2002). Se ha mostrado que Itch es fosforilada por JNK-1 y JNK-2 en respuesta a la estimulación de linfocitos T (Gao et al *Science* 2004) y la fosforilación de Itch produce una mayor actividad catalítica (Gao et al., *Science* 2004). Además, Itch ubiquitina cJun y Jun-B dirigiéndolos para la degradación y modulando la producción de citoquinas (Gao et al., *Science* 2004). Itch también regula la respuesta a TGF-Beta promoviendo la fosforilación de SMAD (Bai et al., *Mol. Cell.* 2004) y regula Notch (Qui et al., *J. Biol. Chem.* 2000). Itch también sufre autoubiquitinación (Gao et al., *Science* 2004).
- Itch humana es descrita por Perry WL, Hustad CM, Swing DA, O'Sullivan TN, Jenkins NA, Copeland NG. *Nat Genet.* 1998 18:143-6, y las secuencias depositadas con los números de acceso en GenBank NM_031483 (nucleótido) (gi27477108) y NP_113671 (proteína) (gi:27477109).
- 10 Las referencias a Itch en la presente memoria incluyen Itch y sus variantes, homólogos, fragmentos o derivados. p63 y p73
- 15 La referencia a p63 y p73, como se usa en la presente memoria, incluye p63, p73 y cualquiera de sus variantes, homólogos, fragmentos o derivados, incluyendo formas truncadas y de corte y empalme alternativo, o isoformas como se describen en la presente memoria. En particular, la referencia a p63 y p73 incluyen la referencia a TAp73, ΔNp73 y ΔNp63. Estas isoformas son descritas, por ejemplo, por Melino et al., *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 28, No. 12, Dec 2003, Melino et al. *Nature Reviews*, Vol. 2, p. 1-11, Agosto de 2002. La secuencia de ARNm que codifica la proteína p63 se puede encontrar en GenBank NM_003722, mientras que el ARNm que codifica la proteína p73 se puede encontrar en GenBank NM_005427.
- Variantes, homólogos, fragmentos o derivados
- 20 El término “variante” se usa para indicar un polipéptido o secuencia de nucleótidos natural que difiere de la secuencia que se encuentra naturalmente.
- 25 El término “fragmento” indica que un polipéptido o secuencia de nucleótidos comprende una fracción de una secuencia. Puede comprender una o más secciones contiguas largas de secuencia o una pluralidad de secciones pequeñas. La secuencia también puede comprender otros elementos de secuencia, por ejemplo, puede ser una proteína de fusión con otra proteína. Preferiblemente, la secuencia comprende al menos 50%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 80%, lo más preferiblemente al menos 90% de una secuencia descrita en la presente memoria.
- 30 El término “homólogo” significa una entidad que tiene una determinada homología con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. Aquí, el término “homología” se puede igualar con “identidad”.
- 35 En el presente contexto, una secuencia homóloga se considera que incluye una secuencia de aminoácidos, que puede ser al menos 70, 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 o 98% idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. que las secuencias de aminoácidos objeto. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención, se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.
- 40 En el presente contexto, una secuencia homóloga se considera que incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 70, 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 o 98% idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc., que la secuencia objeto. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud, en el contexto de la presente invención, se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.
- 45 Las comparaciones de homología se pueden llevar a cabo mirando, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de ordenador disponibles en el comercio pueden calcular % de homología entre dos o más secuencias.
- 50 El % de homología se puede calcular a lo largo de secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia, y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se llama alineamiento “sin huecos”. Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se llevan a cabo solamente a lo largo de un número de restos relativamente corto.
- 55 Aunque este es un método muy sencillo y consistente, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en una pareja de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o eliminación producirá que los restos de aminoácidos siguientes salgan del alineamiento, dando así como resultado potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se lleva a cabo un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar excesivamente la puntuación total de homología. Esto se logra insertando “huecos” en el alineamiento de secuencias para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que se produce en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con el menor número de huecos posible, reflejando una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, logrará una puntuación más alta que uno con muchos huecos. Típicamente se usan "costes de hueco afines" que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. Penalizaciones altas por hueco producirán por supuesto alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permitirán modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácido es -12 por un hueco y -4 por cada extensión.

El cálculo de % máximo de homología, por consiguiente, requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al., 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete BLAST (véase, Ausubel et al., 1999 ibídem - Capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y el paquete GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda en desconexión o en línea (véase, Ausubel et al., 1999 ibídem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones se prefiere usar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta llamada BLAST 2 Sequences también está disponible para la comparación de secuencias de proteínas y nucleótidos (véase, *FEMS Microbiol. Lett.* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.* 1999 177(1): 187-8).

Aunque el % de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento por sí mismo típicamente no se basa en una comparación de pares todo-o-nada. En cambio, en general se usa una matriz de puntuación de similitud escalonada, que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basado en la similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de este tipo de matriz usada habitualmente es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para el paquete de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin en general usan, ya sean los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizados si se suministran (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, se puede calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace estos como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias también pueden tener eliminaciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácido, que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los restos, siempre que se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácidos aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservativas se pueden hacer, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir unos por otros:

Alifáticos	No polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - cargados	D E
		K R
Aromáticos		H F W Y

La presente invención también abarca que se produzca la sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se usan ambos en la presente memoria para indicar el intercambio de un resto de aminoácido existente, por un resto alternativo), es decir sustitución de similar por similar, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar,

etc. También se puede producir la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de resto a otra, o alternativamente que implique la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico-ornitina (en lo sucesivo denominada B), norleucina-ornitina (en lo sucesivo denominada O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

- 5 También se pueden hacer sustituciones por aminoácidos no naturales, e incluyen aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*, N-alquilaminoácidos*, ácido láctico*, derivados de haluro de aminoácidos naturales, tales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alil-glicina*, β-alanina*, ácido L-α-aminobutírico*, ácido L-γ-aminobutírico*, ácido L-α-aminoisobutírico*, ácido L-ε-aminocaproico[#], ácido 7-aminoheptanoico*, L-metioninasulfona^{#*}, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina[#], L-tioprolina*, derivados de metilo de fenilalanina (Phe) - tales como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L- Phe (4-amino)[#], L-Tyr (metil)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropionico[#] y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha usado para el propósito de la discusión anterior (relacionada con la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha usado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, #* indica características anfipáticas.
- 10
- 15 Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre dos restos de aminoácidos de la secuencia que incluyen grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos, tales como restos de glicina o β-alanina. Una forma adicional de variación implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptoides, que entenderán bien los expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoides" se usa para referirse a restos de aminoácidos
- 20 variantes en los que el grupo sustituyente en el carbono α está en el átomo de nitrógeno del resto en lugar de en el carbono α. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoides, por ejemplo, Simon RJ et al., *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134.

25 Las secuencias de nucleótidos para usar en la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica una serie de tipos diferentes de modificaciones para oligonucleótidos. Estas incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de acridina y cadenas de polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos se pueden modificar por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo para potenciar la actividad in vivo o la vida útil de secuencias de nucleótidos útiles en la presente invención.

30 También están incluidos los alelos de secuencias, tales como Itch, p63 o p73. Como se usa en la presente memoria, un "alelo" o "secuencia alélica" es una forma alternativa de un receptor. Los alelos resultan de una mutación, es decir, un cambio en la secuencia de ácido nucleico, y en general producen ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede estar o no alterada. Preferiblemente, la función no está alterada. Cualquier gen dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios por mutaciones comunes que dan lugar a alelos

35 en general se atribuyen a eliminaciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos. Cada uno de estos tipos de cambios se puede producir solo, o combinados unos con otros, una o más veces en una secuencia dada.

El término "alelo" también incluye polimorfismos genéticos, tales como SNP (polimorfismos de un solo nucleótido).

40 Los términos "variante", "homólogo", "derivado" o "fragmento" incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, eliminación de o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de o en la secuencia que proporciona la secuencia de nucleótidos resultante que es capaz de codificar una proteína que tiene la actividad deseada, tal como la actividad de ligasa de ubiquitina Itch, siendo preferiblemente biológicamente tan activa como la proteína codificada por una cualquiera de las secuencias mostradas en la presente memoria.

Apoptosis

45 La "apoptosis" o muerte celular es un proceso intracelular controlado caracterizado por la condensación y posterior fragmentación del núcleo de la célula, durante la cual la membrana plasmática permanece intacta. Una cascada de enzimas incluyendo caspasas que escinden en los restos de ácido aspártico, es activada en el proceso.

50 Por "modular la apoptosis" se entiende que para una célula dada, en determinadas condiciones del entorno, se cambia su tendencia normal a sufrir apoptosis comparada con una célula sin tratar. Una tendencia menor a la apoptosis también puede ser un aumento medible de la supervivencia celular y puede ser el resultado de una inhibición de la apoptosis por la inhibición de uno o más componentes de la ruta apoptótica. Un aumento en la tendencia a sufrir apoptosis se puede medir por una mayor muerte celular, por ejemplo, como se describe más adelante.

55 Los métodos para inducir la apoptosis son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, la exposición a agentes de quimioterapia o radioterapia y la retirada de factores de supervivencia obligatorios (p. ej., GM-CSF, NGF) si se aplica. Las diferencias entre células tratadas y no tratadas indican efectos atribuibles al agente de ensayo.

Los métodos para medir la apoptosis son familiares para los expertos en la técnica y se describen en la presente memoria.

Actividad funcional

La “actividad funcional” de una proteína en el contexto de la presente invención describe la función que lleva a cabo la proteína en su entorno natural. Alterar o modular la actividad funcional de una proteína incluye dentro de su alcance aumentar, disminuir o alterar de otra forma la actividad natural de la propia proteína. Además, también incluye dentro de su alcance aumentar o disminuir el nivel de expresión y/o alterar la distribución intracelular del ácido nucleico que codifica la proteína, y/o alterar la distribución intracelular de la propia proteína.

Expresión

El término “expresión” se refiere a la transcripción de un molde de ADN de genes para producir el ARNm correspondiente y traducción de este ARNm para producir el producto génico correspondiente (es decir, un péptido, polipéptido o proteína). La expresión “activa la expresión génica” se refiere a inducir o aumentar la transcripción de un gen en respuesta a un tratamiento donde dicha inducción o aumento se compara con la cantidad de expresión génica en ausencia de dicho tratamiento. Igualmente, las expresiones “disminuye la expresión génica” o “regula por disminución la expresión génica” se refiere a inhibir o bloquear la transcripción de un gen en respuesta a un tratamiento y donde dicha disminución o regulación por disminución se compara con la cantidad de expresión génica en ausencia de dicho tratamiento.

Modulación

El término “modulación” se puede referir a prevenir, suprimir, aliviar, restablecer, aumentar, elevar o afectar de otra forma a la actividad y/o expresión de Itch. En particular, el término “modulación” se refiere a modular la actividad de ligasa de ubiquitina de Itch.

Por modulación de la estabilidad de p63 o p73 se entiende efectuar un cambio en el nivel de proteína en equilibrio de las proteínas en presencia de un compuesto candidato comparado con aquellos niveles en ausencia de un compuesto candidato. Los niveles de proteínas se pueden evaluar, por ejemplo, por análisis de transferencia Western.

La actividad y/o expresión de Itch se pueden modular afectando al grado de unión o interacción entre Itch y sus sustratos tales como p63 y p73. A modo de ejemplo, el grado de unión o interacción se puede aumentar usando un agente que se une o interacciona con restos de aminoácidos de Itch y que aumenta la actividad y/o expresión de Itch. A modo de ejemplo adicional, el grado de unión o interacción se puede disminuir usando un agente que se une o interacciona con restos de aminoácidos de Itch que disminuyen la actividad y/o expresión de dicho receptor.

Los agentes que pueden modular la actividad y/o expresión de Itch pueden ser agonistas o antagonistas.

30 Agonistas y antagonistas

Los agentes capaces de aumentar o elevar la actividad y/o expresión de Itch se denominan agonistas.

Los agentes que son capaces de reducir, inhibir o bloquear la actividad y/o expresión de Itch se denominan antagonistas.

Ventajosamente, los métodos de ensayo de la presente invención se pueden usar para identificar agentes, tales como agonistas o antagonistas, que modulan la actividad y/o expresión de Itch.

El término “agonista” como se usa en la técnica, en general se toma para referirse a un compuesto o agente que se une a una proteína y aumenta su actividad. Sin embargo, el término como se usa aquí, se pretende que se refiera de forma amplia a cualquier agente, que aumente la actividad y/o expresión de Itch, no necesariamente uniéndose a la misma. Por consiguiente, incluye agentes que aumentan la expresión de una o más proteínas, o la biosíntesis de una molécula, o la expresión de moduladores de la actividad de Itch. La actividad específica que se aumenta puede ser cualquier actividad que sea característica de Itch.

El agonista se puede unir y competir por uno o más sitios de Itch. Sin embargo, no es necesario que el agonista se una necesariamente directamente al sitio de unión o activo de Itch, y se puede unir por ejemplo a un sitio adyacente, otra proteína (por ejemplo, una proteína que forma complejo con Itch) u otra entidad sobre o en la célula, siempre que su unión aumente la expresión y/o actividad de Itch.

El aumento de la actividad de una ligasa de ubiquitina también se puede lograr aumentando el nivel de expresión de Itch en la célula.

En algunas realizaciones, la presente invención se basa en el bloqueo o disminución de la actividad de Itch. Los agentes que son capaces de dicha actividad se denominan “antagonistas de Itch”.

50 El término “antagonista” se pretende que se refiera de forma amplia a cualquier agente que inhibe, bloquea o disminuye la actividad o activación de Itch, no necesariamente uniéndose a la misma. Por consiguiente, incluye agentes que afectan a la expresión de Itch, o la expresión de moduladores de la actividad de Itch. La actividad que

- se inhibe puede ser cualquier actividad que sea característica de Itch, tal como actividad de ligasa de ubiquitina. Preferiblemente, la actividad que se inhibe, bloquea o disminuye es la ubiquitinación de p73 o p63. Más preferiblemente, la actividad, que se inhibe, bloquea o disminuye es la ubiquitinación y por lo tanto la degradación dependiente de proteosoma de sus sustratos, incluyendo p73 y p63. Lo más preferiblemente, la inhibición, bloqueo o disminución de la actividad de ligasa de ubiquitina Itch, media la inducción de la apoptosis en células a través de los niveles aumentados de los sustratos de Itch tales como p73 y p63.
- El antagonista se puede unir y competir por uno o más sitios de unión o activos en Itch. Dicha unión puede bloquear, inhibir o disminuir interacciones con sustratos de Itch. Dicha unión puede bloquear, inhibir o disminuir la interacción entre Itch y p73 o p63. Sin embargo, el antagonista no tiene que unirse necesariamente directamente a Itch, y puede unirse, por ejemplo, a un sitio adyacente, otra proteína (por ejemplo, una proteína que forma complejo con Itch) o cualquier otra entidad sobre o en la célula, siempre que su unión bloquee, inhiba o disminuya la actividad de Itch.
- Un antagonista de Itch puede incluir un ligando de Itch, o un fragmento de este que es capaz de unirse a Itch. Además, se puede usar un ligando entero, o fragmentos, generado de forma natural o por síntesis de péptidos, para competir con el ligando por el sitio de unión en Itch. Alternativamente, o además, se puede usar una inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal) capaz de unirse a Itch. El antagonista también puede incluir un péptido u otra molécula pequeña, que sea capaz de interferir con la interacción de unión. El antagonista también puede incluir un aptámero. Otros ejemplos de antagonistas se exponen con mayor detalle más adelante, y también serán evidentes para el experto.
- El bloqueo, inhibición o disminución de la actividad de Itch también se puede lograr reduciendo el nivel de expresión de Itch en la célula. Por ejemplo, la célula se puede tratar con compuestos antisentido, ARNs o ribozimas, por ejemplo, que tienen secuencias específicas para Itch.
- En una realización muy preferida, el antagonista de Itch es un antagonista de Itch selectivo. Como se usa en la presente memoria, la expresión "antagonista de Itch selectivo" significa un antagonista que tiene una selectividad de al menos 100 veces frente a ligasas de ubiquitina relacionadas incluyendo, por ejemplo, mdm2, NEDD4 y cCbl.
- Ventajosamente, el antagonista de Itch se puede usar en el tratamiento del cáncer o anomalías epidérmicas. Otros trastornos incluyen trastornos reguladores del sistema inmunitario.
- A modo de ejemplo solo, los antagonistas de Itch se pueden identificar usando métodos para detectar la actividad de ligasa de ubiquitina tal como los descritos en el documento WO 01/75145, por ejemplo. Brevemente, un antagonista candidato, Itch, preferiblemente Itch recombinante (o una variante, homólogo, fragmento o derivado del mismo) y un sustrato de Itch, seleccionado de forma adecuada de p73 y p63, se configuran para permitir la detección de antagonistas de Itch midiendo la incorporación de ubiquitina en los sustratos en presencia o ausencia del antagonista candidato.
- De forma adecuada, la incorporación de ubiquitina se controla usando un sistema que produce una señal que varía con la extensión de la ubiquitinación, tal como la incorporación de ³⁵S-metionina en presencia de ATP y ubiquitina, como se describe en el presente documento. Otros métodos de control incluyen un sistema de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) como se describe, por ejemplo, en el documento WO 01/75145.
- Otro método de cribado de una biblioteca de compuestos o agentes para antagonistas de Itch, usa células hospedantes eucariotas o procariotas, que son transformadas de forma estable con moléculas de ADN recombinantes que expresan una biblioteca de compuesto. Dichas células, sea en forma viable o fijada, se pueden usar para ensayos convencionales de parejas de unión. Véase también, Parce et al. (1989) *Science* 246:243-247; y Owicki et al. (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:4007-4011, que describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares. Los ensayos competitivos son particularmente útiles, donde las células que expresan la biblioteca de compuestos se ponen en contacto o se incuban con un anticuerpo marcado que se sabe que se une a Itch, tal como ¹²⁵I-anticuerpo, y una muestra de ensayo tal como un compuesto candidato cuya afinidad de unión a la composición de unión se ha medido. Las parejas de unión marcadas unidas y libres para el polipéptido, después se separan para evaluar el grado de unión. La cantidad de muestra de ensayo unida es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo marcado que se une al polipéptido.
- Otra técnica para el cribado implica un procedimiento que proporciona el cribado de alta capacidad para compuestos nuevos que tienen una afinidad de unión adecuada, p. ej., a un polipéptido Itch, y se describe con detalle en el documento WO 84/03564. Primero, se sintetiza un gran número de compuestos de ensayo péptidos pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, p. ej., alfileres de plástico o alguna otra superficie adecuada; véase Fodor et al. (1991). A continuación todos los alfileres se hacen reaccionar con polipéptido solubilizado, y se lavan. La etapa siguiente implica la detección del polipéptido unido. Así se identificarán compuestos que interaccionan específicamente con el polipéptido.
- Preferiblemente, los métodos usados para identificar antagonistas de Itch incluyen la etapa adicional de determinar si el antagonista de Itch es un antagonista de Itch selectivo. Esta etapa opcional comprende medir la actividad del antagonista de Itch para la actividad frente a otra ligasa de ubiquitina. Un antagonista de Itch con una selectividad de 100 veces frente a otra ligasa de ubiquitina es indicativo de que el antagonista de Itch es un antagonista de Itch

selectivo.

5 Los ejemplos específicos de potenciales agonistas y antagonistas de Itch incluyen anticuerpos, o en algunos casos, nucleótidos y sus análogos, incluyendo purinas y análogos de purina, oligonucleótidos o proteínas que están estrechamente relacionadas con los sustratos o parejas de unión de Itch, p. ej., un fragmento del sustrato o pareja de unión.

Sujeto

10 El término "sujeto" incluye todos los animales incluyendo seres humanos. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas, caballos y cerdos. Los mamíferos que se van a tratar de acuerdo con esta invención, son sujetos que han desarrollado enfermedades proliferativas incluyendo cáncer, trastornos inmunorreguladores o anomalías epidérmicas y/o padecen los síntomas asociados con la enfermedad, o aquellos que tienen riesgo de desarrollar la enfermedad, por ejemplo, que tienen antecedentes familiares de cualquiera de estos trastornos. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente pacientes individuales que padecen dichos trastornos, así como aquellos que son susceptibles de desarrollar las enfermedades.

Ensayos/métodos

15 Se pueden formular ensayos adecuados para identificar compuestos que interaccionan con y/o modifican la actividad de Itch y/o las interacciones.

Dichos ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, ensayos fluorométricos para la actividad de ligasa, aunque se pueden usar otros métodos de ensayo de lectura.

20 Uno de dichos ensayos adecuados puede ser una reacción en dos etapas en la que el ADNc de p73 o p63 marcado con HA se clona en un vector de expresión bacteriano y se fusiona en el marco con GST (en C-terminal). Hay un sitio de escisión para una proteasa inmediatamente en la dirección del sitio de clonación para permitir la eliminación de la secuencia de GST después de la última etapa de purificación (véase la figura A). El vector de expresión de p63 (o p73)-GST se puede desarrollar en la cepa BL21 y purificar usando un kit comercial. Preferiblemente, la parte de GST de la fusión de p63 (o p73)-GST se puede eliminar por incubación con la proteasa específica (véase la figura A) con el fin de evitar que la secuencia de GST interfiera con la reacción de ubiquitinación. Las placas revestidas con HA-E1 purificado se pueden incubar con GST-Ubc7-E2 y EGFP-Ubiquitina en presencia de ATP (véase la figura A). Posteriormente, los líquidos sobrenadantes de las reacciones de E1/E2 se pondrán en partes alícuotas en placas revestidas con p63- (o p73-)GST en presencia o ausencia de Itch (véase la figura A). Las reacciones se llevarán a cabo en presencia o ausencia de la biblioteca. Después de lavados extensos y restrictivos, las placas se analizarán por inmunofluorescencia de forma adecuada usando un procedimiento automático.

