

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 455**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/44 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2006 PCT/EP2006/062859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2006 WO06131496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2006 E 06763480 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 1891228**

54 Título: **Ensayos de regulación de la HDAC, compuestos y composiciones terapéuticas**

30 Prioridad:

06.06.2005 EP 05104907

28.10.2005 EP 05110148

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

31.03.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:

**DE SCHEPPER, STEFANIE HELENA;
ARTS, JANINE;
VIALARD, JORGE EDUARDO y
ANDRIES, LUC JOSEPH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 607 455 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

Ensayos de regulación de la HDAC, compuestos y composiciones terapéuticas.

5 La presente invención se refiere al área de los ensayos para compuestos que interactúan con la unión de una proteína que contiene PTB, es decir, la APPL (*Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif*, proteína adaptadora que contiene el dominio PH, el dominio PTB y el motivo de cremallera de leucina), con histona deacetilasa, en particular, la HDAC1. Los compuestos identificados que usan dichos ensayos son de utilidad en la inhibición de la actividad de la HDAC y como un medicamento, en particular, en la fabricación de un medicamento para inhibir las afecciones proliferativas, tales como el cáncer y la psoriasis.

Antecedentes de la invención

10 Las histonas nucleares son conocidas como componentes integrales y dinámicos de la maquinaria responsable para regular la transcripción genética y otros procesos con plantillas de ADN, tales como la replicación, reparación, recombinación y segregación de los cromosomas. Son sujeto de modificaciones post-traduccionales, las cuales incluyen acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinización y ribosilación de ADP.

15 La o las histonas deacetilasas, denominadas en la presente "HDAC", son enzimas que catalizan la eliminación de la modificación del acetilo en los residuos de lisina de las proteínas, lo cual incluye las histonas nucleosómicas núcleo H2A, H2B, H3 y H4. Junto con la/s histona/s acetiltransferasa/s, en adelante denominadas "HAT", las HDAC regulan el nivel de acetilación de las histonas. El equilibrio de la acetilación de las histonas nucleosómicas desempeña un papel importante en la transcripción de muchos genes. La hipoacetilación de las histonas se asocia con una estructura de cromatina condensada, lo cual da como resultado la represión de la transcripción de genes, en tanto
20 que las histonas acetiladas se asocian con una estructura de cromatina más abierta y la activación de la transcripción.

25 Se han descrito once HDAC relacionadas estructuralmente, que encuadran en dos clases. Las HDAC de clase I, consisten en las HDAC 1, 2, 3, 8 y 11, en tanto que las HDAC de clase II consisten en las HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10. Los miembros de una tercera clase de HDAC no están relacionados estructuralmente con las HDAC de la clase I y de la clase II. Las HDAC de la clase I/II actúan mediante mecanismos dependientes del zinc, en tanto que las HDAC de la clase III dependen de NAD [*Nicotinamide adenine dinucleotide*, dinucleótido de nicotinamida-adenina]

30 Además de las histonas, otras proteínas también han constituido el sustrato para la acetilación, en particular: factores de transcripción, tales como p53, GATA-1 y E2F; receptores nucleares, tales como el receptor de glucocorticoides, los receptores de las tiroides, los receptores de estrógenos; y las proteínas que regulan el ciclo celular, tales como pRb. La acetilación de las proteínas se ha vinculado con la estabilización de las proteínas, tales como la estabilización de p53, el reclutamiento de cofactores y una mayor unión de ADN. El p53 es un supresor tumoral que puede inducir la detención del ciclo celular o la apoptosis, en respuesta a una variedad de señales de estrés, tales como daños al ADN. El principal objetivo para la detención del ciclo celular inducida por el p53 parece ser el gen p21. Junto a su activación por p53, se ha identificado el p21 en virtud de su asociación con los complejos
35 de cinasa de la ciclina/dependiente de la ciclina, lo cual da como resultado la detención del ciclo celular tanto en la fase G1 como en la fase G2, su regulación positiva (*up-regulation*) durante la senescencia, y su interacción con el antígeno nuclear de células proliferativas.

40 Como ya se ha mencionado con anterioridad en la presente memoria descriptiva, la acetilación y desacetilación de las histonas desempeñan una función clave en la regulación de la transcripción de los genes. El estado de acetilación de los residuos de lisina en las colas N-terminales de la histona es controlado muy estrictamente por el equilibrio dinámico entre las actividades competitivas de las histonas acetiltransferasas (HAT) y las histonas deacetilasas (HDAC). El estado de una menor acetilación de la histona mediada por HDAC se relaciona con la represión transcripcional. La alteración de la HAT o la actividad de la HDAC puede asociarse con el desarrollo del cáncer. Los genes que se codifican para las enzimas de la HAT están mutados, amplificados, translocados o sobreexpresados en los tumores de origen hematológico y epitelial, por ejemplo, la leucemia mieloide aguda (AML, *acute myeloid leukemia*), el cáncer colorrectal, el cáncer gástrico y el cáncer de mama. Se observa un reclutamiento de HDAC desregulado y constante, junto con los factores de transcripción oncogénico a la cromatina en formas específicas de la leucemia y el linfoma, tales como leucemia promielocítica aguda (APL, *acute promyelocytic leukemia*), linfoma no Hodgkin y AML subtipo M2.