25

30

Se pueden incluir controles negativos adecuados como sigue.

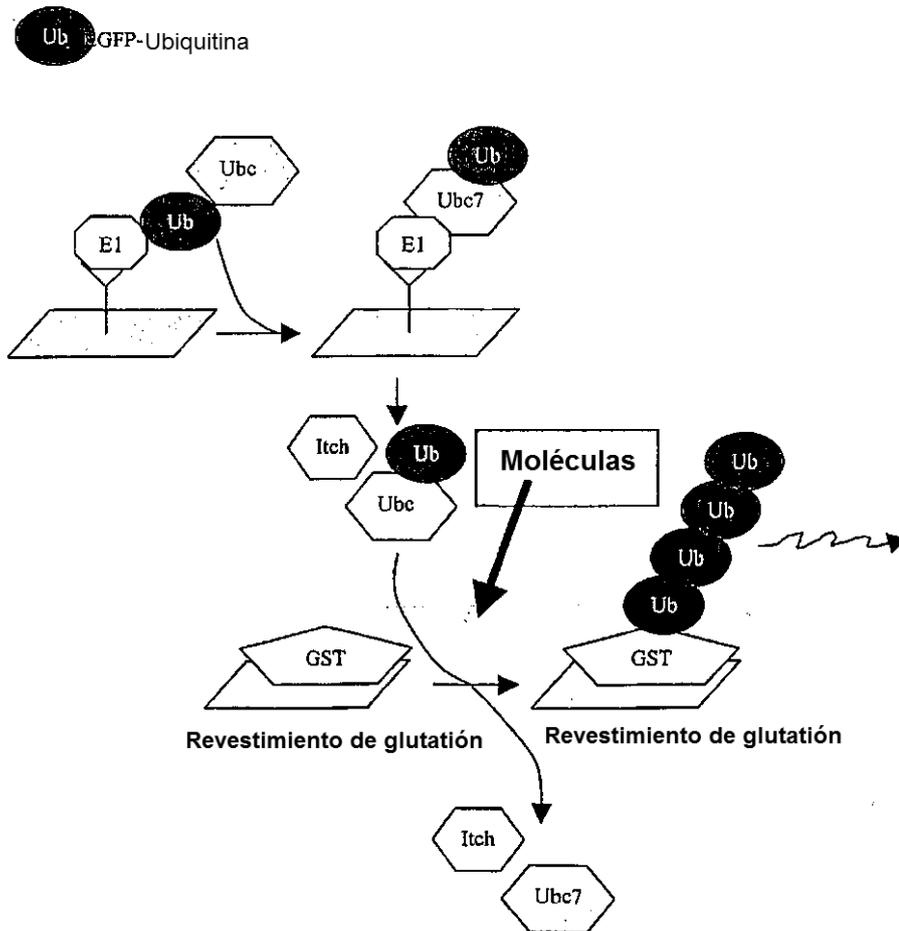
Reacciones E1/E2 en ausencia de E2.

Reacciones E1/E2 en ausencia de ATP.

Reacciones E1/E2 en presencia de un mutante de EGFP-ubiquitina que no puede ser transferido a E3s.

35 Reacciones en presencia de placas recubiertas solo con GST.

Figura A



En un aspecto adicional, se proporciona un método de cribado basado en células para identificar agentes que modulan la actividad y/o expresión de Itch.

- 5 Por lo tanto, una línea celular que expresa Itch se puede usar para cribar agentes que modulen la actividad de Itch y/o la expresión de la misma. Por ejemplo, el cribado de bibliotecas de péptidos o bibliotecas orgánicas hechas con química combinatoria con la línea celular, puede ser útil para la identificación de agentes terapéuticos que funcionan modulando la actividad y/o expresión de Itch. También se pueden cribar compuestos sintéticos, productos naturales, y otras fuentes de materiales potencialmente biológicamente activos usando líneas celulares en una serie de formas
10 consideradas rutinarias para los expertos en la técnica.

El o los agentes que se van a ensayar, se pueden administrar a la célula de varias formas. Por ejemplo, se pueden añadir directamente al medio de cultivo celular o inyectar en la célula. Alternativamente, en el caso de agentes polipéptidos, la célula se puede transfectar con una construcción de ácido nucleico, que dirige la expresión del polipéptido en la célula. Preferiblemente, la expresión del polipéptido está bajo el control de un promotor inducible.

- 15 Por lo tanto, en un aspecto adicional, se proporciona un método de ensayo para identificar uno o más agentes que modulan la actividad y/o expresión de Itch, comprendiendo el método de ensayo las etapas de: (i) proporcionar una célula que expresa o es capaz de expresar Itch o una variante, derivado u homólogo de la misma; (ii) poner en contacto la célula con un agente; y (iii) medir los niveles de ubiquitinación de un sustrato tal como p63 o p73; en donde una diferencia entre a) los niveles de ubiquitinación en ausencia del agente, y b) los niveles de ubiquitinación
20 en presencia del agente, es indicativo de que el agente puede afectar a la actividad y/o expresión de Itch.

- A modo de ejemplo solo, el método de cribado basado en células para identificar agentes que modulan la actividad y/o expresión de Itch se puede llevar a cabo como sigue. Se cultivan en placas células, tales como células Hek293, y se desarrollan hasta confluencia y después se lavan, por ejemplo, con DMEM. El DMEM se elimina de las células y se añade el agente que se va a ensayar o DMEM solo (como control). Después las células se incuban con uno o
25 más agentes. Las células se pueden transfectar adicionalmente con vectores de expresión que codifican los sustratos de Itch p63 o p73. Las células después se incuban y los niveles de ubiquitinación del sustrato se determinan usando transferencia Western, como se describe en la presente memoria, por ejemplo.

Otros ensayos potenciales para cribar inhibidores de Itch

Los cribados para moduladores de Itch también se pueden llevar a cabo controlando los cambios en la autoubiquitinación de Itch. Se describen ensayos adecuados, por ejemplo, en la sección de ejemplos de la presente memoria.

- 5 Se puede configurar un cribado de alta capacidad para identificar inhibidores de una ligasa de ubiquitina tal como Itch, en una serie de formas como entiende el experto en la técnica. Por ejemplo, la formación de la cadena de poliubiquitina se puede ensayar usando TR-FRET (Hong CA, Swearingen E, Mallari R, Gao X, Cao Z, North A, Young SW, Huang SG. 2003. Development of a high throughput time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for TRAF6 ubiquitin polymerization. *Assay Drug Dev Technol* 1:175-80). En este modo, se optimizan mezclas de ubiquitina para que constan en una proporción de dos ubiquitinas marcadas con fluoróforo diferentes, que actúan como una pareja de donador y aceptor para dar una señal de FRET cuando se pongan juntos en un polímero. La ubiquitina se puede marcar con una pareja de FRET directamente, o indirectamente usando un anticuerpo marcado de forma fluorescente o marcando la ubiquitina con biotina con el fin de combinarla con avidina o estreptavidina que llevan un marcador donador o aceptor de FRET. En otra variación, la propia diana de ubiquitinación se puede marcar con biotina y combinarla con un fluoróforo marcado con estreptavidina para usar en combinación con una ubiquitina marcada de forma fluorescente adecuadamente como la pareja de FRET (Yabuki N, Watanabe S, Kudoh T, Nihira S, Miyamoto C. 1999. Application of homogeneous time-resolved fluorescence, HTRFTM, to monitor poly-ubiquitination of wild-type p53. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2:279-87). Este tipo de ensayo se puede configurar sin la necesidad de etapas de lavado, sin embargo, la relación de señal a señal base para este tipo de ensayo tiende a ser peor, y a diferencia de los ensayos ELISA, los ensayos de FRET homogéneos tienen tendencia a interferir con los compuestos de bibliotecas fluorescentes. Los autores también comparan el ensayo FRET con un ensayo de centelleo por proximidad (SPA) usando ubiquitina marcada con I^{125} (I^{125} Ub). Durante la reacción de ubiquitinación, la I^{125} Ub se transfiere al sustrato p53 biotinilado, que a su vez se detecta uniéndose a perlas de PVT SPA recubiertas con estreptavidina, seguido de recuento de centelleo.
- 10
- 15
- 20
- 25 En una modificación del formato ELISA, se pueden configurar ensayos electroquimioluminiscentes para el cribado de inhibidores de ligasas de ubiquitina (Davydov IV, Woods D, Safiran YJ, Oberoi P, Fearnhead HO, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Kenten JH, Vousden KH. 2004. Assay for ubiquitin ligase activity: high-throughput screen for inhibitors of HDM2. *J. Biomol. Screen.* 9:695-703; Kenten JH, Davydov IV, Safiran YJ, Stewart DH, Oberoi P, Biebuyck HA. 2005. Assays for high-throughput screening of e2 and e3 ubiquitin ligases. *Methods Enzymol.* 399:682-701). En este formato el reactivo de detección, por ejemplo, un anticuerpo contra las cadenas de poliubiquitina, se conjuga con un marcador electroluminiscente tal como *tris*-bipiridina-rutenio o sus derivados. Dicho marcador emitirá luz por oxidación en un electrodo en las condiciones químicas adecuadas. Para este tipo de ensayo, los electrodos se incorporan en la base de placas de microvaloración construidas en especial y puesto que la emisión se produce solo cuando el marcador está muy cerca de la superficie del electrodo, se puede eliminar o minimizar el número de etapas de lavado en el procedimiento de ensayo. Dichos ensayos también tienden a tener una buena sensibilidad y margen dinámico.
- 30
- 35

Agente

Como se usa en la presente memoria, el término “agente” puede ser una sola entidad o puede ser una combinación de entidades.

- 40 El agente puede ser un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede ser un compuesto, que se puede obtener o producir por cualquier fuente adecuada, sea natural o artificial. El agente puede ser una molécula de aminoácido, un polipéptido o un derivado químico del mismo, o una combinación de los mismos. El agente puede incluso ser una molécula de polinucleótido, que puede ser una molécula codificante o no codificante. El agente puede ser incluso un anticuerpo.
- 45 El agente se puede diseñar u obtener de una biblioteca de compuestos, que puede comprender péptidos, así como otros compuestos, tales como moléculas orgánicas pequeñas.

- A modo de ejemplo, el agente puede ser un átomo o molécula, en donde una molécula puede ser orgánica o inorgánica, una molécula efectora biológica y/o un ácido nucleico que codifica un agente tal como una molécula efectora biológica, una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, un ácido péptido-nucleico (PNA), un virus, una partícula de tipo virus, un nucleótido, un ribonucleótido, un análogo sintético de un nucleótido, un análogo sintético de un ribonucleótido, un nucleótido modificado, un ribonucleótido modificado, un aminoácido, un análogo de aminoácido, un aminoácido modificado, un análogo de aminoácido modificado, un esteroide, un proteoglicano, un lípido, un ácido graso y un hidrato de carbono. Un agente puede estar en disolución o en suspensión (p. ej., en forma cristalina, coloidal u otra forma en partículas). El agente puede estar en forma de monómero, dímero, oligómero, etc., o de lo contrario en un complejo.
- 50
- 55

El término “agente” también se pretende que incluya una proteína, polipéptido, o péptido incluyendo, pero no limitado a una proteína estructural, una enzima, una citoquina (tal como un interferón y/o una interleuquina), un antibiótico, un anticuerpo policlonal o monoclonal, o una parte eficaz del mismo, tal como un fragmento Fv, cuyo anticuerpo o parte

del mismo puede ser natural, sintético o humanizado, una hormona peptídica, un receptor, una molécula de señalización u otra proteína; un ácido nucleico, como se define más adelante, incluyendo, pero no limitado a un oligonucleótido u oligonucleótido modificado, un oligonucleótido no codificante u oligonucleótido no codificante modificado, ADNc, ADN genómico, un cromosoma artificial o natural (p. ej., un cromosoma artificial de levadura) o una parte del mismo, ARN, incluyendo ARNm, ARNt, ARNr, ARNsi o una ribozima, o un ácido péptido-nucleico (PNA); un virus o partículas de tipo virus; un nucleótido o ribonucleótido o análogo sintético del mismo, que puede estar modificado o no modificado; un aminoácido o análogo del mismo, que puede estar modificado o no modificado; una hormona no peptídica (p. ej., esteroide); un proteoglicano; un lípido; o un hidrato de carbono. También están incluidas moléculas pequeñas, incluyendo compuestos químicos inorgánicos y orgánicos, que se unen a Itch. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a péptidos pequeños o moléculas de tipo péptidos.

Típicamente, el agente será un compuesto orgánico. Típicamente los compuestos orgánicos comprenderán dos o más grupos hidrocarbilo. Aquí, la expresión "grupo hidrocarbilo" significa un grupo que comprende al menos C e H y opcionalmente puede comprender uno o más sustituyentes adecuados distintos. Los ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halógeno, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C entonces esos carbonos no tienen que estar necesariamente unidos entre sí. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos por un elemento o grupo adecuado. Por lo tanto, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, preferiblemente el agente comprende al menos un grupo cíclico. El grupo cíclico puede ser un grupo policíclico, tal como un grupo policíclico no condensado. Para algunas aplicaciones, el agente comprende al menos uno de dichos grupos cíclicos unido a otro grupo hidrocarbilo.

El agente puede contener grupos halógeno. Aquí, "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo o yodo.

El agente puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alqueno, alqueno y alqueno, que pueden ser de cadena no ramificada o ramificada.

El agente puede ser capaz de presentar otras propiedades terapéuticas.

El agente se puede usar en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos, tal como uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos que se pueden usar para tratar enfermedades proliferativas tales como el cáncer.

Si se administran combinaciones de agentes activos, entonces se pueden administrar de forma simultánea, separada o secuencial.

Si el agente es un anticuerpo, entonces puede incluir, pero no se limita a policlonal, monoclonal, quimérico, monocatenario, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que retienen su actividad de unión para una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab')₂ y F(ab')₂, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos y sus fragmentos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo, como se describe en el documento EP-A-239400. Además, también se pueden usar anticuerpos con regiones variables totalmente humanas (o sus fragmentos), por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. 5.545.807 y 6.075.181. Anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos se pueden producir por técnicas convencionales, tales como por inmunización o usando una biblioteca de presentación de fagos.

Se puede usar un polipéptido o péptido de Itch para desarrollar un anticuerpo por técnicas conocidas. Dicho anticuerpo puede ser capaz de unirse específicamente a la proteína Itch o un homólogo, variante, fragmento o derivado de la misma.

Si se desean anticuerpos policlonales, un mamífero seleccionado (p. ej., ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) se puede inmunizar con una composición inmunógena que comprende un polipéptido o péptido de Itch. Dependiendo de las especies hospedantes, se pueden usar diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero no se limitan a adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes humanos potencialmente útiles que se pueden usar si se administra la secuencia de aminoácidos de la sustancia purificada a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

Se recoge el suero del animal inmunizado y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales contra un epítipo que se puede obtener de un polipéptido de Itch, contiene anticuerpos contra otros antígenos, los anticuerpos policlonales se pueden purificar por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Con el fin de que se puedan hacer dichos anticuerpos, la invención también proporciona secuencias de aminoácidos de la

invención o fragmentos de los mismos haptenizados con otra secuencia de aminoácidos para usar como inmunógenos en animales o seres humanos.

5 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos que se pueden obtener de un polipéptido o péptido de Itch también los puede producir fácilmente el experto en la técnica. La metodología general para hacer anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Las líneas celulares que producen anticuerpos inmortales se pueden crear por fusión celular, y también por otras técnicas tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra epítomos de órbita se pueden cribar según diferentes propiedades, es decir, por isotipo y afinidad de epítomo.

10 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a la técnica del hibridoma descrita originalmente por Koehler y Milstein (1975 *Nature* 256:495-497), la técnica del trioma, técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al. (1983) *Immunol Today* 4:72; Cote et al (1983) *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

15 Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para producir "anticuerpos quiméricos", corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con la especificidad del antígeno y actividad biológica adecuadas (Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda et al. (1985) *Nature* 314:452-454). Alternativamente, se pueden adaptar técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patentes de EE.UU. n° 4.946.779) para producir la sustancia específica de anticuerpos monocatenarios.

20 Los anticuerpos también se pueden producir induciendo la producción in vivo en la población de linfocitos o mediante cribado de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos, como describen Orlandi et al (1989, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 3833-3837), y Winter G y Milstein C (1991; *Nature* 349:293-299).

25 También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específicos para el polipéptido o péptido de Itch. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los enlaces disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse WD et al. (1989) *Science* 256:1275-1281).

30 Las técnicas para producir los anticuerpos monocatenarios (patentes de EE.UU. n° 4.946.778) también se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios contra polipéptidos de Itch. También se pueden usar ratones transgénicos y otros organismos incluyendo otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados.

35 El agente puede ser un aptámero, es decir, un oligonucleótido que es capaz de formar un complejo con una diana prevista, tal como Itch. Los aptámeros se pueden preparar por cualquier método conocido, incluyendo métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y se pueden usar solos o en combinación con otros aptámeros específicos para la misma diana. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios, de doble cadena, o incluso de estructuras de triple o cuádruple cadena. En general, son necesarios un mínimo de aproximadamente 3 nucleótidos, preferiblemente al menos 5 nucleótidos, para realizar la unión específica. Los oligonucleótidos de secuencias más cortas que 10 bases pueden ser factibles si se puede obtener la interacción adecuada en el contexto del entorno en el que se encuentra la diana, aunque están contemplados aptámeros de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos o más de longitud. Los métodos para construir y determinar las características de unión de aptámeros son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichas técnicas se describen en US 5.582.981, 5.595.877 y 5.637.459. Se pueden encontrar enseñanzas generales sobre aptámeros en Blackwell et al., *Science* (1990) 250:1104-1110; Blackwell et al., *Science* (1990) 250:1149-1152; Tuerk y Gold, *Science* (1990) 249:505-510; y Joyce, *Gene* (1989) 82:83-87.

Célula

50 La célula (p. ej., tejido) que se usa de acuerdo con la presente invención, es una célula que expresa Itch. La célula puede ser cualquier célula procarionta o eucarionta. Las células que son particularmente útiles en el contexto de la presente invención incluyen células de mamífero y, en particular, células humanas de una variedad de tipos de células.

Preferiblemente, la célula se selecciona del grupo que consiste en células renales embrionarias humanas tales como Hek293, HeLa, MEF, células de carcinoma pulmonar humano tales como H1299 y células de osteosarcoma humano tales como Saos-2.

55 Un experto en la técnica apreciará que también se pueden usar otras células de acuerdo con la presente invención, tales como células hospedantes que expresan Itch y/o sus sustratos incluyendo p63 y p73. Estas células pueden ser particularmente útiles cuando se usan en ensayos o cribados para identificar antagonistas de Itch. Las células

5 hospedantes incluyen cualquier célula que pueda comprender una secuencia de nucleótidos de Itch y/o una secuencia de nucleótidos de p63 o p73 (o una variante, homólogo, fragmento o derivado de los mismos) que codifica Itch recombinante o sus sustratos, en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos cuando está presente en la célula hospedante. Las células hospedantes se elegirán para ser compatibles con el vector que lleva la secuencia de nucleótidos y pueden ser por ejemplo procariotas o eucariotas.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido y/o que se desee el procesamiento adicional de la proteína expresada, se pueden usar hospedantes procariotas u hospedantes eucariotas, tales como levaduras u otros hongos.

10 El uso de células hospedantes adecuadas, tales como células hospedantes de mamífero, levadura, hongo y planta, puede proporcionar modificaciones postraduccionales (p. ej., miristoilación, glicosilación, procesamiento proteolítico, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según sea necesario para conferir la actividad biológica óptima de los productos de expresión recombinantes.

ARNsi

15 Se puede suministrar un ácido nucleico a una célula que modula la actividad y/o expresión de Itch, por ejemplo, a nivel de transcripción, estabilidad del transcrito, traducción o estabilidad postraduccionales. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser una secuencia antisentido o un ARNsi.

La inhibición de la expresión de genes usando la tecnología antisentido es bien conocida. Por ejemplo, se describen con detalle construcciones antisentido en el documento US 6.100.090 (Monia et al.), y Neckers et al., 1992, *Crit Rev Oncog* 3(1-2):175-231.

20 El ARNsi puede comprender ARN parcialmente purificado, ARN sustancialmente puro, ARN sintético o ARN producido de forma recombinante, así como ARN alterado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o modificación de uno o más nucleótidos.

25 Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleótido, tal como nucleótidos modificados, por ejemplo, al o a los extremos del ARNsi o a uno o más nucleótidos internos del ARNsi, incluyendo modificaciones que hacen al ARNsi resistente o incluso más resistente a la digestión por nucleasas.

30 Típicamente, el ARNsi estará en forma de ARNsi aislado que comprende ARN de doble cadena corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 19-25 nucleótidos contiguos de longitud, que son dirigidos a un ARNm diana. El ARNsi comprende una cadena de ARN codificante y una cadena de ARN complementaria no codificante, reasociadas entre sí por interacciones de pares de bases de Watson-Crick convencionales. La cadena codificante comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana.

35 Una secuencia diana en el ARNm diana que codifica Itch se puede seleccionar de una secuencia dada, tal como una secuencia de ADNc, que corresponde al ARNm diana, usando diferentes métodos de la técnica. Por ejemplo, se describe el diseño racional de ARNsi en *Nat. Biotechnol.* (2004) 22(3):326-30. Se describen en la presente memoria moléculas de ARNsi adecuadas.