50 El estudio de los inhibidores de la HDAC indica que estos desempeñan un papel importante en la detención del ciclo celular, en la diferenciación celular, en la apoptosis y en la inversión de los fenotipos transformados. Hay varios inhibidores de la HDAC actualmente en la fase II del desarrollo clínico [revisado en Arts et al.¹] La inhibición de la HDAC induce la detención del ciclo celular, la diferenciación celular y la apoptosis.

55 El inhibidor tricostatina A (TSA), por ejemplo, provoca la detención del ciclo celular tanto en la fase G1 como en la G2, revierte el fenotipo transformado de las diferentes líneas celulares e induce la diferenciación de las células de la leucemia de Friend y otras. Se ha informado que la TSA (y el ácido hidroxámico suberoilánilida SAHA

[*suberoilánilide hidroxámic acid*]) inhiben el crecimiento celular, inducen la diferenciación terminal y previenen la formación de tumores en ratones (Finnin et al., Nature, 401: 188-193, 1999).

5 También se ha informado que la tricostatina A es de utilidad en el tratamiento de la fibrosis, por ejemplo, la fibrosis hepática y la cirrosis hepática. (Geerts et al., solicitud de patente europea con el número EP 0.827.742, publicada el 11 de marzo de 1998).

Los inhibidores de la HDAC pueden tener actividades indirectas, tales como aumento de la respuesta inmunológica del hospedador y la inhibición de la angiogénesis tumoral y, de este modo, pueden suprimir el crecimiento de los tumores primarios e impedir las metástasis (Mai et al., Medicinal Research Reviews, 25: 261-309).

10 Además, también se ha informado que los inhibidores de la HDAC inducen la expresión del gen p21. La activación de la transcripción del gen p21 mediante estos inhibidores es promovida por el remodelado de la cromatina, después de la acetilación de las histonas H3 y H4 en la región del promotor de p21. Esta activación de p21 se produce de una manera independiente del p53 y así, los inhibidores de la HDAC son operativos en las células con genes p53 mutados, un sello característico de numerosos tumores.

15 En tal sentido, se ha demostrado que la alteración de la HDAC1 en las células madre embrionarias del ratón da como resultado un grave deterioro en la proliferación celular y la letalidad embrionaria *in vivo* (Lagger et al.²). Esto se correlacionó con un aumento en la acetilación de H3 y H4 y en una mayor expresión de los inhibidores de la cinasa dependiente de la ciclina p21^{waf1,cip1} y p27. Además, el “knockdown” de la HDAC1 causa la inhibición de la proliferación celular y los cambios morfológicos indicativos de la diferenciación celular.

20 La HDAC1 ejerce su función como un componente de al menos 3 complejos multiproteicos diferentes: el complejo Sin3, el complejo NuRD/Mi2 y el complejo CoREST [revisado en Sengupta y Seto³]. La residencia en estos complejos es crucial para la actividad enzimática de HDAC1. Además de la formación de complejos, la actividad de la HDAC se regula mediante modificaciones posteriores a la traducción. La fosforilación de HDAC1 en la serina 421 y en la serina 423 por CK2 estabiliza la formación de complejos con RbAp48, MTA-2, Sin3 y CoREST, mejorando así la actividad enzimática de HDAC1⁴. La HDAC1 también puede ser ubiquitinizada y sumoileda en varios residuos de lisina con terminal C^{5,6}. Las modificaciones con SUMO1 mejoran la represión de transcripción mediante la HDAC1, sin afectar la formación de complejos.

25 En vista de lo anterior, los inhibidores de la HDAC pueden tener un gran potencial en el tratamiento de las enfermedades o afecciones de la proliferación celular, lo cual incluye tumores con genes p53 mutados. El farmacóforo de los actuales inhibidores de la HDAC se centra en torno al sitio activo que contiene zinc de las HDAC. Para expandir el espacio químico para la inhibición de HDAC, sería interesante identificar otras contrapartidas de unión que pueden influir en la función y regulación de las proteínas de HDAC, en particular, reguladores de la actividad enzimática de HDAC.