Aunque el silenciamiento con ARNsi es muy eficaz seleccionando una sola diana en el ARNm, puede ser conveniente diseñar y usar dos dúplex de ARNsi independientes para controlar la especificidad del efecto de silenciamiento.

40 El ARNsi se puede obtener usando una serie de técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el ARNsi se puede sintetizar químicamente usando fosforamiditas de ribonucleósidos adecuadamente protegidos y un sintetizador convencional de ADN/ARN. El ARNsi se puede sintetizar como dos moléculas de ARN complementarias, separadas, o como una sola molécula de ARN con dos regiones complementarias.

45 El ARNsi se puede producir de forma recombinante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARNsi se puede expresar a partir de plásmidos de ADN circulares o lineales recombinantes, usando un promotor adecuado. Los plásmidos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNsi en un tejido particular o en un entorno intracelular particular.

Tratamiento

50 Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" incluye curar o tratar trastornos proliferativos incluyendo el cáncer, hacer que los síntomas de dichos trastornos disminuyan, y eliminar o aliviar de otra forma la enfermedad.

Productos farmacéuticos

Los agentes, tales como antagonistas de Itch, que modulan (p. ej., disminuyen) la actividad y/o expresión de Itch, típicamente se formularán en una composición farmacéutica. En relación con esto, y en particular para la terapia

humana, incluso aunque los agentes descritos en la presente memoria se pueden administrar solos, en general se administrarán mezclados con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.

5 A modo de ejemplo, en las composiciones farmacéuticas, los agentes se pueden mezclar con cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de revestimiento o agente(s) de solubilización adecuado(s).

Los comprimidos o cápsulas de los agentes se puede administrar individualmente o dos o más de una vez, según sea adecuado. También se pueden administrar los agentes en formulaciones de liberación sostenida.

10 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para tratar trastornos proliferativos en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de Itch.

15 Típicamente, las composiciones farmacéuticas, que pueden ser para uso humano o animal, comprenderán uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. Como se ha indicado antes, las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de revestimiento, agente(s) de solubilización adecuado(s).

Para algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas comprenderán un agente que se ha cribado mediante método(s) de ensayo descritos en la presente memoria.

20 Dichas moléculas pueden proporcionar la base para el tratamiento de trastornos proliferativos tales como el cáncer. Por ejemplo, dichas moléculas se pueden usar para aumentar la apoptosis.

25 Los vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, virus del herpes o vaccinia, o de diferentes plásmidos bacterianos, se pueden usar para suministrar moléculas recombinantes codificantes o no codificantes a la población de células a las que van dirigidos. Se pueden usar métodos, que son bien conocidos para los expertos en la técnica, para construir vectores recombinantes que contienen el receptor. Alternativamente, el receptor recombinante se puede suministrar a células diana en liposomas.

La composición farmacéutica puede ser para uso veterinario (es decir, animal) o para uso humano.

Las composiciones farmacéuticas obtenidas pueden ser útiles para prevenir y/o tratar trastornos proliferativos tales como el cáncer.

30 Los expertos en la técnica apreciarán que el agente puede proceder de un profármaco. Los ejemplos de profármacos incluyen algún o algunos grupos protegidos que pueden no tener la actividad farmacológica como tal, pero, en determinadas circunstancias, se pueden administrar (tal como por vía oral o parenteral) y después ser metabolizados en el cuerpo para formar un agente que es farmacológicamente activo.

35 Se apreciará además que determinados restos conocidos como "pro-restos", por ejemplo, como se describe en "Design of Prodrugs" de H. Bundgaard, Elsevier, 1985, se pueden colocar en grupos funcionales adecuados de los agentes. Dichos profármacos también están incluidos dentro del alcance de la invención.

El agente se puede administrar como una sal farmacéuticamente aceptable. Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar fácilmente usando un ácido o base deseado, según sea adecuado. La sal puede precipitar de la solución y ser recogida por filtración o se puede recuperar por evaporación del disolvente.

40 El agente se puede preparar por técnicas de síntesis química.

Será evidente para los expertos en la técnica que puede ser necesario proteger y desproteger los grupos funcionales sensibles, durante la síntesis de un compuesto de la invención. Esto se puede lograr por técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en "Protective Groups in Organic Synthesis" de T W Greene y P G M Wuts, John Wiley and Sons Inc. (1991), y de P.J. Kocienski, en "Protecting Groups", Georg Thieme Verlag (1994).

45 Durante algunas de las reacciones, es posible que cualquiera de los estereocentros presentes, en determinadas condiciones, pueda ser racemizado, por ejemplo, si se usa una base en una reacción con un sustrato que tiene un centro óptico que comprende un grupo sensible a bases. Esto es posible, por ejemplo, durante la etapa de guanilación. Debería ser posible evitar potenciales problemas tales como este, seleccionando la secuencia de reacción, condiciones, reaccionantes, regímenes de protección/desprotección, etc., como se conoce bien en la técnica.

50

El compuesto y las sales se pueden separar y purificar por métodos convencionales.

La separación de diastereoisómeros se puede conseguir por técnicas convencionales, p. ej., por cristalización

- fraccionada, cromatografía o HPLC de una mezcla de estereoisómeros de un compuesto de fórmula (I) o una sal adecuada o derivado de los mismos. También se puede preparar un enantiómero individual de un compuesto de fórmula (I) a partir del correspondiente compuesto intermedio ópticamente puro o por resolución, tal como por HPLC del correspondiente racemato usando un soporte quiral adecuado o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisómeras formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo.
- 5 El agente o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o compuestos miméticos de los mismos, se puede producir usando métodos químicos para sintetizar el agente entero o en parte. Por ejemplo, si el agente comprende un péptido, entonces el péptido se puede sintetizar por técnicas en fase sólida, escindir de la resina, y purificar por cromatografía de líquidos de alto rendimiento preparativa (p. ej., Creighton (1983) *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co, New York NY). La composición de los péptidos sintéticos se puede confirmar por análisis de aminoácidos o secuenciación (p. ej., el procedimiento de degradación de Edman; Creighton, véase antes).
- 10 La síntesis de agentes peptídicos (o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o compuestos miméticos de los mismos) se puede llevar a cabo usando diferentes técnicas en fase sólida (Roberge JY et al. (1995) *Science* 269: 202-204) y la síntesis automática se puede lograr, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Además, las secuencias de aminoácidos que comprende el agente, se pueden alterar durante la síntesis directa y/o combinar usando métodos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquier parte de la misma, para producir un agente variante.
- 15 El agente puede ser un agente modificado, tal como, pero no limitado a un agente químicamente modificado.
- La modificación química de un agente puede potenciar o reducir las interacciones por enlace de hidrógeno, interacciones de cargas, interacciones hidrófobas, interacciones de Van Der Waals o interacciones de dipolos.
- En un aspecto, el agente puede actuar como un modelo (por ejemplo, un molde) para el desarrollo de otros compuestos).
- 20 **Administración**
- El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas y no víricas. Los mecanismos de suministro víricos incluyen, pero no se limitan a vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos del herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen la transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, compuestos anfífilicos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de los mismos.
- 25 Los componentes se pueden administrar solos, pero en general se administrarán como una composición farmacéutica, p. ej., cuando los componentes están mezclados con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.
- 30 Por ejemplo, los componentes se pueden administrar en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes de sabor o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, en pulsos o controlada.
- Si el producto farmacéutico es un comprimido, entonces el comprimido puede contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón-glicolato sódico, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato magnésico, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.
- 35 También se pueden usar composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, sacarosa o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente se puede combinar con diferentes agentes edulcorantes o de sabor, materia colorante o colorantes, con agentes de emulsión y/o suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- 40 Las vías de administración (suministro) pueden incluir, pero no se limitan a una o más de la vía oral (p.ej., como un comprimido, cápsula o una solución ingerible), tópica, mucosa (p. ej., como un pulverizador nasal o aerosol para la inhalación), nasal, parenteral (p. ej., por una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracamerular), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural, sublingual.
- 45 De forma conveniente, la administración puede ser por inhalación. Los nebulizadores disponibles en el comercio
- 50
- 55

para formulaciones líquidas, incluyendo los nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos, son útiles para dicha administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de reconstitución.

- 5 Para la administración por inhalación, los agentes se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverizador en aerosol de envases presurizados o nebulizadores. Los agentes también se pueden suministrar como polvos que se pueden formular y la composición en polvo se puede inhalar con la ayuda de un dispositivo inhalador de insuflación de polvo.

Niveles de dosis

- 10 Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosis específico y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular, se puede variar y dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico usado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia individual en curso.

- 15 **Formulación**

El o los componentes se pueden formular en una composición farmacéutica, tal como mezclando uno o más de un vehículo, diluyente o excipiente adecuado, usando técnicas que son conocidas en la técnica.

Kits

Los materiales para usar en la presente invención son perfectamente adecuados para la preparación de kits.

- 20 De forma adecuada, el kit es un kit de diagnóstico para medir la expresión de Itch en tumores. El uso de dicho kit, por ejemplo, permitirá el diagnóstico de tratamiento puesto que la expresión de Itch se correlaciona con la falta de sensibilidad a la terapia o se correlaciona de forma inversa con la supervivencia.

Técnicas generales de metodología de ADN recombinante

- 25 La presente invención usa, salvo que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están en la experiencia del experto en la técnica. Dichas técnicas están explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódico; *Current Protocols in Molecular Biology*, capítulos 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, "DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques", John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach", Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, "Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology", Academic Press. Cada uno de estos textos generales se incorpora en la presente memoria por referencia.

- 35 La invención se describirá ahora con más detalle mediante ejemplos, que se pretende que sirvan para ayudar al experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no se pretende de ninguna forma que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - La proteína ligasa de ubiquitina Itch regula la estabilidad de p73

Materiales y métodos

- 40 **Plásmidos**

- Los plásmidos Myc-Itch y Myc-Itch MUT (C830A) los proporcionó el Dr. T. Pawson (Winberg, 2000). Las proteínas de fusión de Itch y GST, se generaron por subclonación de fragmentos de la PCR en sitios *Bam*HI y *Sal*I de pGEX-6P1 (Amersham Pharmacia Biotech). Se clonaron los siguientes fragmentos: GST-Itch, de Thr 277 a Glu 903 (que carece del dominio C2 N-terminal) y GST-WW, de Pro 317 a Pro 520 (que abarca solos los cuatro dominios WW). HA-p73 α y HA-p73 β se han descrito previamente (De Laurenzi, 1998). La proteína de fusión GST-p73 que abarca solo el motivo PY (GST-PY, de Met 452 a Ala 489) se obtuvo por subclonación en sitios *Bam*HI y *Not*I de pGEX-6P1. La construcción de poli-HA-ubiquitina (HA-Ub) la proporcionó generosamente el Dr. D. Bohmann (Treier, 1994). Los vectores de expresión bacterianos pET23a-Ubch7 (E2) que dirigen la síntesis de la enzima E2 (Ubch7) y la enzima E1 activadora de ubiquitina Uba1 fueron un regalo del Dr. P.M. Howley (Kumar, 1997). El plásmido indicador que contiene el ADnc de luciferasa bajo el control del promotor de Bax y p21 lo proporcionó el Dr. Levrero (Vossio, 2002); éste bajo el control del promotor de MDM2 los proporcionó el Dr. Blandino (Strano, 2001). La construcción Nedd4-myc fue un regalo del Dr. D. Rotin. Todos los mutantes de p73 se generaron mediante mutagénesis dirigida usando el kit Quickchange (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cultivo celular y transfección

Células renales embrionarias humanas (Hek293), células HeLa y MEF se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GibcoBRL); las células de carcinoma pulmonar humano H1299 y las células de osteosarcoma humano Saos-2 se cultivaron en RPMI (GibcoBRL). Las células MEF Itch -/- se prepararon a partir de ratones Itch -/- (Y-C-Liu) o fueron un regalo generoso de Neil Copeland, Lynda Matesic, Nancy Jenkins. Todos los medios se complementaron con suero bovino fetal al 10% (v/v) (FBS) (GibcoBRL). Saos-2-TAp73 α fueron un regalo generoso de K. Vousden (Nakano, 2000). Saos-2- Δ Np73 α se generaron como se ha descrito antes (Maisse et al., 2004). Para las líneas celulares TET-On el medio se complementó con FBS exento de tetraciclina al 10%(v/v) (Clonotech). Los genes se indujeron por adición de doxiciclina 0,5 μ g/ml. Todas las líneas celulares se desarrollaron a 37°C en una atmosfera humidificada de 5% (v/v) de CO₂ en aire. Se llevó a cabo la transfección transitoria con el reactivo lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La apoptosis se analizó por evaluación por citometría de flujo de fragmentación de ADN.

Transferencia Western y anticuerpos

Las proteínas se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Los filtros se bloquearon con TBST con leche en polvo desnatada al 5% y se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 h a temperatura ambiente (T.a.). Los filtros se incubaron durante 1 hora a T.a. usando el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante adecuado (conejo y ratón BioRad; cabra Santa Cruz). La detección se llevó a cabo con la quimioluminiscencia potenciada de Supersignal West Pico (Pierce). Anti-p73 es un anticuerpo monoclonal (ER15) (Neomarkers). Itch endógeno se detectó con anticuerpo monoclonal de ratón (BD Bioscience), anticuerpo policlonal de cabra para actina (sc-1615) (Santa Cruz), anticuerpo policlonal de cabra para lámina B (sc-6217) (Santa Cruz), anticuerpo policlonal de cabra para Hsp70 (sc-1060) (Santa Cruz), anticuerpo policlonal de conejo para β -Tubulina (sc-9104) (Santa Cruz), anticuerpo policlonal de conejo para p21 (sc-756) (Santa Cruz), anticuerpos monoclonales de ratón para p53 DO-1 y Pab1801 (Santa Cruz). Las construcciones marcadas con c-Myc se detectaron o inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal de ratón sc-40 (Santa Cruz), las marcadas con HA con anticuerpo policlonal de conejo sc-805 (Santa Cruz), y las construcciones marcadas con Flag con el anticuerpo monoclonal de ratón M2 (Sigma).

Selección de afinidad

Una parte alícuota de una biblioteca de presentación de fagos T7 de ADNc de cerebro humano (Novagen) se incubó durante la noche a 4°C, con 50 μ g de proteína de fusión GST-PY p73 α inmovilizada sobre perlas de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences), en presencia de albúmina de suero bovino al 1%. Los fagos no unidos se separaron lavando cinco veces con 1 ml de Tween 20 al 0,1% en PBS, y después una vez en 1 ml de PBS y se volvieron a suspender en 50 μ l de PBS. Los fagos unidos se recuperaron por incubación a 37°C con 2 ml de *E. Coli* BLT5615 (Novagen) inducido con IPTG 1 mM durante 30 min antes de la adición de fagos. Después de la lisis celular, el lisado de fagos se clarificó por centrifugación, y se usó en un nuevo ciclo de selección. Después de tres ciclos de selección, los fagos resultantes se analizaron por un ensayo en placa (Zucconi, 2001), usando GST-PY purificado soluble en una concentración de 5 μ g/ml. Las placas positivas se aislaron de las placas. 1 μ l de suspensión se amplificó por PCR usando cebadores para las regiones flanqueadoras del inserto, y los fragmentos se secuenciaron. Para calcular el enriquecimiento de Itch, se amplificó por PCR 1 μ l del lisado de fagos clarificado correspondiente a cada uno de los diferentes ciclos de selección (20 ciclos de amplificación).

40 Proteínas de fusión de GST y ensayos *Pull-down*

Las proteínas de fusión de GST se expresaron en *E. Coli* BL21 (DE3) y se purificaron sobre perlas de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) siguiendo procedimientos convencionales. Para el ensayo *pull-down*, se transfectaron células Hek293 con HA-TAp73 α o vector vacío, se lisaron en Tris HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, NaF 100 mM y cócteles de proteasa que contienen Triton X-100 al 1% (Sigma) y se centrifugaron para precipitar los residuos celulares. Primero se preaclaaron 1,5 mg de proteínas celulares totales con perlas de glutatión-sefarosa y después se incubaron durante 2 h a 4°C con proteínas de fusión de GST inmovilizadas (25 μ g). Las proteínas no unidas se separaron lavando 4 veces con Tween 20 al 0,1% en PBS, y los precipitados se resolvieron por SDS-PAGE. Las inmuotransferencias se hibridaron con los anticuerpos indicados.

50 Inmunoprecipitación

55 Siguiendo un procedimiento previamente publicado (Gottifredi, 1999), células Hek293 se transfectaron transitoriamente con 8 μ g de ADN total de los plásmidos de expresión de mamífero indicados y se recogieron 48 h después de transfección. Después las células se lisaron como se ha descrito antes. Después de preaclaado durante 1 h a 4°C, se llevó a cabo la inmunoprecipitación por incubación de 1,5 mg de extractos de células enteras con los anticuerpos indicados, con oscilación a 4°C durante 1 h. Los inmunocomplejos se recogieron por incubación con proteína G agarosa (KPL), se lavaron con tampón Net-gel (Tris 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, gelatina al 0,25%, NP40 al 0,1%). Después las perlas se volvieron a suspender en 5x tampón de Laemmli, y se sometieron a transferencia Western con los anticuerpos primarios indicados.

Ensayos de ubiquitinación

- Se llevaron a cabo ensayos in vitro como se ha descrito previamente (Hamilton, 2001) usando proteínas p73 y p53 radiomarcadas traducidas in vitro. La transcripción/traducción in vitro de las proteínas se llevó a cabo usando el kit TNT de sistema de lisado de reticulocitos de conejo (Promega), en presencia de [³⁵S]Met (Amersham Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La mezcla de reacciones de ubiquitinación contenía: 2 µl de extractos bacterianos de *E. Coli* BL21 que expresaban en exceso E1 de trigo y 2 µl de una E2 humana (UbcH7), 5 µg de enzima E3 purificada (GST-Itch o GSTItch MUT), Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, ditioneitol 1 mM, ATP 2,5 mM, MgCl₂ 4 mM, 10 µg de ubiquitina bovina. Después de incubación durante 90 min a 37°C, las reacciones se terminaron por adición de 5 x tampón de Laemmli, se resolvieron por SDS-PAGE seguido de autorradiografía.
- Para los experimentos in vivo, células Hek293 se transfectaron de forma transitoria con plásmidos de expresión de mamífero para ubiquitina marcada con HA (HA-Ub), con la combinación de plásmidos indicada. 48 h después de transfección, se recogieron las células, la fracción insoluble se separó mediante centrifugación a alta velocidad, y 1 mg de las proteínas celulares totales del líquido sobrenadante clarificado se sometieron a inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-Flag (Sigma). Los conjugados de ubiquitina se detectaron por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos anti-HA (Santa Cruz).

Medición de la semivida de p73

- Disminución de los niveles de proteína p73 en presencia de cicloheximida. Se añadió cicloheximida (20 µg/ml) a células Hek293 24 h después de transfección con un total de 3 µg de los plásmidos indicados en una relación 1:5 de p73/Itch y p53/Itch. Los niveles de proteína se determinaron recogiendo células en los tiempos de medición indicados y llevando a cabo inmunotransferencia como se ha descrito antes. La cantidad relativa de proteína p73 se evaluó por densitometría y se normalizó respecto a la β-tubulina. Seguimientos de pulsos radiactivos ³⁵S. Células H1299 se transfectaron con un total de 3 µg de los plásmidos indicados en una relación de p73/Itch 1:2. 48 h después de transfección las células se privaron de alimento durante 30 min en DMEM con suero dializado y después se marcaron con Redivue PRO-MIX 250 µCi/ml (L-[³⁵S] mezcla de marcaje celular in vitro) durante 60 min. Se añadieron Met y Cys sin marcar y las células se recogieron en tampón RIPA (Tris 200 mM pH 8, NaCl 150 mM, desoxicolato sódico al 0,5%, SDS al 0,1%, NP40 al 1% y EDTA al 0,2 mM) en los tiempos indicados. Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo con 150 µg de lisado de proteína total y 4 µl de anticuerpo policlonal anti-HA (Y-11), Santa Cruz. Los inmunoprecipitados se lavaron seis veces con tampón RIPA y seis veces en NETgel y se llevaron a la SDS-PAGE y se detectaron por autorradiografía.

- Análisis de los niveles en equilibrio de proteína

- La concentración de TAp73α, TAp73δ y p53 se siguió por transferencia Western. 48 h después de cotransfección con HA-TAp73, HA-TAp73δ y HA-p53 y Myc-Itch o Myc-Itch MUT, las células Hek293 se trataron durante 40 min con o sin inhibidor de proteosoma MG132 con una concentración final de 50 µM en DMSO. 25 µg de lisados celulares se sometieron a transferencia Western. Las proteínas p73 se detectaron mediante un anticuerpo anti-HA. Las mismas transferencias se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-Myc para detectar Itch y con el anticuerpo anti-actina para mostrar la misma carga.