35 Constituye un objeto de la presente invención proporcionar la identificación de un co-factor de HDAC novedoso, es decir, APPL (proteína adaptadora que contiene el dominio de PH, el dominio de PTB y el motivo de la cremallera de la leucina) que potencie la actividad de la HDAC al producirse la unión y su consecuente uso para identificar los inhibidores de la HDAC, es decir, compuestos que afecten la interacción entre la HDAC y la APPL. Estos y otros aspectos de la invención se describen en la presente de manera más detallada.

Resumen de la invención

40 La presente invención provee ensayos que utilizan la interacción de la APPL o un fragmento de ella, con una enzima de la HDAC —en particular, la HDAC1 o un fragmento de ella— capaz de interactuar con la APPL o con dicho fragmento de la APPL. La APPL, también conocida como DIP13 α , significa “proteína adaptadora que contiene un dominio de PH, un dominio de PTB y motivo de cremallera de la leucina”⁷⁻¹⁰, ha sido identificada como una contrapartida de unión directa y novedosa de la HDAC en las células eucarióticas y como un factor clave en la regulación de su actividad enzimática. Los ensayos son útiles para identificar si un compuesto de prueba puede alterar la interacción de la APPL con la HDAC. Los ensayos también son útiles para determinar si el compuesto de prueba es un agonista o antagonista de HDAC. Los ensayos anteriores pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluso ensayos competitivos, no competitivos y comparativos, en los que la interacción de la APPL (ID. DE SEC. N.º: 2), o los péptidos relacionados con la HDAC, se evalúa como un control positivo o negativo o se compara con los resultados obtenidos con el compuesto de prueba.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a moléculas de polipéptidos y polinucleótidos aislados y purificados que codifican a la HDAC que une el fragmento de la APPL, que consisten en los aminoácidos 500-635 de la APPL (ID. DE SEC. N.º: 3) así como también, sus homólogos, y al uso terapéutico y diagnóstico de las mismas.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la identificación de la región de unión de la APPL, en adelante también denominada en este documento como sitio de unión de la APPL, en el dominio de HDAC y a las moléculas de polipéptidos y polinucleótidos aislados y purificados que codifican dicha región de unión de la APPL, que consiste

en los aminoácidos 51-84 de la HDAC1 (ID. DE SEC. N.º: 7), así como también, sus homólogos, y al uso de dicha región de unión de la APPL en los ensayos de acuerdo con la invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a identificar compuestos en los ensayos provistos por la invención, y al uso terapéutico de los mismos para inhibir las afecciones proliferativas, tales como el cáncer y la psoriasis. La presente invención provee un método para inhibir el crecimiento anormal de las células, lo cual incluye las células transformadas, mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. El crecimiento anormal de las células se refiere al crecimiento de las células independiente de los mecanismos regulatorios normales (por ejemplo, la pérdida de inhibición de contacto). Esto incluye la inhibición del crecimiento del tumor tanto directamente, causando la detención del crecimiento, la diferenciación terminal y/o la apoptosis de las células cancerosas, como indirectamente, inhibiendo la neovascularización de los tumores.

Se describe otro método para aislar HDAC a partir de una fracción celular que las contiene, el cual comprende poner en contacto la fracción celular con APPL o uno de sus fragmentos que se unen a HDAC inmovilizada a un sustrato del soluto y eluir las HDAC a partir de allí.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La HDAC1 coinmunoprecipita el dominio de PTB de la APPL y la APPL de extensión completa. Se transfectaron unas células HEK293 usando el reactivo Lipofectamine Plus con las combinaciones indicadas de la HDAC1-flag y HA-APPL-PTB (panel A) o V5-APPL (panel B) durante 24 horas. Con posterioridad, los lisados celulares totales se prepararon por lisis en un tampón de baja severidad, que contenía Tris-HCL 50 mM (pH 7,5), NaCl 120 mM, EDTA 5 mM y 0,5 % de Nonidet P-40. Las proteínas inmunoprecipitadas de la HDAC1 se separaron por SDS-PAGE y la coinmunoprecipitación de HA-APPL-PTB (A) o V5-APPL (B) se monitorizó por *Western blotting* [análisis de transferencia Western]. Como control, se reveló la cantidad total de proteína HDAC-flag que se había inmunoprecipitado, así como también, los niveles de sobreexpresión de la HDAC1-flag, HA-APPL-PTB y V5-APPL en los lisados totales.