Indicador promotor

- Se transfectaron células H1299 con las combinaciones de plásmidos indicadas que codifican p73α (10 ng/pocillo de placa de 96 pocillos), Myc-Itch o Myc-Itch MUT, o vectores vacíos de control junto con el plásmido indicador de luciferasa indicado (60 ng/pocillo) y el indicador de luciferasa Renilla (1,2 ng/ pocillo). La cantidad total de ADN transfectado en cada pocillo se mantuvo constante por la adición de diferentes cantidades de vector vacío. La actividad de la luciferasa se cuantificó usando un kit disponible en el comercio (Dual-Glo, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

ARNsi contra Itch

- Se electroporaron células Saos-2 con 20 ml de solución 20 mM de ARN de veintiún nucleótidos (Qiagen) usando un aparato de electroporación BIO-RAD. Se usó una mezcla de dos oligonucleótidos diferentes para la regulación por disminución de Itch. Las secuencias diana de Itch eran AAGTGCTTCTCAGAATGATGA y AACCACAACACACGAATTACA y la secuencia desordenada era AATTCTCCGAACGTGTACGT. Las células se recogieron después de 48 h y los lisados celulares se sometieron a transferencia Western para la detección de Itch como se ha descrito antes.

Resultados

- MDM2, la ligasa de ubiquitina E3 que regula la degradación de la proteína p53 cognada por una ruta dependiente de proteosoma, se une a p73 pero no promueve su degradación (Balint, 1999; Dobbelstein, 1999; Lohrum, 1999; Ongkeko, 1999; Zeng, 1999).
- Con el fin de definir la ruta de degradación de p73, los autores de la invención buscaron una biblioteca de ADNc

humano presentada en cápsides de bacteriófagos para las parejas de unión específicas de p73. Con el fin de identificar mecanismos distintos de los de p53, como cebo se usó un fragmento C-terminal de p73 puesto que esta región no está presente en p53 y contiene una secuencia PpxY (PY) que se ha caracterizado como un motivo de unión para una clase de dominios WW (figura 1A) (Sudol, 1996).

5 Identificación de Itch como una nueva pareja de interacción de p73

Para identificar nuevas proteínas que se unen a p73, no compartidas con p53, los autores de la invención fusionaron un fragmento de TAp73 α (Met 452 - Ala 489) a la proteína GST (figura 1A) y lo usaron como cebo en un cribado de "presentación en fagos" (Castagnoli, 2001; Cesareni, 1999). Este fragmento contiene una región que no es homóloga a p53 y contiene un motivo de unión de proteína-proteína, conocido como motivo PY (Strano, 2001) (figura 1A) caracterizado por la secuencia consenso PPxY. Este motivo se une a un dominio estructural de 40 aminoácidos de longitud conocido como dominio WW, organizado para formar una lámina β antiparalela, de tres cadenas, que contiene dos restos triptófano (W), separados 20-22 aminoácidos (Sudol, 1996). Después de tres ciclos de selección-afinidad llevados a cabo en una biblioteca de ADNc de cerebro humano presentada por un vector de fago T7, analizaron la población de fagos resultante mediante un ensayo en placa. La mezcla de fagos seleccionados por afinidad contenían un porcentaje alto (25%) de clones positivos que se unían al cebo (figura 1B). Comparando la frecuencia de placas positivas antes y después de selección, se calculó un enriquecimiento de al menos 60 veces (figura 1B). Varios clones contenían fragmentos de proteína que se superponían (todos contenían dominios WW) codificados por el gen Itch (figura 1A). El enriquecimiento de clones que presentaban dominios WW de Itch se confirmó además llevando a cabo reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos que flanquean los dominios WW (de Pro 317 a Pro 520) (figura 1B). En cambio, los clones que contenían el gen β -actina se perdieron rápidamente durante el procedimiento de selección (figura 1B).

p73 pero no p53 se asocia con Itch

Con el fin de verificar que Itch se asocia con p73, los autores de la invención llevaron a cabo un ensayo *pull-down* in vitro. Se transfectaron células Hek293 con un vector vacío o con un vector que codifica TAp73 α marcado con HA. Los lisados celulares se mezclaron por separado con una resina de sefarosa que contenía o bien GST o la región WW de Itch fusionada con GST (GST-WW). TAp73 α fue retenido eficazmente por GST-WW, mientras que no se detectó unión significativa a GST sola (figura 1C). La interacción también se confirmó por coinmunoprecipitación (co-IP) de TAp73 α y Itch expresados en exceso. Como se muestra en la figura 1D la inmunoprecipitación (IP) de Itch marcado con Myc dio como resultado la co-IP de TAp73 α . La adición del inhibidor de proteosoma MG132 produjo una interacción más fuerte. Como se esperaba, puesto que p53 no contiene el motivo PY (figura 1A), no se une a Itch y no se pudo precipitar con Itch independientemente de la presencia del inhibidor de proteosoma (figura 1D). Igualmente, TAp73 β que también carece del motivo PY (figura 1A) no se podía co-IP con Itch (no se muestran los datos). La forma truncada N-terminal Δ Np73 α también se unía a Itch (figura 1E). Para confirmar que la interacción requiere el motivo PY de p73, generaron mutantes de ambos motivos PY encontrados en p73 (figura 1A). La figura 1F muestra que los mutantes que contienen la sustitución Y487F pierden la capacidad de unirse a Itch, mientras que no lo hace el mutante solo TAp73 α _{Y407F}. Con el fin de confirmar que esta interacción también se produce en células en concentraciones fisiológicas, llevaron a cabo la co-IP de proteínas endógenas (figura 1G). De nuevo la IP de p73 endógeno coprecipitó con Itch, mientras que la IP de p53 no.

Estos datos demuestran claramente que las isoformas de p73 α endógenas pueden unirse a los dominios WW de Itch por su motivo PY y que la interacción es selectiva para p73 y no compartida por p53.

p73 es ubiquitinada por Itch

Después los autores de la invención investigaron si p73 puede servir como un sustrato para la actividad de proteína ligasa de ubiquitina Itch. Usaron Itch recombinante (GST-Itch) (Qiu, 2000), en un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro que contenía Ub, E1 de trigo, E2 humana (UbcH7), ATP, y proteína TAp73 α radiomarcada con [³⁵S] sintetizada in vitro como sustrato. En presencia de GST-Itch purificada, la proteína TAp73 α se ubiquitinó, como se muestra por la aparición de especies discretas de TAp73 α de mayor peso molecular (figura 2A, banda 1). Para demostrar que la aparición de formas ubiquitinadas de TAp73 α requiere un dominio Hect Itch intacto, usaron un mutante inactivo de Itch previamente descrito de Itch (GST-Itch MUT) (C830A) (Winberg, 2000). Como se muestra en la figura 2A, este mutante, que retiene la capacidad de unirse a TAp73 α (figura 1D), pierde la capacidad de promover la ubiquitinación de TAp73 α . La incapacidad de Itch para ubiquitinar p73 δ y p53 sugiere que son necesarios los motivos PY, puesto que estas dos proteínas carecen de estos motivos (figura 1A y figura 2A, bandas 4 y 7). Estos datos in vitro también muestran que no se requiere otro factor para que se produzca esta reacción.

Después, los autores de la invención examinaron si Itch puede catalizar la ubiquitinación de p73 en células. Extractos de células Hek293 se transfectaron con plásmidos que expresan: ubiquitina marcada con HA (Ub-HA), Itch marcada con Myc (Myc-Itch) y TAp73 α o p53 marcadas con Flag (Flag-TAp73 α y Flag-p53), se sometieron a IP con anticuerpos anti-Flag y se detectaron con transferencias Western anti-HA y anti-Flag. Como se muestra en la figura 2B (banda 5), los conjugados de Ub-HA TAp73 α se detectaron tras cotransfección solo con Itch natural (Myc-Itch WT), y no con el mutante catalíticamente inactivo de Itch (Myc-Itch MUT) (figura 2B, banda 6). Igualmente, Δ Np73 α era ubiquitinada por Itch (figura 2C), mostrando que la parte N-terminal de la proteína no es necesaria para la

ubiquitinación. En cambio, p53 no era ubiquitinada por Itch (figura 2B 7-9). Aunque la ubiquitinación del mutante TAp73 α _{Y487F} estaba reducida, se observó una mayor reducción con el mutante doble TAp73 α _{Y407F/Y487F} (figura 2D). La ubiquitinación del mutante TAp73 α _{Y407F} era similar a la de p73 natural. El panel derecho (bandas 10-18) en la figura 2B demuestra la especificidad de la reacción, puesto que no se observaron bandas de mayor peso molecular en ausencia de Ub-HA. Estos datos muestran claramente que p73, pero no p53, es ubiquitinada por Itch, sugiriendo que esta proteína tiene una función importante en la regulación de los niveles en equilibrio de proteína p73.

Itch regula la estabilidad de p73 en células

Puesto que la ubiquitinación de proteínas normalmente está asociada con su recuperación (Weissman, 2001), los autores de la invención investigaron si Itch puede regular la abundancia de la proteína p73. Midiendo los niveles de TAp73 α en extractos de células enteras en presencia o ausencia de Itch. Los datos representativos de varios experimentos independientes demuestran que la coexpresión de Myc-Itch y TAp73 α en células da como resultado una disminución notable de los niveles de TAp73 α (figura 3A), indicando que la ubiquitinación dependiente de Itch se dirige a p73 para la degradación. Consecuentemente, el mutante catalítico de Itch no era capaz de alterar la concentración de p73 (figura 3A, banda 3) y los niveles del mutante TAp73 α _{Y487F} (figura 3B) no eran afectados por el exceso de expresión de Itch.

Debido a que la poliubiquitinación en general se dirige a proteínas para la degradación proteosómica (Weissman, 2001), los autores de la invención determinaron el efecto de MG132 en los niveles en equilibrio de TAp73 α . Como se muestra en la figura 3A (bandas 4-6), la adición de MG132 a las células bloquea la degradación de TAp73 α mediada por Itch y daba como resultado la acumulación de las formas ubiquitinadas de TAp73 α (no se muestran los datos). Esto está de acuerdo con los informes previos que muestran que la inhibición proteosómica conduce a la estabilización de la proteína p73 endógena (Balint, 1999). De nuevo, los niveles de TAp73 α y p53 no eran afectados por Itch (figura 3A).

Los autores de la invención confirmaron además estos resultados midiendo la semivida de p73 en presencia o ausencia de Itch, usando dos métodos diferentes. Tanto el seguimiento de pulsos radiactivos usando Met y Cys marcadas con ³⁵S (figura 3C-D), como el bloqueo con cicloheximida (figura 3 E-F), mostraron una notable disminución de las semividas de TAp73 y Δ Np73 en presencia de Itch. En condiciones experimentales similares, no se observó cambio en la semivida de p53 (figura 3G). Para confirmar más la importancia de Itch en el control de los niveles en equilibrio de p73, redujeron los niveles de Itch endógeno mediante ARNsi. Para este fin, usaron células Saos-2 inducibles Tet-On que expresaban p73 (Melino et al., 2004). La figura 4A muestra que, en esta línea celular inducible, la reducción de la expresión de Itch por el ARNsi dio como resultado la inducción más rápida y niveles mayores de la proteína p73. Además, después de retirar la inducción, los niveles de p73 disminuyeron más lentamente cuando se redujo la expresión de Itch (figura 4B).

Igualmente, los niveles en equilibrio de las isoformas TAp73 y Δ Np73 endógenas aumentaron en células Saos-2 cuando Itch se reguló por disminución (figura 4C). Esto confirma que los niveles basales de Itch son importantes en el control de los niveles basales de p73. De acuerdo con esto, los niveles endógenos de Δ Np73 (que es la única isoforma detectable en estas células) aumentaron en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) derivados de ratones deficientes en Itch no agouti-lethal 18H (MEF Itch $-/-$) (figura 4D). La reintroducción de Itch natural en MEF Itch $-/-$ dio como resultado la reducción de niveles de Δ Np73 α endógenos en estas células (figura 4E).

No todos los miembros de la familia de Itch tenían el mismo efecto en p73. Nedd4 se unía (figura 5A) tanto a TAp73 como a Δ Np73, pero no era capaz de catalizar la ubiquitinación de estas proteínas (figura 5C) y por lo tanto no afectaba a su degradación (figura 5B). Miyazaki y colaboradores (Miyazaki et al., 2003) demostraron que NEDL2, otro miembro de la familia Nedd4, se une, ubiquitina y estabiliza p73. Por lo tanto, diferentes ligasas E3 similares a Nedd4, aunque son todas capaces de unirse a los motivos PY de p73, ejercen diferentes efectos en estas proteínas.

Itch disminuye la actividad transcripcional dependiente de p73

Para evaluar si la interacción entre p73 e Itch influye en su actividad transcripcional, los autores de la invención cotransfectaron células H1299 con TAp73 α y Myc-Itch o Myc-Itch MUT y evaluaron la actividad de transcripción de TAp73 α mediante el ensayo indicador de luciferasa usando diferentes promotores de respuesta p53/p73 (*Bax*, *p21* y *MDM2*). Como se muestra en la figura 6 (A-C-E), de acuerdo con una reducción de los niveles de proteína TAp73, la cotransfección de Myc-Itch redujo la actividad transcripcional de TAp73 α en todos los promotores ensayados de una forma dependiente de la dosis. Como se esperaba, la forma mutada de Itch no tenía efecto en la actividad transcripcional de p73 (figura 6B-D-F). La reducción de la actividad del promotor era paralela a una reducción de los niveles endógenos de las proteínas diana p73 tales como p21 (figura 6G).

Itch es regulada por disminución en respuesta al daño al ADN

Puesto que los niveles de proteína TAp73 aumentan en respuesta al daño al ADN (Agami, 1999; Gong, 1999; Yuan, 1999), los autores de la invención investigaron si la expresión de Itch también es modulada después de daño al ADN. En células Saos-2, después de tratamiento con doxorubicina, para inducir daño al ADN, los niveles de proteína Itch endógena se regularon por disminución de una forma dependiente del tiempo (figura 7A) y de la dosis (no se muestra). La reducción de los niveles de Itch era paralela a un aumento de los niveles de TAp73 endógeno (figura

7A). La reducción de Itch también era paralela a un aumento de la apoptosis (figura 7B). Esta respuesta de Itch al tratamiento con doxorubicina no es específico del tipo de célula: la figura 7C muestra un experimento similar usando líneas celulares HeLa, H1299 y Hek293 tratadas con doxorubicina. Estos resultados sugieren que Itch podría ser un regulador importante de los niveles de TAp73 y que tras el daño al ADN, Itch es regulado por disminución permitiendo que aumenten los niveles de TAp73. La figura 9 muestra que la regulación por disminución de Itch por ARNsi sensibiliza a las células frente a la doxorubicina.

Esta ruta es independiente de p53 puesto que el efecto en el ciclo celular y la apoptosis también se observó en líneas celulares que carecen de p53, tal como Saos-2. La disminución dependiente del daño al ADN de los niveles de Itch, no es específica para el tratamiento con doxorubicina, sino que también ocurre cuando las células se tratan con otros agentes que dañan al ADN. Como se muestra en la figura 7D, el tratamiento con cisplatino y etopósido también dio como resultado una reducción notable de los niveles de proteína Itch. Puesto que Itch también afecta a los niveles de Δ Np73, también se esperaba un aumento de esta isoforma en respuesta al daño al ADN. Sin embargo, la figura 7E muestra que, como han publicado previamente los autores de la invención (Maisse et al., 2004), Δ Np73 α a diferencia de TA es degradada rápidamente tras el daño al ADN independientemente de la regulación por disminución de Itch. Con el fin de confirmar que la degradación de Δ Np73 es independiente de Itch, redujeron los niveles de Itch en la línea celular inducible Saos-2- Δ Np73 α , y después indujeron la expresión de Δ Np73 por adición de doxiciclina. El inductor se separó y después se indujo daño al ADN con doxorubicina. Como se muestra en la figura 7F, la reducción de los niveles de Itch produjo una mayor estabilización de Δ Np73 α , pero no previno su degradación en respuesta al tratamiento con doxorubicina.

Discusión

La actividad de p73 depende de sus niveles de proteína en equilibrio y una variedad de pruebas sugieren que la regulación postranscripcional más que el control transcripcional tiene una función principal en la respuesta de p73 al daño al ADN. Tras el daño al ADN, p73 se activa y estabiliza (Catani, 2002), y esto da como resultado la detención del ciclo celular y apoptosis (Agami, 1999; Gong, 1999; Yuan, 1999). p73 raramente está mutado en cánceres, aunque se han encontrado niveles alterados de una o más isoformas de p73 en tumores (Casciano, 2002; Ikawa, 1999; Melino, 2002; Putzer, 2003; Romani, 2003; Tschan, 2000). Se conoce poco sobre las rutas que conducen a la degradación de p73, a pesar de la posible importancia de sus consecuencias en el desarrollo del cáncer y la terapia.

Los niveles en equilibrio de p73 endógeno aumentan en presencia de inhibidores de proteosoma, los que sugiere una función para esta ruta en la degradación de p73 (Balint, 1999; Ongkeko, 1999; Zeng, 1999). Aunque la homología con p53 sugiere que la Ub-proteína MDM2 podría ser la ligasa E3 requerida, la unión de MDM2 a p73 no conduce a la ubiquitinación y degradación de p73, sino que en su lugar conduce a la estabilización de p73 (Balint, 1999; Dobbstein, 1999; Lohrum, 1999; Ongkeko, 1999; Zeng, 1999).

Los autores de la invención han informado recientemente que tras la activación de la MAP quinasa p38, p73 es reclutado en el PML-NB y acetilado por p300. La acetilación protege a TAp73 de la ubiquitinación dando como resultado su estabilización (Bernassola et al., 2004). NEDL2 una ligasa E3 de tipo HECT también se ha informado que se une y ubiquitina p73 dando como resultado su estabilización en lugar de su degradación (Miyazaki et al., 2003). Por lo tanto, la regulación de la estabilidad de p73, y en particular la de sus diferentes isoformas, es complejo y está lejos de estar totalmente comprendida.

Aquí, los autores de la invención han demostrado que Itch se une y ubiquitina selectivamente p73 α . En cambio, no tiene dicho efecto en p53. Sus resultados también muestran una regulación diferente entre la diferentes isoformas C-terminales de p73, puesto que solo las isoformas α y β que contienen el motivo PY son reguladas por Itch, mientras que las isoformas γ y δ que carecen de este dominio escapan de esta regulación. Encontraron que Itch es regulado por disminución rápidamente en respuesta al daño al ADN permitiendo que aumenten los niveles de p73. Por lo tanto, esta respuesta al daño al ADN, selectiva para p73 e independiente de p53, puede ser importante en tumores negativos para p53. Esto lo apoyan descripciones, por ejemplo, en *Cell*, 2004, 119(6):861-72 y *Cell*, 119(6):847-60.

Los autores de la invención han mostrado recientemente que a diferencia de TAp73, las isoformas Δ Np73 son degradadas rápidamente en respuesta al daño al ADN (Maisse et al., 2004). Sus resultados muestran que las isoformas Δ Np73 también son sustratos de Itch y que la regulación por disminución de Itch da como resultado mayores niveles de Δ Np73. La regulación por disminución de Itch en respuesta al daño al ADN debería, por lo tanto, dar como resultado un aumento paralelo de las formas TAp73 y Δ Np73. Sin embargo, este no es el caso y mientras que los niveles de TAp73 realmente aumentan, Δ Np73 es degradada rápidamente (Maisse et al., 2004). En su modelo, parece que Itch es responsable de mantener los niveles tanto de TAp73 como de Δ Np73 bajos en condiciones normales (figura 8). Tras el daño al ADN, la reducción de Itch permite la estabilización tanto de TAp73 como de Δ Np73. Por lo tanto, una segunda ruta debería dirigirse específicamente a Δ Np73 para la degradación. Recientemente, Toh et al., han descrito la capacidad de c-Jun para regular la estabilidad de p73 (Toh et al., 2004). Incluso aunque el mecanismo molecular subyacente no se ha elucidado, aquí c-Jun afecta a la estabilidad de TAp73 y no la de Δ Np73, indicando un efecto diferencial en las dos isoformas principales de p73. Como conclusión, los autores de la invención proporcionan un mecanismo por el cual los niveles de p73 se mantienen normalmente bajos en células, de acuerdo con los niveles basales bajos encontrados en muchos tejidos y líneas celulares, y aumentan en respuesta al daño al ADN (figura 8).

Ejemplo 2 - Una interacción entre p63 e ITCH

Métodos

Plásmidos

5 Los plásmidos Myc-Itch y Myc-Itch MUT (C830A) los proporcionó el Dr. T. Pawson. Flag-TAp63 α y Flag- Δ Np63 α se obtuvieron por subclonación de ADNc de TAp63 α y Δ Np63 α en los sitios *NheI* y *NotI* del pCDNA3.1. La construcción HA-ubiquitina (HA-Ub) la proporcionó generosamente el Dr. D. Bohmann.

Cultivo celular y transfección

10 Células renales embrionarias humanas (Hek293), células HeLa y MEF se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GibcoBRL); las células de carcinoma pulmonar humano H1299 y las células de osteosarcoma humano Saos-2 se cultivaron en RPMI (GibcoBRL). Las células MEF *Itch*^{-/-} se prepararon a partir de ratones *Itch*^{-/-} (Y-C-Liu) o fueron un regalo generoso de Neil Copeland, Lynda Matesic, Nancy Jenkins. Todos los medios se complementaron con suero bovino fetal al 10% (v/v) (FBS) (GibcoBRL). Todas las líneas celulares se desarrollaron a 37°C en una atmosfera humidificada de 5% (v/v) de CO₂ en aire. Se llevó a cabo la transfección transitoria con el reactivo lipofectamina 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La apoptosis se analizó por evaluación por citometría de flujo de fragmentación de ADN.

Transferencia Western y anticuerpos

20 Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Los filtros se bloquearon con TBST con leche en polvo desnatada al 5% y se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 h a temperatura ambiente (T.a.). Los filtros se incubaron durante 1 hora a T.a. usando el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante adecuado (conejo y ratón BioRad; cabra Santa Cruz). La detección se llevó a cabo con la quimioluminiscencia potenciada de Supersignal West Pico (Pierce). Itch endógeno se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón (BD Bioscience), anticuerpo policlonal de cabra para actina (sc-1615) (Santa Cruz), anticuerpo policlonal de conejo para β -Tubulina (sc-9104) (Santa Cruz), las construcciones marcadas con c-Myc se detectaron o inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal de ratón sc-40 (Santa Cruz), y las construcciones marcadas con Flag con el anticuerpo monoclonal de ratón M2 (Sigma).

Inmunoprecipitación

30 Siguiendo un procedimiento previamente publicado (Gottifredi, 1999), células Hek293 se transfectaron transitoriamente con 8 μ g de ADN total de los plásmidos de expresión de mamífero indicados y se recogieron 48 h después de transfección. Después las células se lisaron como se ha descrito antes. Después de preaclarado durante 1 h a 4°C, se llevó a cabo la inmunoprecipitación por incubación de 1,5 mg de extractos de células enteras con los anticuerpos indicados, con oscilación a 4°C durante 1 h. Los inmunocomplejos se recogieron por incubación con proteína G-agarosa (KPL), se lavaron con tampón Net-gel (Tris 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, gelatina al 0,25%, NP40 al 0,1%). Después las perlas se volvieron a suspender en 5x tampón de Laemmli, y se sometieron a transferencia Western con los anticuerpos primarios indicados.

35 Ensayos de ubiquitinación

40 Células Hek293 se transfectaron de forma transitoria con plásmidos de expresión de mamífero para ubiquitina marcada con HA (HA-Ub), con la combinación de plásmidos indicada. 48 h después de transfección, se recogieron las células, la fracción insoluble se separó mediante centrifugación a alta velocidad, y 1 mg de las proteínas celulares totales del líquido sobrenadante clarificado se sometieron a inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-Flag (Sigma). Los conjugados de ubiquitina se detectaron por análisis de inmunotransferencia Western usando anticuerpos anti-HA (Santa Cruz).

Medición de la semivida de p63

45 Disminución de los niveles de proteína p63 en presencia de cicloheximida. Se añadió cicloheximida (20 μ g/ml) a células Hek293 24 h después de transfección con un total de 3 μ g de los plásmidos indicados en una relación 1:5 de TAp63/Itch y Δ Np63/Itch. Los niveles de proteína se determinaron recogiendo células en los tiempos de medición indicados y llevando a cabo inmunotransferencia como se ha descrito antes. La cantidad relativa de proteína p63 se evaluó por densitometría y se normalizó respecto a la β -tubulina.

Análisis de los niveles en equilibrio de proteína

50 Los niveles de TAp63 α Δ Np63 α se determinaron 48 h después de cotransfección con HA-TAp63 y HA- Δ Np63 α , en presencia o ausencia de Myc-Itch o Myc-Itch MUT. 25 μ g de lisados celulares se sometieron a transferencia Western. Las proteínas p63 se detectaron usando un anticuerpo anti-HA. Las mismas transferencias se volvieron a hibridar con anticuerpo anti-Myc para detectar Itch y con anticuerpo anti-tubulina como control de carga.

Resultados y discusión

ITCH interacciona con p63α

p63α, así como p73α, tiene una región rica en prolina en su extremo C, que está presente tanto en las isoformas TA como ΔN, y se sabe que interacciona con los dominios WW, tales como los presentes en ITCH. Los autores de la invención ensayaron si ITCH interacciona con las proteínas Tap63α y ΔNp63α llevando a cabo experimentos de inmunoprecipitación (co-IP) en células 293T. Encontraron que ICTH interacciona predominantemente con la isoforma ΔNp63α (figura 10). Actualmente están ensayando si la mutación del dominio rico en prolina produce la pérdida de la unión a ITCH. Estudios previos mostraron que es probable que el dominio de transactivación TA de p63α esté implicado en interacciones intramoleculares que pueden enmascarar secuencias C-terminales. Por lo tanto, es posible que la región rica en prolina de p63α sea más accesible en isoformas ΔN, permitiendo así la interacción con proteínas que contienen un dominio WW, tal como ITCH.

ICTH ubiquitina p63α

Puesto que ITCH interacciona con p63α, los autores de la invención evaluaron después si p63α puede servir como un sustrato de la actividad de ligasa de ubiquitina de ITCH. Para este fin, expresaron en exceso ITCH junto con TAp63α y ΔNp63α y ubiquitina marcada con HA y analizaron los niveles de ubiquitinación de p63 (figura 11). Como se esperaba, basándose en los resultados de los experimentos de co-IP, solo la ubiquitinación de ΔNp63α era notablemente inducida por ITCH (figura 11), demostrando así las consecuencias funcionales de la interacción de ITCH/p63.

ITCH afecta a los niveles en equilibrio y la semivida de p63α

Con el fin de determinar si la ubiquitinación de p63α dependiente de ITCH promueve su regulación por disminución, los autores de la invención midieron los niveles en equilibrio de las isoformas de p63 en presencia o ausencia de ITCH. Mientras que ITCH no afectaba significativamente a los niveles de TAp63α, los niveles de proteína ΔNp63α se reducían notablemente en células que expresan ITCH (figura 12). Para probar que los niveles reducidos se debían a una mayor degradación, analizaron la semivida tanto de TAp63α como de ΔNp63α en células que expresaban ITCH (figura 13). De acuerdo con la disminución observada en los niveles en equilibrio de ΔNp63α por ITCH, la semivida de ΔNp63α se reducía significativamente en presencia de ITCH (figura 13A), mientras que la semivida de TAp63α era afectada solo de forma marginal (figura 13B).

En conclusión, los descubrimientos de los autores de la invención muestran claramente que p63, como p73, es una diana de la ubiquitinación dependiente de ITCH y posterior degradación. Aunque tanto las isoformas TAp63α como ΔNp63α son reguladas por ITCH, principalmente la isoforma ΔNp63α sirve como un sustrato de ITCH. p63 es expresado en el compartimento de citoblastos de muchos epitelios diferentes. Esto sugiere que ITCH podría tener una función fundamental en la regulación diferencial de las isoformas de p63 durante la diferenciación epitelial, implicando, por lo tanto, que podría ser útil en la restricción de la expresión de p63 en el compartimento de citoblastos.

Además, la observación de que Itch se dirige selectivamente a ΔNp63 para la ubiquitinación y degradación es relevante para los cánceres epiteliales. Como se ha discutido antes, la expresión de ΔNp63 está aumentada en los carcinomas de próstata y mama comunes, sugiriendo que su degradación selectiva está comprometida. Por lo tanto, en estas circunstancias, se pueden estar buscando compuestos que activen Itch o induzcan rutas de ubiquitinación selectivas alternativas para ΔNp63.

Datos recientes implicaban que alteraciones en el equilibrio entre las isoformas TAp63 y ΔNp63 en tejidos epiteliales pueden ser de mayor importancia en la carcinogénesis que la mutación génica directa (Park et al., 2000). Las isoformas ΔNp63 pueden realmente conferir una ventaja proliferativa en las células cancerosas contrarrestando las actividades de transactivación de las proteínas p53 y TAp63 y, por lo tanto, su capacidad para inducir la detención del ciclo celular y apoptosis (Crook et al., 2000). Es interesante que ΔNp63 es la isoforma más altamente expresada en los carcinomas de células escamosas, próstata y mama (Nylander et al., 2002). Además, la pérdida de expresión o expresión deteriorada de TAp63, posiblemente causada por la degradación dependiente de proteosoma alterada, se ha asociado con el avance del tumor y pronóstico malo en la mayoría de los cánceres de vejiga invasivos, lo que a la inversa, presenta una regulación por aumento simultánea de ΔNp63 (Urist et al., 2002). Por lo tanto, la regulación por aumento relativa de las isoformas ΔNp63 frente a TAp63 en cánceres, puede contribuir a promover el crecimiento tumoral y la resistencia a la quimioterapia. Es interesante que se ha encontrado la pérdida o reducción de expresión de proteína PML en cánceres humanos de diferentes orígenes histológicos incluyendo tumores epiteliales tales como carcinomas de próstata y mama, en los que se asoció con el grado y avance del tumor (Gurrieri et al., 2004). La capacidad de la PML para aumentar la estabilidad y actividad transcripcional de p63 así como de otros miembros de la familia, proporciona una explicación de cómo la pérdida de proteína PML favorecería el inicio de tumor y refuerza la idea de que p63 puede contribuir a la carcinogénesis.

Ejemplo 3 - Efectos de la regulación por disminución de Itch en líneas de células cancerosas

Materiales y métodos

Cultivo celular y transfecciones

Células H1299 y Saos-2 se cultivaron en medio RPMI (GibcoBRL 31870), y HeLa, MCF7, HEK293, HEK293T, A549, A431, Cos-1, se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (GibcoBRL 61965), U2OS y HCT116 se cultivaron en medio McCoy's 5A (GibcoBRL), SH-SY5Y se cultivaron en F12 al 50%/DMEM al 50% (Gibco 31330). Todos los medios se complementaron con suero bovino fetal al 10% (v/v) (GibcoBRL), y las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% (v/v) de CO₂ en aire. Se llevó a cabo la transfección transitoria con los reactivos lipofectamina 2000 o fosfato de calcio de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen).

Plásmidos

Los vectores pSUPER-ITCH2, pSUPER-ITCH18 y pSUPER-desordenado se generaron por inserción en el vector pSUPER (OligoEngine) de oligonucleótidos que se dirigen a las siguientes secuencias:

10 ITCH 2, AAACATTAAGTCAAACAATATG,

ITCH 18 AAGGAGCAACATCTGGATTAATA,

(Estas secuencias son 100% idénticas tanto en ITCH humano como de ratón);

y un control de ARNsh desordenado.

Transferencia Western

15 Las muestras se separaron por electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) mediante una transferencia semiseca. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en disolución salina tamponada con Tris-Tween 20 al 0,05% durante 1 h. Se llevó a cabo inmunodetección incubando las membranas con diferentes anticuerpos primarios diluidos en tampón de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Después de 20 4 lavados con disolución salina tamponada con Tris-Tween 20 al 0,05%, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 1 h. Después de cuatro lavados, las transferencias se revelaron con el kit de detección ECL Plus (Amersham), y las membranas se expusieron a película de quimioluminiscencia Hyperfilm (Amersham). Se usaron los siguientes anticuerpos: anticuerpos específicos para Itch (611199 BD), dominio SAM de p73 y DN (Sayan et al; 2005), anti-actina (C-11; Santa Cruz), anti-β-tubulina (H-235; Santa Cruz), anti-lámina B (M-20; Santa Cruz).

Efectos del ARNsh contra Itch en respuesta al daño al ADN y efecto en los niveles de p73

Las células se transfectaron con plásmido, 24 h más tarde las células se volvieron a cultivar en placa en placas de 100 mm, después de 24 horas más las células se trataron con agentes quimioterapéuticos y se recogieron muestras a las 0, 24 y 48 h después de tratamiento con fármaco. Se recogieron muestras para el análisis de proteína y FACS.

30 Determinación del ciclo celular

Las células se transfectaron con una relación 5:1 de pSUPER-ITCH-2, pSUPER-ITCH-18 o pSUPER desordenado junto con un plásmido que expresa GFP-espectrina. El ciclo celular se analizó por evaluación por citometría de flujo del ADN teñido con yoduro de propidio. Las células se fijaron en etanol al 70% helado y se almacenaron a -20°C. Las células fijadas se sedimentaron y se volvieron a suspender en 50 µl de ARNse y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadieron 200 µl de yoduro de propidio (50 µg/ml) y las células se incubaron más a temperatura ambiente durante 20 min. El ciclo celular se midió en un citómetro FACScan (BD) usando el programa Cell Quest (BD). Las células se controlaron para la expresión de GFP, para permitir el análisis solo de células transfectadas y se evaluaron veintemil sucesos usando el programa Cell Quest (BD) y el software ModFit LT (Verity Software).

40 Resultados y discusión

Niveles de expresión de Itch en líneas celulares humanas y ARNsh contra ITCH

Para identificar las líneas celulares que expresan Itch, los lisados de un panel inicial de 12 líneas celulares se separaron por SDS-PAGE y se midió la expresión de itch por transferencia Western (figura 14A). Como puede verse en la figura 14A, todas las líneas celulares ensayadas expresaban Itch. Se encontró que Itch también era expresado en fibroblastos embrionarios de ratón primarios (MEF - no se muestran los datos).

Con el fin de evaluar los efectos de la inactivación génica de Itch en la respuesta de células al daño al ADN, los autores de la invención llevaron a cabo un procedimiento de ARNi para silenciar la expresión de Itch. Se ensayaron 10 vectores que expresan ARNsh para la eficacia del silenciamiento. Dos vectores que expresan ARNsh (2 y 18) se seleccionaron como los más eficaces y se usaron para los posteriores estudios. Los efectos de estos vectores de ARNsh en la expresión endógena de Itch se determinaron por transferencia Western en las líneas celulares ensayadas en la figura 14A, y se encontró que la mayor inactivación génica era en Cos1, H1299, HeLa y HEK293T (figura 14B). La inactivación génica en estas líneas celulares podría haber sido mayor debido a la mayor eficacia de transfección en estas líneas celulares con los métodos usados.

Efecto de ARNsh para Itch en el ciclo celular

5 Para investigar los efectos de la inactivación génica de Itch en el ciclo celular, las cuatro líneas celulares diferentes se transfectaron con vectores de ARNsh para Itch y una secuencia desordenada, y 48 horas después de la transfección se recogieron y analizaron muestras con yoduro de propidio usando un citómetro FACScan (figura 15). La distribución de las células en las tres fases del ciclo celular, G1, fase S y G2, se analizaron más usando el software ModFit (Verity Software) (tabla 1). Aunque se observó un aumento pequeño en el porcentaje de células en la fase G2 del ciclo celular en células H1299, el silenciamiento de Itch general tiene poco o no tiene efecto en el ciclo celular de estas cuatro líneas celulares.

Línea celular	ARNsh transfectado	% G1	% S	% G2
Cos1	desordenado	36,6	38,6	24,8
Cos1	ARNsh Itch 2	37,5	36,9	25,6
Cos1	ARNsh Itch 18	37,8	34,6	27,6
H1299	desordenado	50,7	41,1	8,2
H1299	ARNsh Itch 2	45,4	40,1	14,5
H1299	ARNsh Itch 18	48,12	36,1	15,8
HeLa	desordenado	57,6	33,4	8,9
HeLa	ARNsh Itch 2	60,3	30,0	9,7
HeLa	ARNsh Itch 18	57,2	27,5	15,3
HEK293T	desordenado	37,1	57,2	5,7
HEK293T	ARNsh Itch 2	44,2	49,2	6,5
HEK293T	ARNsh Itch 18	45,7	48,8	5,5

10 Tabla 1. Distribución de células en fase G1, G2, S, proporción de células después de transfección de ARN desordenado o transfección de ARNsh para ITCH

Efecto de ARNsh para Itch en los niveles de p73 en líneas celulares.

15 Los niveles de Itch y p73 se evaluaron por transferencia Western en líneas celulares empobrecidas en Itch (figura 16). Como puede verse en la figura 16, en las células Cos1 empobrecidas en Itch los niveles de proteína p73 son mayores frente a los niveles de control, un descubrimiento que está de acuerdo con los descubrimientos publicados previamente por los autores de la invención (Rossi et al.; 2005). En las células H1299 también hay un posible aumento de los niveles de p73 aunque no tan notable como en Cos1.

Efecto del ARNsh para Itch en los niveles de p73 en respuesta al daño al ADN

20 Se ha ensayado el efecto de la regulación por disminución de Itch después de tratamiento con cisplatino, etopósido y doxorubicina (agentes quimioterapéuticos que dañan al ADN). Es de destacar que en las células H1299 la regulación por disminución de Itch se correlaciona con los niveles mayores de p73, sugiriendo, por lo tanto, que la inactivación de Itch puede potenciar los efectos de quimioterapia induciendo los niveles de p73 (figura 17).

Ejemplo 4 - Este ejemplo demuestra un análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para usar en el cribado de inhibidores de Itch

Materiales y métodos

25 GST-Itch y mutante de Itch purificados

30 La proteína Itch marcada con glutatión-S-transferasa (GST) y mutante de Itch inactivado (C830A) se expresaron en bacterias. Células de *E. coli* BL21 CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagene) se transformaron con construcciones naturales o mutantes preparadas en el vector de expresión pGEX-6PI (Amersham Biosciences). Ambas construcciones de fusión con GST están compuestas de Itch de Thr 277 a Glu 903, que carece del dominio C2 N-terminal. Se prepararon cultivos saturados por inoculación de medio LB que contiene ampicilina (LB/amp) con cultivo durante la noche a 37°C. Para la expresión, los cultivos de la noche se diluyeron a 1/100 en LB/amp a 37°C hasta que alcanzaron una DO de 0,40. En este punto, la temperatura se redujo a 15°C y se añadió IPTG (concentración final 50 µM) para inducir la expresión durante 3-4 horas con agitación a 250 rpm. Se prepararon los lisados celulares

y las proteínas de fusión de GST se purificaron en perlas de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) usando procedimientos convencionales.

E1 y E2

5 La enzima activadora de ubiquitina E1 se expresó en el sistema de baculovirus y se purificó por cromatografía de Ni-NTA (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La construcción bacteriana pET23aUbch7 que dirige la síntesis de la enzima E2 de conjugación de la ubiquitina Ubch7 fue un regalo del Dr PM Howley (Kumar S, Kao WH, Howley PM. (1997). Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem.* 272:13548-54). Después de la expresión en células de *E.coli* BL21 CodonPlus® (DE3)-RIL (Stratagene), se obtuvo E2 purificada por cromatografía de afinidad de Ni-NTA (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ubiquitina marcada con FLAG

La ubiquitina recombinante purificada que contiene una secuencia FLAG amino-terminal (DYKDDDDK) se adquirió en Sigma Aldrich (Nº de cat. U5382).

Conjugado de anticuerpo anti-FLAG M2 con peroxidasa

15 El anticuerpo anti-FLAG M2 conjugado con hidrógeno peroxidasa se adquirió en Sigma Aldrich (Nº de cat. A8592).

Sustrato TMB de ELISA

El sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), se preparó haciendo una solución madre de TMB al 1% en p/v (Sigma Aldrich T-2885) en DMSO y diluyendo a 1/10 en tampón de acetato sódico 0,1 M a pH 4,5 que contenía peróxido de hidrógeno al 0,01% en v/v justo antes de usar.

20 Ensayo de cribado de alta capacidad para inhibidores de Itch

El ensayo se llevó a cabo usando procedimientos de manipulación de líquidos automáticos con el fin de hacer el ensayo frente a la biblioteca de compuestos LOPAC¹²⁸⁰™ (Sigma Aldrich), que consiste en 1280 compuestos farmacológicamente activos.

25 Itch marcado con GST (350 ng/ml en disolución salina tamponada con fosfato que contiene Tween 20 al 0,1% (PBST), 20 µl por pocillo) se unió a placas de ELISA de 384 pocillos con el fondo transparente, revestidas de glutatión (Pierce, lote por encargo) a 22°C durante 1 hora. Los pocillos de control negativo asignados a las columnas 23 y 24 se revistieron con una cantidad equivalente del mutante de Itch (C830A). Durante esta incubación, se precargó E2 (Ubch7) con ubiquitina en una mezcla en masa concentrada 2x que consiste en E1 468 ng/ml, E2 51 µg/ml y FLAG-ubiquitina 2 µM en 1x tampón de ubiquitinación (TRIS 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 4 mM, trifosfato de adenosina 1,25 mM (ATP), ditiotreitól 50 µM (DTT)) durante 45 min a 22°C. Usando este procedimiento, E2 se precargó con FLAG-ubiquitina antes de mezclar con los compuestos de ensayo. Al final de la incubación, las placas se lavaron con 3x PBST.

35 Los compuestos de la biblioteca LOPAC¹²⁸⁰™ se diluyeron previamente a partir de las placas madre 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) en tampón de ubiquitinación para dar una concentración final 10 µM en el ensayo. Después de la adición de 10 µl del compuesto diluido (o dilución equivalente de DMSO a los pocillos de control), se añadieron 10 µl de la mezcla de precarga 2x a todos los pocillos y se mezclaron para iniciar la reacción. Después, las placas se sellaron y se dejó que la reacción de ubiquitinación se desarrollara durante 2 h a 22°C. Para parar las reacciones y separar los componentes de ensayo no unidos, las placas se lavaron con PBST 3x antes de la adición de 20 µl/pocillo de conjugado de anti-FLAG M2 con peroxidasa diluido a 1/10.000 en PBST. Después de incubación adicional de 1 h a 22°C, las placas se lavaron 5x y se añadieron 20 µl de solución de sustrato TMB a todos los pocillos. Se dejó que procediera el desarrollo del sustrato durante 15 min a 22°C antes de detener las reacciones con 5 µl por pocillo de HCl 1 M. La densidad óptica a 450 nm (DO₄₅₀) se determinó usando un lector de placa automático Tecan Safire II. La señal de DO₄₅₀ es proporcional a la cantidad de FLAG-ubiquitina ligada a la proteína GST-Itch inmovilizada.

45 Resultados y discusión

Para demostrar que el ensayo ELISA es específico para Itch ubiquitinado y depende de la presencia de todos los componentes de la reacción de ubiquitinación, el ensayo se llevó a cabo con controles adicionales (figura 18). En presencia de E1, E2, FLAG-Ub y Itch natural inmovilizada, se obtuvo una señal en el ensayo de DO₄₅₀ de 1,972. En las mismas condiciones pero con sustitución de Itch natural por Itch mutante (C830A), se obtuvo una señal base de 0,093, indicando una relación de señal:señal base de 21:1 para este ensayo. Los controles adicionales mostraron que la señal dependía de la presencia de Itch natural junto con E1, E2 y FLAG-Ub. La omisión de cualquiera de estos componentes producía señales de ELISA base.

Con el fin de ensayar el rendimiento de un ensayo de cribado de alta capacidad para inhibidores de Itch, se llevó a cabo un cribado de 1280 moléculas pequeñas de tipo fármaco usando un ensayo ELISA automático. Como una

5 indicación del rendimiento y consistencia del ensayo, los autores de la invención aplicaron los estadísticos Z y Z' que son citados ampliamente para datos de cribado de alta capacidad por la industria (Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* 4:67-73). Para este cribado obtuvieron valores medios de 0,76 (intervalo de 0,71 a 0,83) y 0,73 (intervalo de 0,71 a 0,75) para Z' y para Z respectivamente. Los valores de Z' y Z superiores a 0,5 son indicativos de un ensayo excelente capaz de identificar valores atípicos ("éxitos") para posterior la investigación y optimización.

10 Los datos obtenidos a lo largo de todo el experimento de cribado se muestran en la figura 19. Los valores de actividad en porcentaje se calcularon usando la fórmula $(DO_{450} \text{ de ensayo} - DO_{450} \text{ media de controles negativos}) / (DO_{450} \text{ media de controles positivos} - DO_{450} \text{ media de controles negativos}) \times 100$. Los pocillos que registran una actividad de 70% o menor ($\geq 30\%$ de inhibición) se identificaron como éxitos. En este cribado de 1280 compuestos, se obtuvieron 3 éxitos correspondientes a una tasa total de 0,23%. Por lo tanto, un cribado de una biblioteca de compuestos mayor de diversidad química comparable, se esperaría que generara un número suficiente de éxitos para iniciar un estudio de la relación de estructura y actividad (SAR). La identificación de una SAR es importante para el inicio de un programa de química médica en el comienzo del proceso de descubrir un fármaco. En este cribado, los compuestos se ensayan con una concentración fija de 10 μM , sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que esta concentración se puede aumentar con el fin de identificar compuestos menos potentes o se puede reducir con el fin de identificar solo los éxitos con la mayor actividad inhibidora.

15

Referencias

- Agami, R., Blandino, G., Oren, M. y Shaul, Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*, **399**, 809-813.
- Balint, E., Bates, S., y Vousden, K.H. (1999) Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene*, **18**, 3923-3929.
- Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu YC. Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Mol Cell*. 2004 Sep 10;15(5):825-31.
- Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH y Pandolfi PP. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*. 6, 665-672, 2004
- Bernassola, F., Salomoni, P., Oberst, A., Di Como, C.J., Pagano, M., Melino, G. y Pandolfi, P.P. (2004) Ubiquitin-dependent Degradation of p73 Is Inhibited by PML. *J Exp Med*, **199**, 1545-1557.
- Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P., y Romani, M. (2002) Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ*, **9**, 246-251.
- Castagnoli, L., Zucconi, A., Quondam, M., Rossi, M., Vaccaro, P., Panni, S., Paoluzi, S., Santonico, E., Dente, L., y Cesareni, G. (2001) Alternative bacteriophage display systems. *Comb Chem High Throughput Screen*, **4**, 121-133.
- Catani, M.V., Costanzo, A., Savini, I., Levrero, M., de Laurenzi, V., Wang, J.Y., Melino, G., y Avigliano, L. (2002) Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem J*, **364**, 441-447.
- Cesareni, G., Castagnoli, L., y Cestra, G. (1999) Phage displayed peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen*, **2**, 1-17.
- Chen X, Zheng Y, Zhu J, Jiang J, y Wang J. p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53 and p73. *Oncogene*. 2001 Dec 5;20,769-774.

- Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O'Nions J y Allday MJ. High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene*, **19**, 3439-3444, 2000.
- De Laurenzi, V., Catani, M.V., Terrinoni, A., Corazzari, M., Melino, G., Costanzo, A., Levrero, M. y Knight, R.A. (1999) Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ*, **6**, 389-390.
- De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M. y Melino, G. (1998) Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J. Exp. Med*, **188**, 1763-1768.
- De Laurenzi, V., Raschella', G., Barcaroli, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Ranalli, M., Catani, M.V., Tanno, B., Costanzo ,A., Levrero, M., y Melino G. (2000) Induction of neuronal differentiation by p73, in a neuroblastoma cell line. *Journal Biological Chemistry*, **275**, 15226-15231.
- Dobbelstein, M., Wienzek, S., Konig, C., y Roth, J. (1999) Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene*, **18**, 2101-2106.
- Fang, D., Elly, C., Gao, B., Fang, N., Altman, Y., Joazeiro, C., Hunter, T., Copeland, N., Jenkins, N., y Liu, Y.C. (2002) Dysregulation of T lymphocyte function in Itchy mice: a role for Itch in TH2 differentiation. *Nat Immunol*, **3**, 281-287.
- Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D, Yang A, McKeon F, Jacks T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*. 2005 Apr;**7**(4):363-73.
- Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M. Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science*. 2004 Oct **8**;306(5694):271-5.
- Gong, J.C., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, Jr. W.G., Levrero, M. y Wang, J.Y. (1999) The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatininduced DNA damage. *Nature*, **399**, 806-809.
- Gottifredi, V., Pelicci, G., Munarriz, E., Maione, R., Pelicci, P.G., y Amati, P. (1999) Polyomavirus large T antigen induces alterations in cytoplasmic signalling pathways involving Shc activation. *J Virol*, **73**, 1427-1437.

- Grob, T.J., Novak, U., Maise, C., Barcaroli, D., Luthi, A.U., Pirnia, F., Hugli, B., Graber, H.U., De Laurenzi, V., Fey, M.F., Melino, G., y Tobler, A. (2001) Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*, **8**, 1213-1223.
- Hamilton, M.H., Tcherepanova, I., Huibregtse, J.M., y McDonnell, D.P. (2001) Nuclear import/export of hRPF1/Nedd4 regulates the ubiquitin-dependent degradation of its nuclear substrates. *J Biol Chem*, **276**, 26324-26331.
- Harvey, K.F., y Kumar, S. (1999) Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitinprotein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends Cell Biol*, **9**, 166-169.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Ikawa, S., Nakagawara, A., y Ikawa Y. (1999) p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ*, **6**, 1154-1161.
- Irwin, M.S., Kondo, K., Marin, M.C., Cheng, L.S., Hahn, W.C. y Kaelin, W.G., Jr. (2003) Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, **3**, 403-410.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. y Caput, D. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, **90**, 809-819.
- Kloetzel, P.M. (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 179- 187.
- Kumar, S., Kao, W.H., y Howley, P.M. (1997) Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem*, **272**, 13548-13554.
- Lohrum, M.A., y Vousden, K.H. (1999) Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Death Differ*, **6**, 1162-1168.
- Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li Fraumeni syndrome. *Cell*, **119**, 861-72.
- Maise, C., Munarriz, E., Barcaroli, D., Melino, G. y De Laurenzi, V. (2004) DNA damage induces the rapid and selective degradation of the DeltaNp73 isoform, allowing apoptosis to occur. *Cell Death Differ*, **11**, 685-687.

- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C. y Vousden, K.H. (2004) p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*, **279**, 8076-8083.
- Melino, G., De Laurenzi, V., y Vousden, K.H. (2002) p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **2**, 605-615.
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T. y Knight, R.A. (2003) Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci*, **28**, 663-670.
- Miyazaki, K., Ozaki, T., Kato, C., Hanamoto, T., Fujita, T., Irino, S., Watanabe, K., Nakagawa, T. y Nakagawara, A. (2003) A novel HECT-type E3 ubiquitin ligase, NEDL2, stabilizes p73 and enhances its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 106-113.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. y Bradley, A. (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398**, 708-713.
- Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M., y Vousden, K.H. (2000) A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene*, **19**, 4283-4289.
- Ongkeko, W.M., Wang, X.Q., Siu, W.Y., Lau, A.W., Yamashita, K., Harris, A.L., Cox, L.S., Poon, R.Y. (1999) MDM2 and MDMX bind and stabilize the p53-related protein p73. *Curr Biol*, **9**, 829-832.
- Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, Sjostrom B, Dahlqvist A y Coates PJ. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol*, **198**, 417-427, 2002.
- Park, B.J., Lee, S.J., Kim, J.I., Lee, C.H., Chang, S.G., Park, J.H. y Chi, S.G. (2000) Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res*, **60**, 3370-3374.
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T. (2004) Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li Fraumeni syndrome. *Cell*, **119**, 847-60.
- Perry, W.L., Hustad, C.M., Swing, D.A., O'Sullivan, T.N., Jenkins, N.A., y Copeland, N.G. (1998) The Itchy locus encodes a novel ubiquitin protein ligase that is disrupted in a18H mice. *Nat Genet*, **18**, 143-146.

- Putzer, B.M., Tuve, S., Tannapfel, y Stiewe, T. (2003) Increased DeltaN-p73 expression in tumors by upregulation of the E2F1-regulated, TA-promoter-derived DeltaN'-p73 transcript. *Cell Death Differ*, **10**, 612-614.
- Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H.Y., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T., y Liu, Y.C. (2000) Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **275**, 35734-35737.
- Romani, M., Tonini, G.P., Banelli, B., Allemanni, G., Mazzocco, K., Scaruffi, P., Boni, L., Ponzoni, M., Pagnan, G., Raffaghello, L., Ferrini, S., Croce, M., y Casciano, I. (2003) Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma. *Cancer Lett*, **197**, 111-117.
- Rossi M, De Laurenzi V, Munarriz E, Green DR, Liu YC, Vousden KH, Cesareni G, Melino G. The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability. *EMBO J*. 2005 Feb 23;24(4):836-48.
- Sayan, A.E., Rossi, M., Melino, G. y Knight, R.A. (2004) p73: in silico evidence for a putative third promoter region. *Biochem Biophys Res Commun*, **313**, 765-770.
- Stiewe, T., y Putzer, B.M. (2002) Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ*, **9**, 237-245.
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., y Blandino, G. (2001) Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J Biol Chem*, **276**, 15164-15173.
- Sudol, M. (1996) Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol*, **65**, 113-132.
- Toh, W.H., Siddique, M.M., Boominathan, L., Lin, K.W. y Sabapathy, K. (2004) c-Jun regulates the stability and activity of the p53 homologue, p73. *J Biol Chem*.
- Treier, M., Staszewski, L.M., y Bohmann, D. (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell*, **78**, 787-798.
- Tschan, M.P., Grob, T.J., Peters, U.R., De Laurenzi V., Huegli, B., Kreuzer, K.A., Schmidt, C.A., Melino, G., Fey, M.F., Tobler, A. y Cajot, J-F. (2000) Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **277**, 62-65.
- Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Chiba, T. y Shimotohno, K. (1999) New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene*, **18**, 4993-4998.

- Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, Ince TA, McKeon FD y Cordon-Cardo C. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol*, **161**, 1199-1206, 2002.
- Vossio, S., Palescandolo, E., Pediconi, N., Moretti, F., Balsano, C., Levrero, M., y Costanzo, A. (2002) DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. *Oncogene*, **21**, 3796-3803.
- Weissman, A.M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 169-178.
- Winberg, G., Matskova, L., Chen, F., Plant, P., Rotin, D., Gish, G., Ingham, R., Ernberg, I., y Pawson, T. (2000) Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, **20**, 8526-8535.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., y Caput, D. (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, **404**, 99-103.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. y McKeon, F. (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, **398**, 714-718.
- Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y.Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. y Kufe, D. (1999) p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*, **399**, 814-817.
- Zaika, A.I., Slade, N., Erster, S.H., Sansome, C., Joseph, T.W., Pearl, M., Chalas, E., y Moll, U.M. (2002) DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*, **196**, 765-780.
- Zeng, X., Chen, L., Jost, C.A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W.G.Jr, Oren, M., Chen, J., y Lu, H. (1999) MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol*, **19**, 3257-3266.
- Zucconi, A., Dente, L., Santonico, E., Castagnoli, L., y Cesareni, G. (2001) Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage lambda reveals new potential partners of synaptojanin 1. *J Mol Biol*, **307**, 1329-1339.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método in vitro de modulación de la apoptosis en una célula, que comprende la etapa de disminuir o alterar de otra forma la actividad funcional del polipéptido de ligasa de ubiquitina E3 Itch o el ácido nucleico que lo codifica, usando ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch.
- 5 2.- Un método in vitro según la reivindicación 1, en donde la actividad funcional alterada de la ligasa de ubiquitina E3 Itch es la inhibición de la ligasa de ubiquitina E3 Itch.
- 3.- Un método in vitro para sensibilizar células frente a agentes que dañan al ADN mediante la inhibición de la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, usando ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch.
- 10 4.- Un método in vitro para modular la estabilidad de p63 o p73 en una célula, que comprende modular la actividad o expresión de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, usando ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch.
- 5.- Un método in vitro de aumento de la sensibilidad de una célula tumoral frente a un agente quimioterapéutico, que comprende reducir la actividad, niveles de expresión o función de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, usando ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch.
- 15 6.- Un método para identificar un agente que modula la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, que comprende:
incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula de ligasa de ubiquitina E3 Itch en presencia de un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro,
determinar la cantidad de ubiquitina ligada a la ligasa de ubiquitina E3 Itch en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y
20 seleccionar aquellos agentes que modulan la cantidad de ubiquitina ligada a la ligasa de ubiquitina E3 Itch comparado con la cantidad de ubiquitina ligada a la ligasa de ubiquitina E3 Itch en ausencia del agente o agentes que se van a ensayar,
comprendiendo además dicho método identificar aquellos agentes que modulan los niveles o actividad de p63 o p73.
- 25 7.- Un método para identificar un agente que modula la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, que comprende:
incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula de ligasa de ubiquitina E3 Itch en presencia de un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro,
determinar la cantidad de ubiquitina ligada a la ligasa de ubiquitina E3 Itch en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y
30 seleccionar aquellos agentes que modulan la cantidad de ubiquitina ligada a la ligasa de ubiquitina E3 Itch comparado con la cantidad de ubiquitina ligada a la ligasa de ubiquitina E3 Itch en ausencia del agente o agentes que se van a ensayar,
comprendiendo además dicho método identificar aquellos agentes que influyen en la unión de la ligasa de ubiquitina E3 Itch a p63 o p73.
- 8.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde el método es un ensayo ELISA.
- 35 9.- Un método para identificar un agente que modula la actividad de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, que comprende:
incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula de ligasa de ubiquitina E3 Itch y una molécula Δ Np63, TAp73 o Δ Np73 en presencia de un sistema de ubiquitinación reconstituido in vitro,
determinar la presencia de formas ubiquitinadas de Δ Np63, TAp73 o Δ Np73 en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y
40 seleccionar aquellos agentes que modulan la cantidad de formas ubiquitinadas de Δ Np63, TAp73 o Δ Np73 comparado con la cantidad de dichas formas ubiquitinadas obtenidas en ausencia del agente o agentes que se van a ensayar.
- 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el sistema de ubiquitinación comprende E1 y E2 en presencia de ATP.
- 45 11.- Un método in vitro para identificar uno o más agentes capaces de modular la estabilidad de p63 o p73, que comprende las etapas de:
(a) incubar una molécula de ligasa de ubiquitina E3 Itch con el agente o agentes que se van a evaluar; y
(b) identificar estos agentes que influyen en la unión de la ligasa de ubiquitina E3 Itch a p63 o p73.

- 5 12.- Un método para identificar un agente candidato para un producto farmacéutico útil en el tratamiento de una enfermedad, que comprende: incubar un agente o agentes que se van a ensayar con una molécula de ligasa de ubiquitina E3 Itch y una molécula Δ Np63, TAp73 o Δ Np73, en condiciones en las que, salvo por la presencia del agente o agentes que se van a ensayar, la ligasa de ubiquitina E3 Itch y Δ Np63, TAp73 o Δ Np73, forman un complejo con una afinidad de unión de referencia;
- determinar la afinidad de unión del complejo de la ligasa de ubiquitina E3 Itch y Δ Np63, TAp73 o Δ Np73 en presencia del agente o agentes que se van a ensayar; y
- seleccionar aquellos agentes que modulan la afinidad de unión del complejo con respecto a la afinidad de unión de referencia.
- 10 13.- Uso de ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por administración simultánea o secuencial con un agente que daña el ADN.
- 14.- ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch para usar en el tratamiento del cáncer.
- 15.- Una combinación que comprende ARNsi o ARNsh para la ligasa de ubiquitina E3 Itch y un agente que daña el ADN, para usar en el tratamiento del cáncer.
- 15 16.- Uso según la reivindicación 13, ARNsi según la reivindicación 14, o una combinación según la reivindicación 15, en donde dicho ARNsi comprende la secuencia AAGTGCTTCTCAGAATGATGA.
- 17.- Uso según la reivindicación 13, ARNsi según la reivindicación 14, o una combinación según la reivindicación 15, en donde dicho ARNsi comprende la secuencia AACCAACACACGAATTACA.
- 20 18.- Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo anti-ligasa de ubiquitina E3 Itch para usar en el diagnóstico de tumores, midiendo la expresión de la ligasa de ubiquitina E3 Itch.
- 19.- Un kit de diagnóstico que comprende cebador(es) para la detección de ARNm de la ligasa de ubiquitina E3 Itch, para usar en el diagnóstico de tumores, midiendo la expresión de la ligasa de ubiquitina E3 Itch.

Figura 1

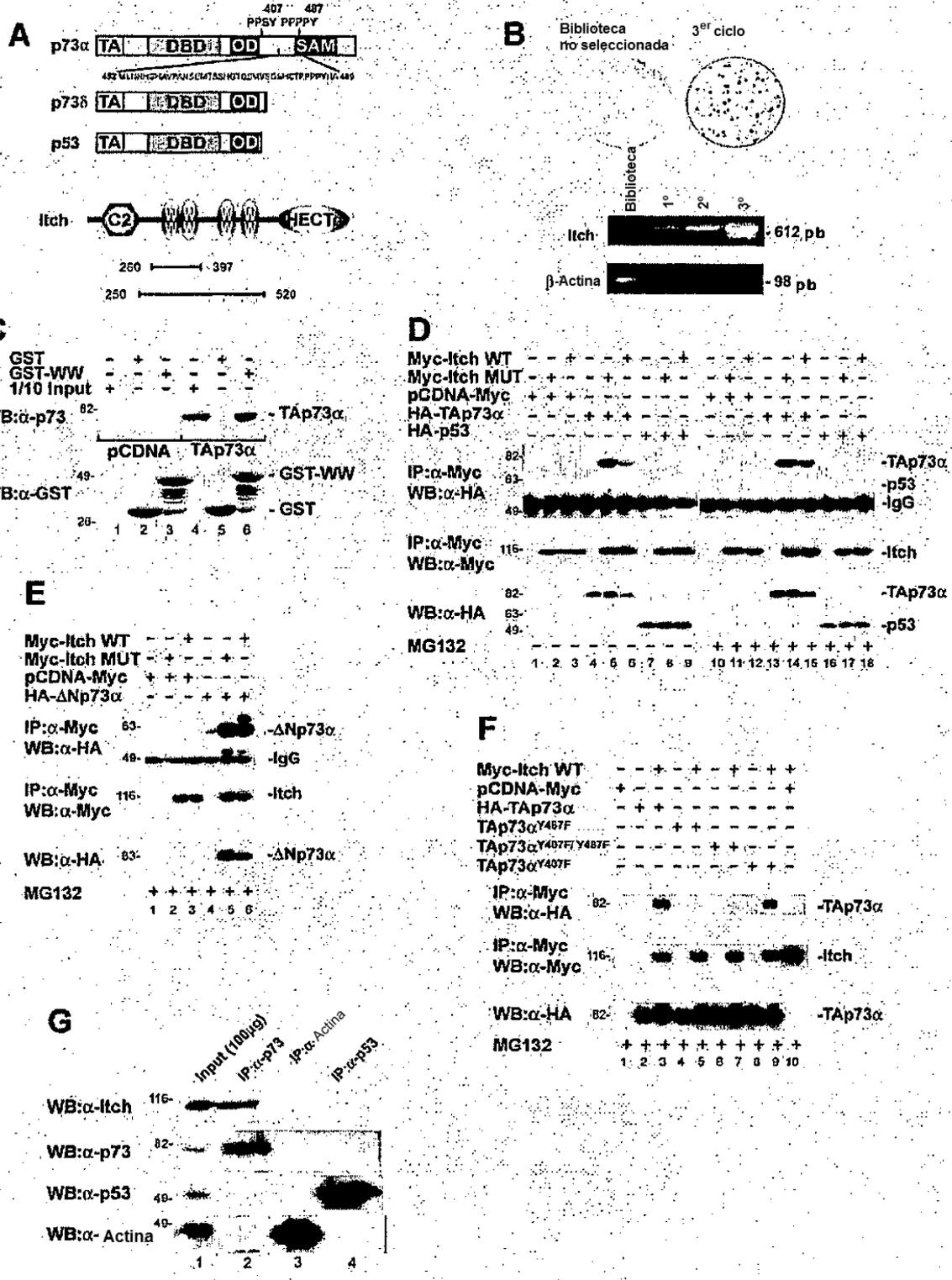


Figura 2

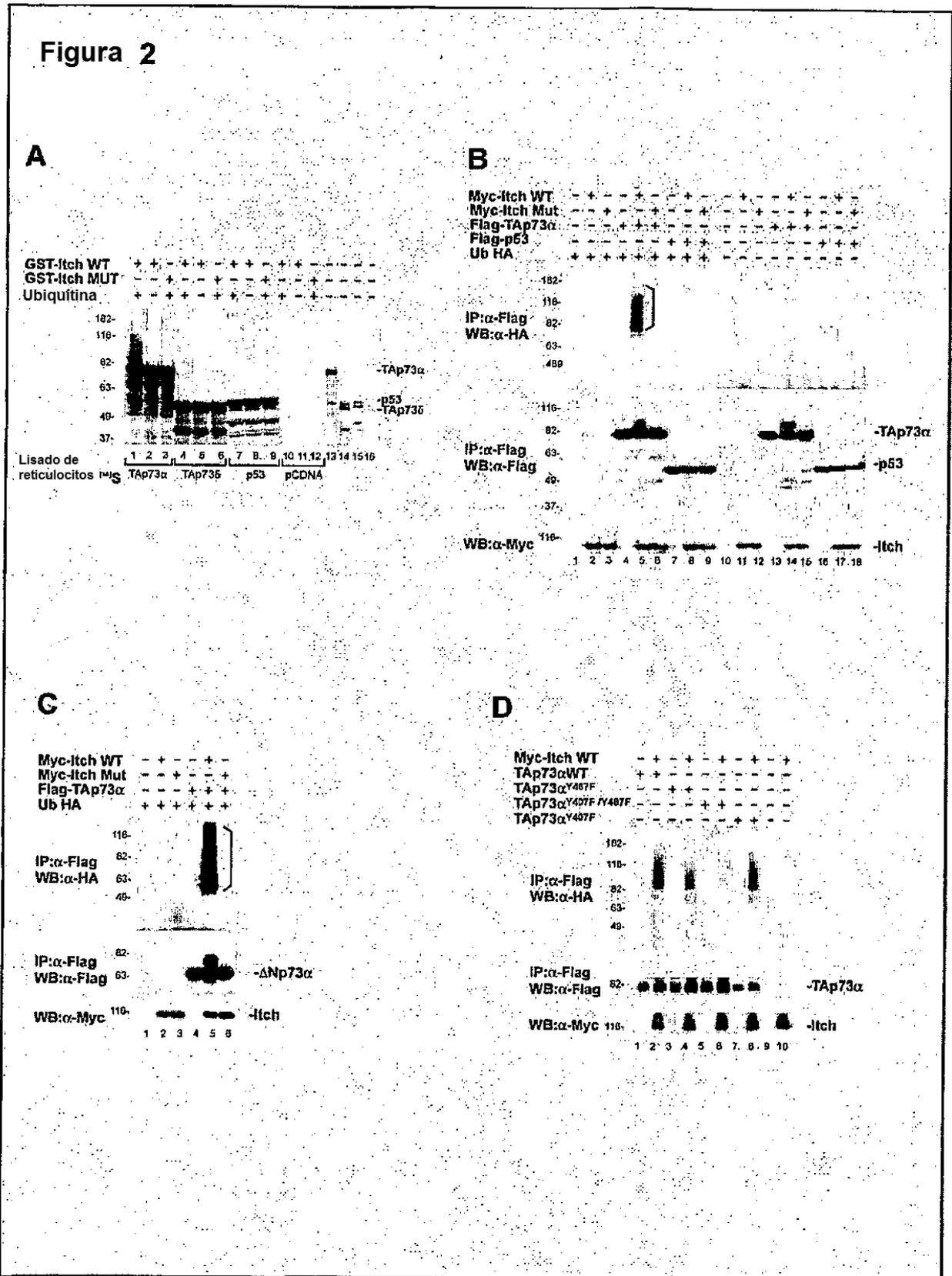
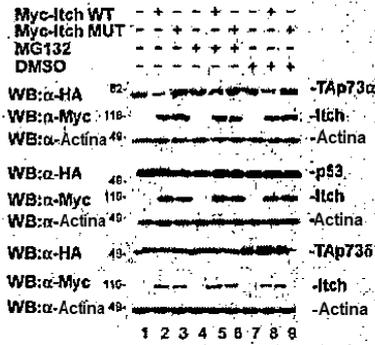
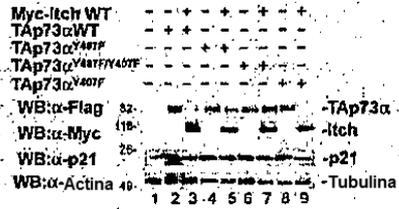


Figura 3

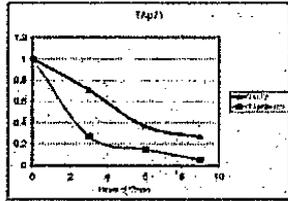
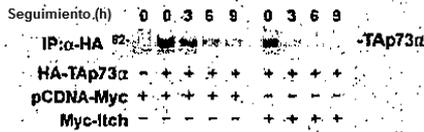
A



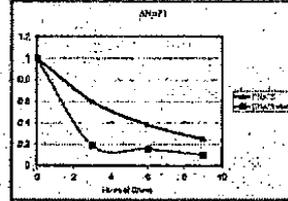
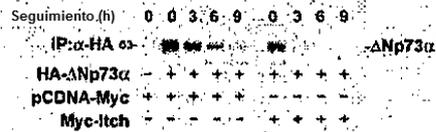
B



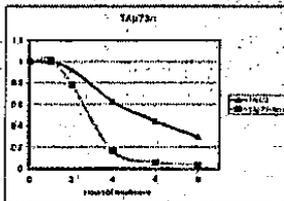
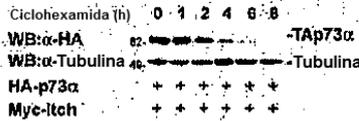
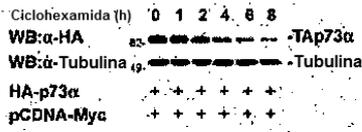
C



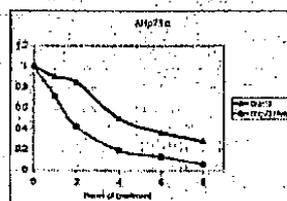
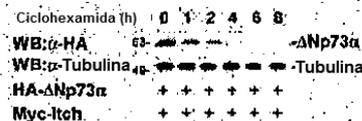
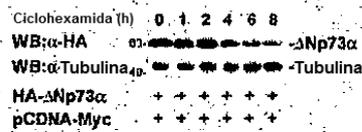
D



E



F



G

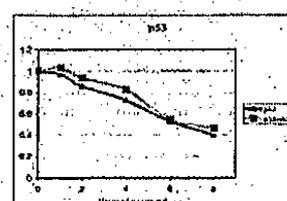
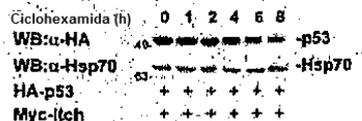
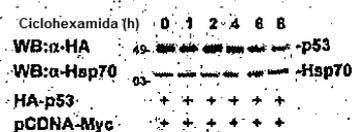


Figura 4

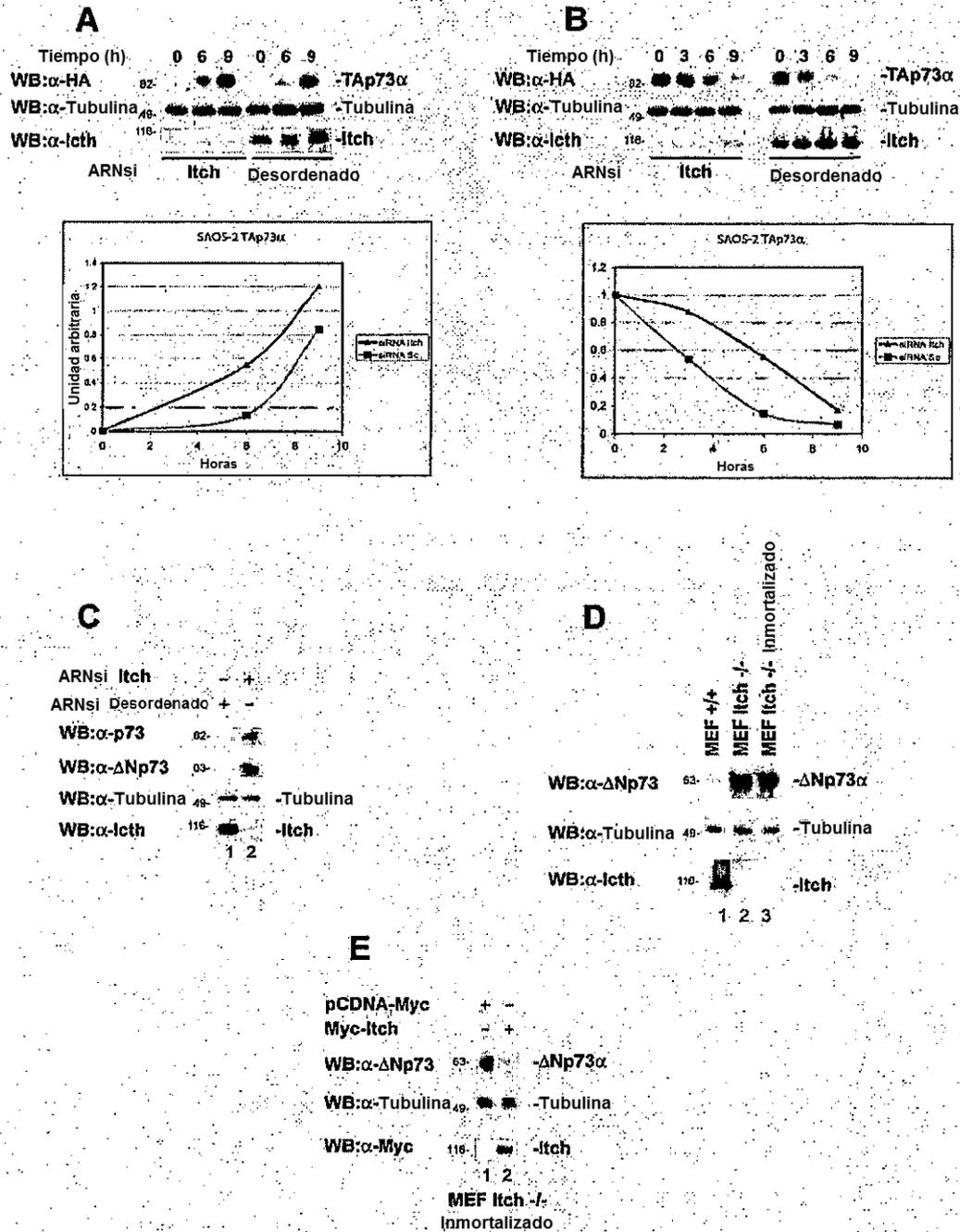
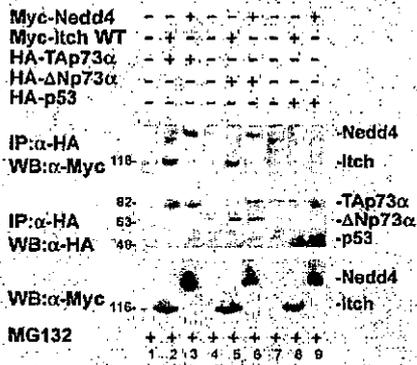
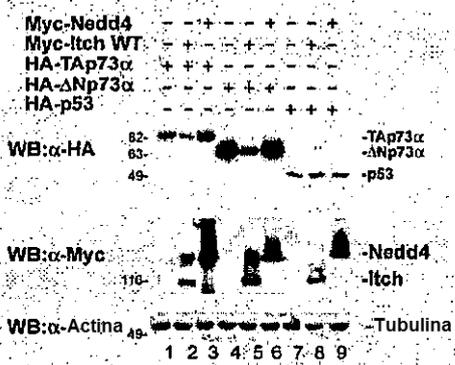


Figura 5

A



B



C

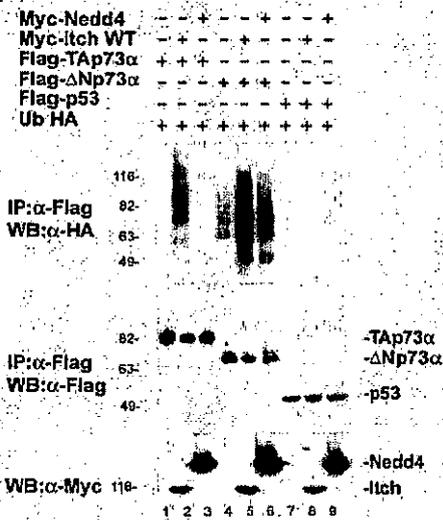


Figura 6

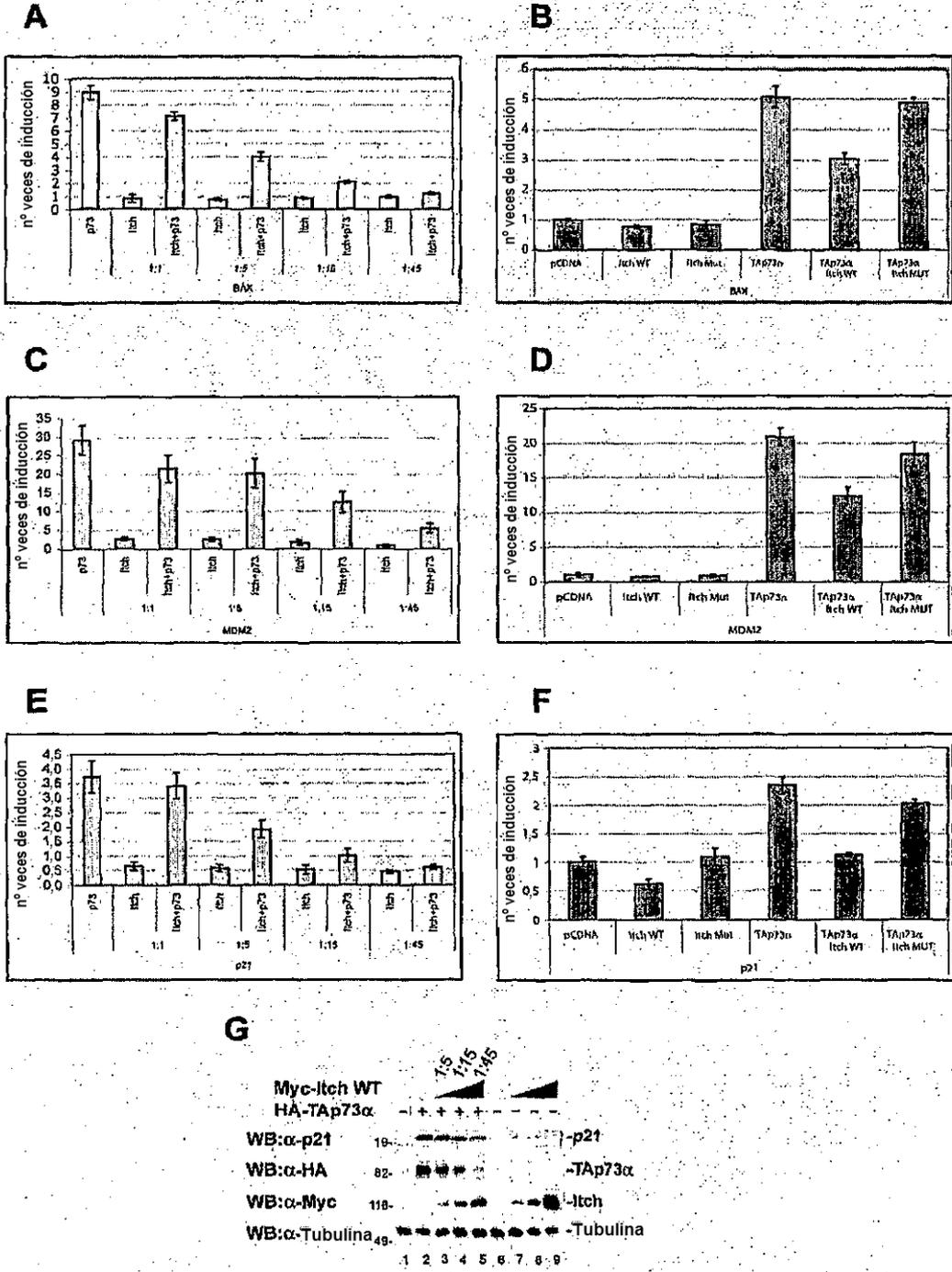
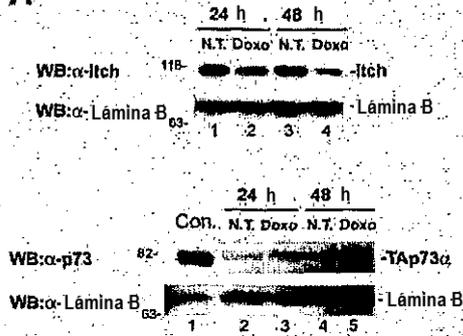
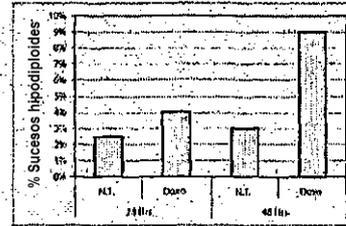


Figura 7

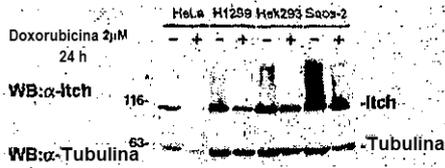
A



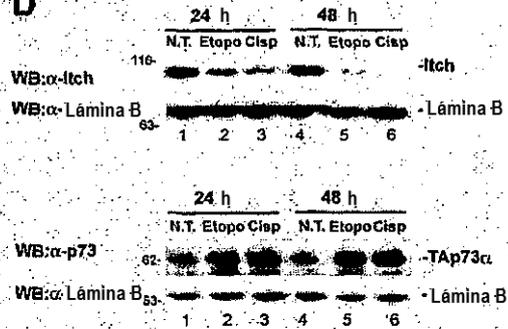
B



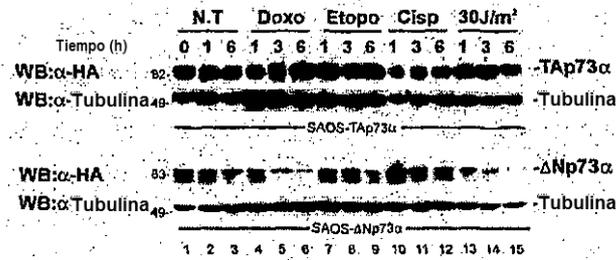
C



D



E



F

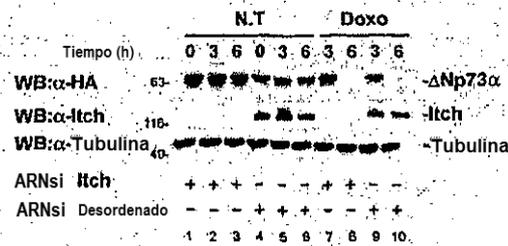
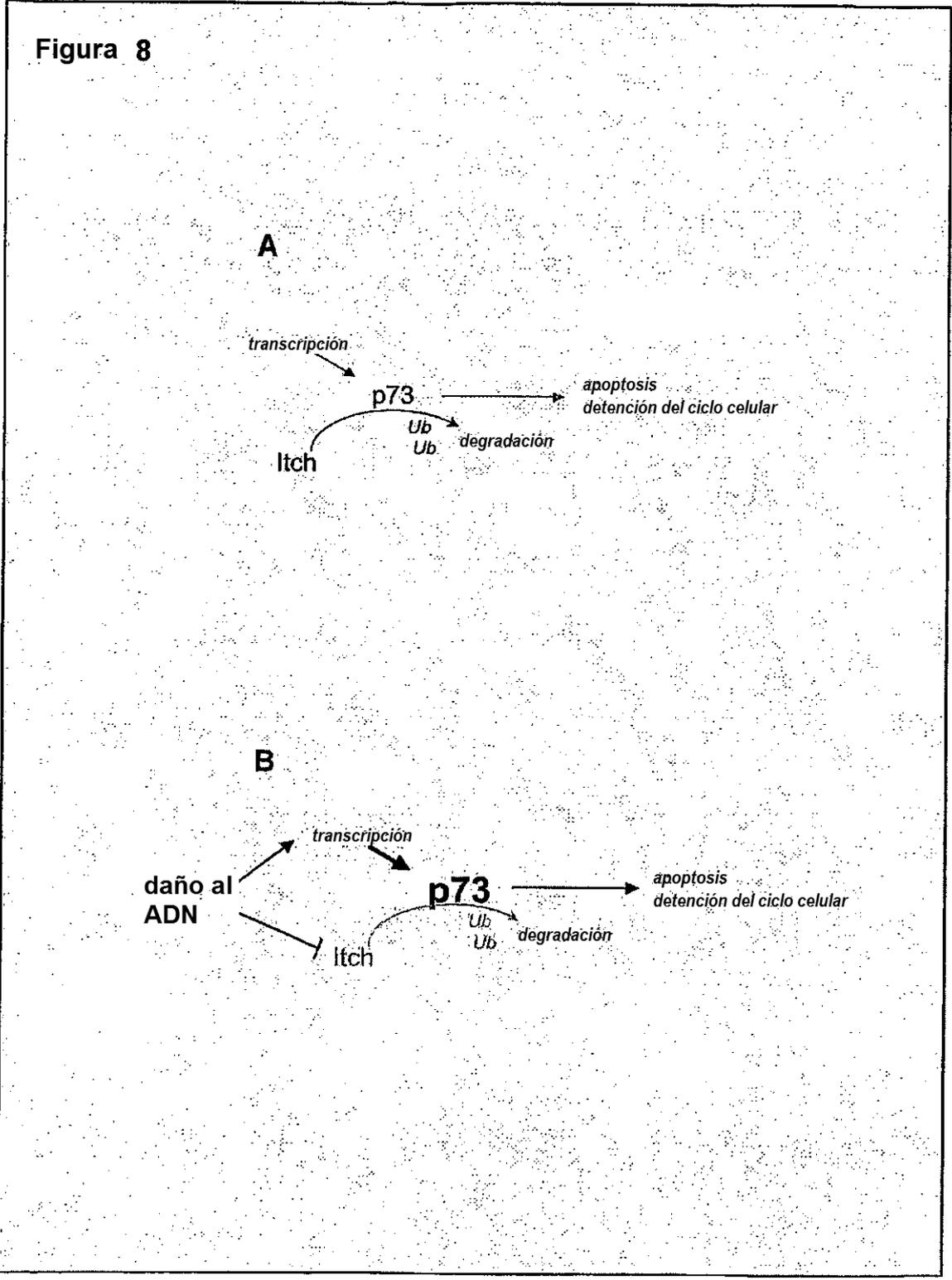


Figura 8



La regulación por disminución de Itch sensibiliza las células SAOS-2 frente a la doxorubicina

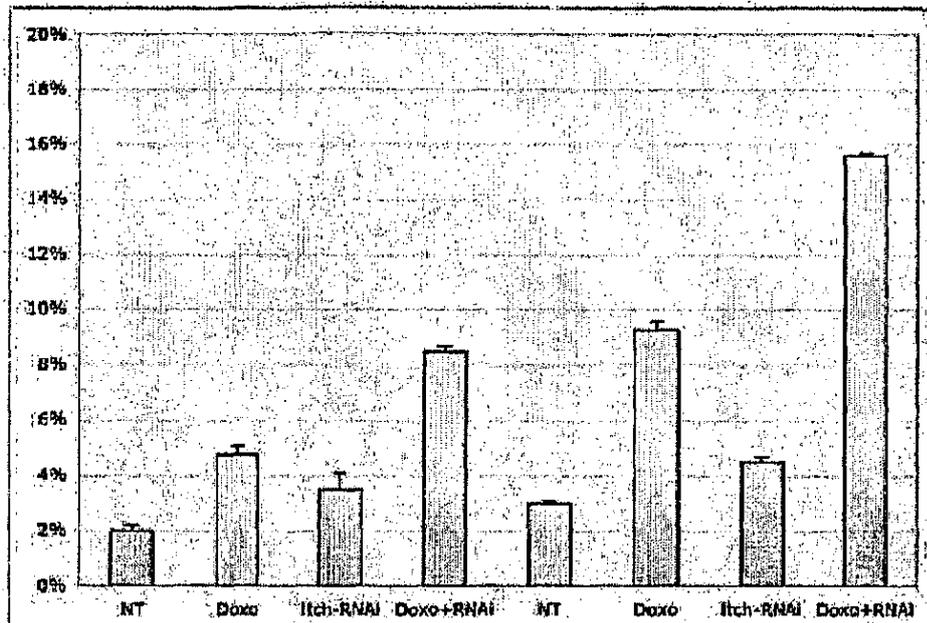


Figura 9

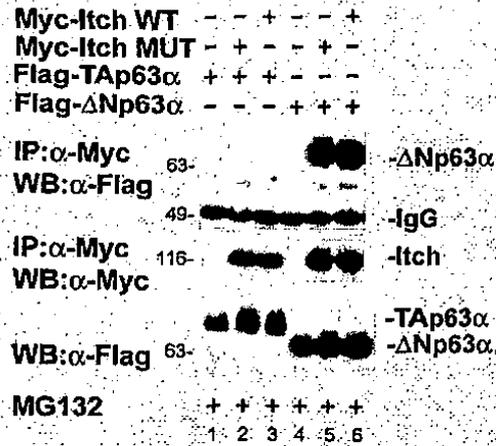


FIGURA 10

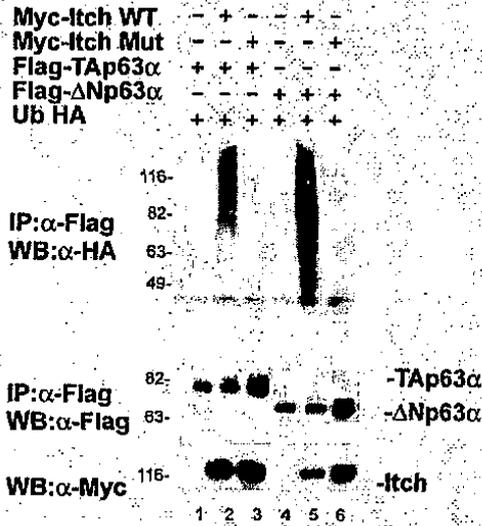


FIGURA 11

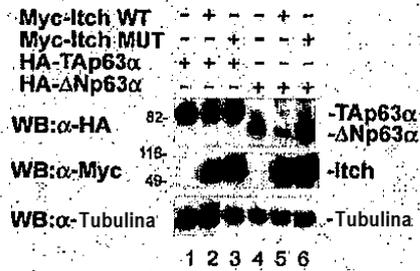


FIGURA 12

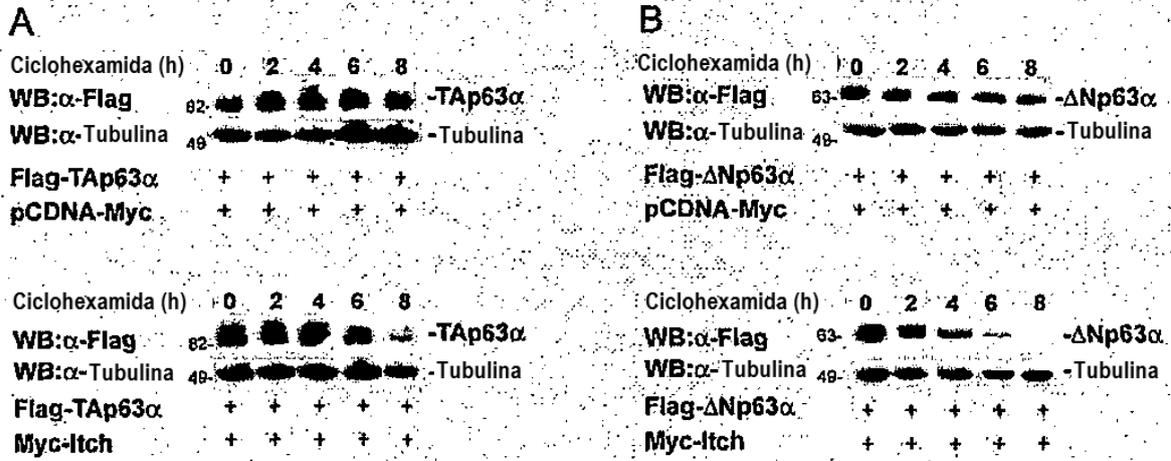


FIGURA 13

Figura 14

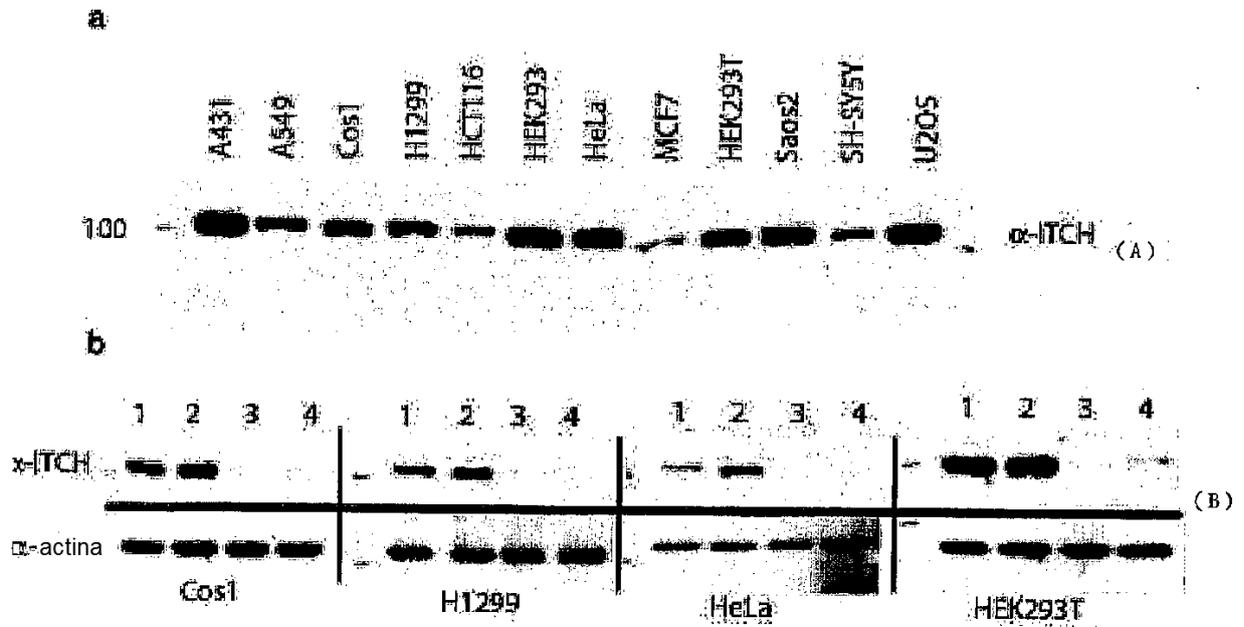


Figura 15

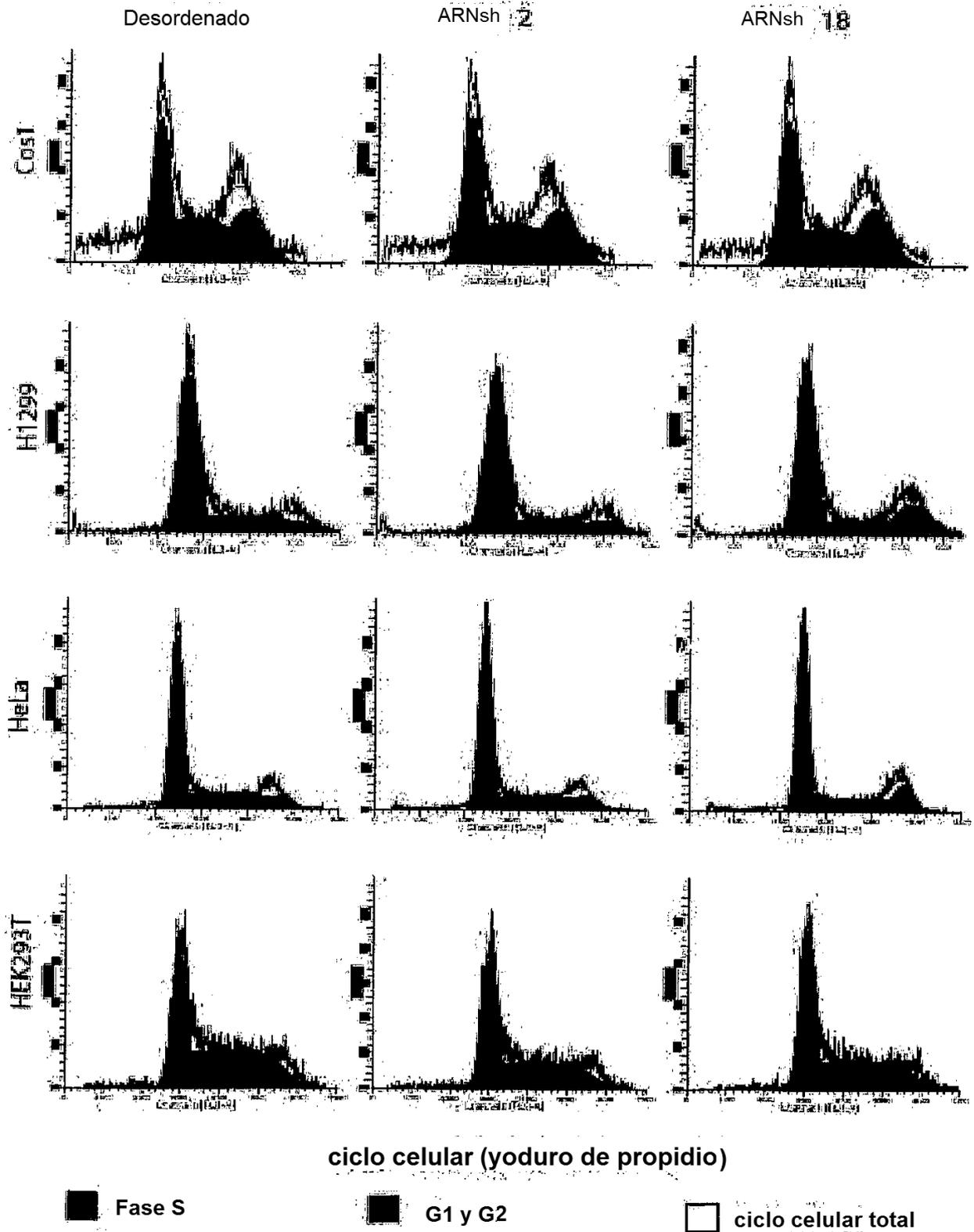
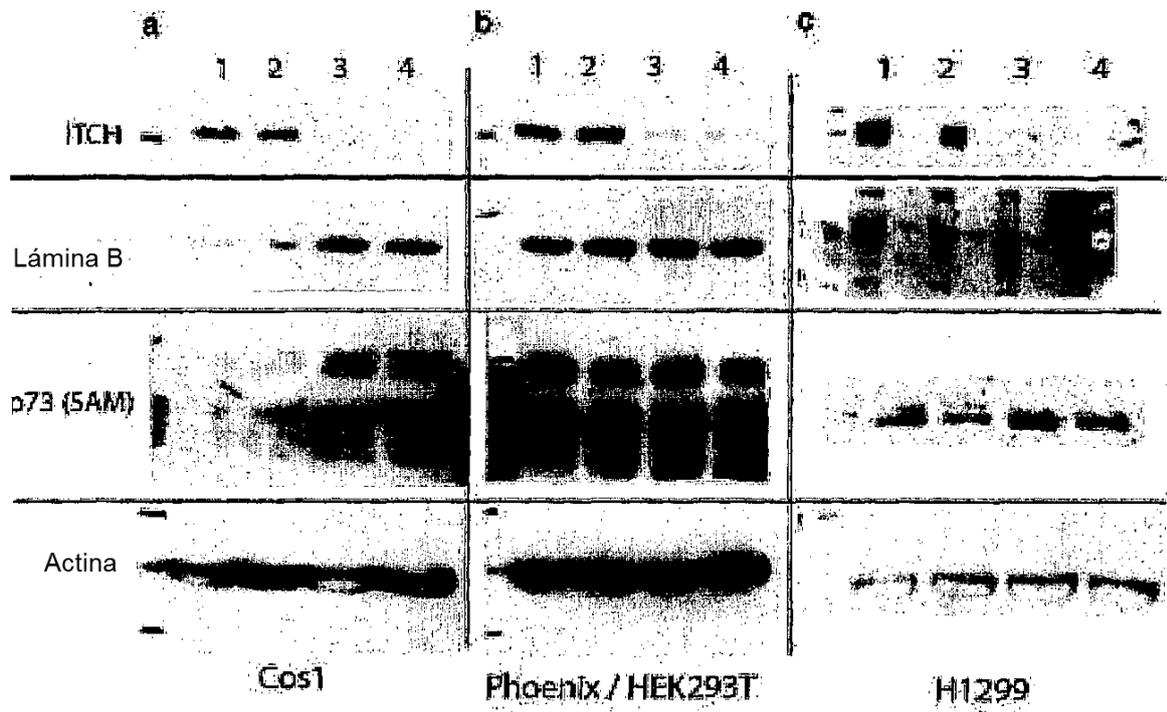
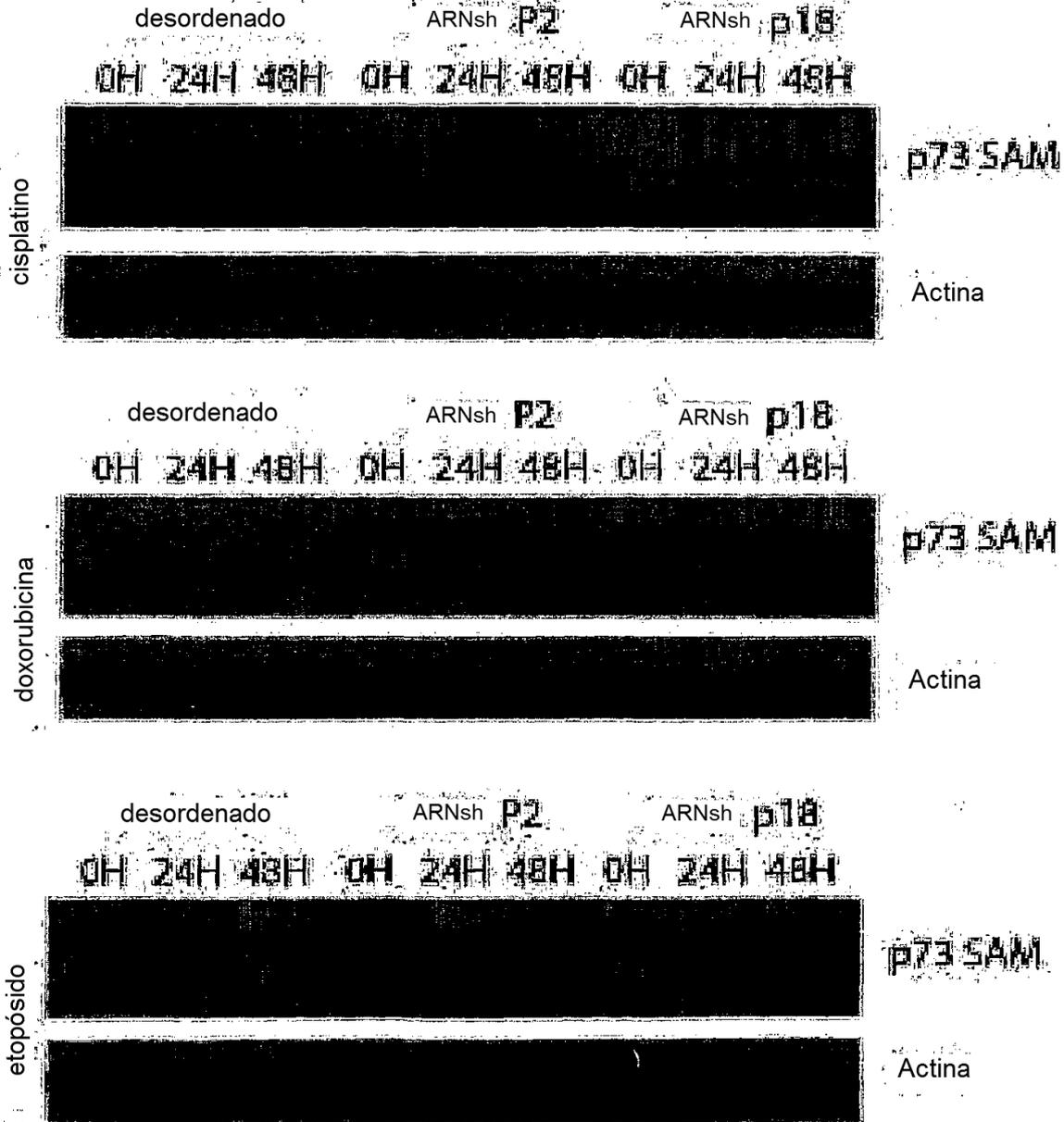


Figura 16



1. no transfectado
2. plásmido desordenado
3. ARNsh ITCH N° 2
4. ARNsh ITCH N° 18

Figura 17



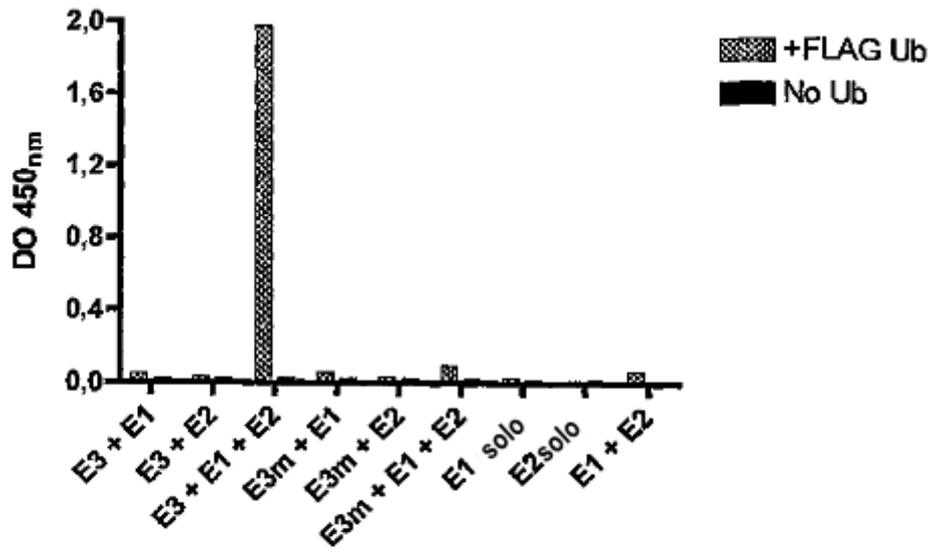


Figura 18

Figura 19