Figura 2. Colocalización de APPL y HDAC1 en las células MDA-MB-231 y A2780. Se sembraron las células MDA-MB-231 y A2780 en portaobjetos para cámaras de cultivos de 8 pocillos y se fijaron con 4 % de paraformaldehído en tampón de Millonig (panel A y B) o con metanol frío (panel C y D). Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos específicos de la HDAC1 y APPL (Upstate Biotechnology) y APPL (fabricada a medida por Eurogentech), y luego se incubaron con anti-ratón conjugado Alexa488 para HDAC1 (verde) y anti-conejo conjugado Cy3 para APPL (rojo). El ADN se tiñó con Hoechst (azul). Panel A y B: las imágenes compuestas que ilustran la distribución 3D de la HDAC1 y APPL durante la interfase en los núcleos de las células MDA-MB-231 (panel A) y A2780 (panel B) se armaron a partir de una serie de pila Z de las secciones ópticas, usando un microscopio motorizado Axioplan 2 (Zeiss) equipado con un Apotome y un Axiocam HR. Los paneles externos muestran las dimensiones XZ (rectángulo rojo) y YZ (rectángulo azul) a través de la pila Z. Los triángulos blancos de los paneles externos indican la ubicación de la imagen XY en la pila Z. El gráfico de intensidad de pixeles representa los valores en pixeles de los 3 canales (azul = Hoechst; verde = HDAC1, rojo = APPL) a lo largo de la flecha amarilla en la imagen XY. Las flechas blancas en A. marcan un área con altos valores en pixeles, tanto para HDAC1 como para APPL.

Figura 3. La sobreexpresión de APPL aumenta la actividad enzimática de la HDAC1 en las células HEK293. Las células HEK293 se transfectaron con las combinaciones indicadas de HDAC1-flag y V5-APPL durante 48 horas. Panel A: la actividad de la HDAC1 se midió incubando los complejos de la HDAC1 inmunoprecipitados con un fragmento marcado con [³H]acetilo del péptido histona H4 ([biotin-(6-aminohexanoic)Gly-Ala-(acetil[³H])Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂], Amersham Pharmacia Biotech). El ácido [³H]acético liberado se extrajo con acetato de etilo y se cuantificó por recuento por centelleo. Los resultados de la actividad de la HDAC1 se presentan como la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes en un solo lisado. Panel B: se inmunoprecipitaron cantidades equivalentes de la HDAC1 por análisis Western blot. La cantidad de HDAC1-flag y proteína V5-APPL que se sobreexpresó se reveló en los lisados de células totales por *Western blotting*.

Figura 4. La sobreexpresión de APPL reduce la H3-acetilación y la expresión de la proteína p21^{waf1,cip1}. Unas células HEK293 se transfectaron con las combinaciones indicadas de HDAC1-flag y V5-APPL durante 48 horas. Panel A: la población de células transfectadas se enriqueció usando el sistema de selección de células transfectadas de MACSelect (Miltenyi Biotec). Panel A y B: se prepararon unos lisados de células totales en tampón RIPA y se separaron las proteínas por SDS-PAGE. La expresión de proteínas se analizó por *Western blotting*, usando anticuerpos específicos para H3 acetilado (Upstate Biotechnology), H3 total (abcam), V5-APPL (Invitrogen), APPL (Eurogentech), HDAC1-flag (Sigma), p21^{waf1,cip1} (Transduction Laboratories), y p16 (BD Pharmingen). Se revelaron los niveles de proteína actina (Oncogene) como un control para la carga equivalente. Se visualizaron los complejos de proteínas-anticuerpos por quimioluminiscencia (Pierce Chemical Co.) y fluorescencia (Odyssey) de acuerdo con las instrucciones de fábrica.

Figura 5. Alineación de todas las contrapartidas de unión APPL-PTB en el dominio de unión de PTB. Los nombres de las secuencias se brindan como: UniProt Accession Number_HUGO gene symbol_species. La línea final provee una secuencia de consenso en la que 3 representa los carbohidratos Serina (S) o treonina (T); 4 representa los

residuos de aminoácidos básicos lisina (K) o arginina (R); 5 representa los residuos de aminoácidos aromáticos fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptófano (W); y 6 representa los residuos de aminoácidos hidrofóbicos leucina (L), isoleucina (I), valina (V) o metionina (M).

5 Figura 6. Imágenes de apótomos de células MDA-MB-231 en diferentes estadios mitóticos. Unas células MDA-MB-231 se sembraron en portaobjetos para cámara de cultivos de 8 pocillos y se fijaron con metanol frío. Los portaobjetos se incubaron con anticuerpos específicos de la HDAC1 (Upstate Biotechnology) y APPL (fabricados a medida por Eurogentech) y luego se incubaron con anticuerpo antirratón conjugado Alexa488 para HDAC1 (verde) y anticuerpos anticonejo Cy3 para APPL (rojo). El ADN se tiñó con Hoechst (azul).

Descripción detallada

10 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "APPL" se refiere a la proteína adaptadora que contiene un dominio de PH, un dominio de PTB y el motivo de cremallera de la leucina, también conocida como DIP13 α , que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 2 o proteínas relacionadas con la APPL, donde dichas proteínas relacionadas derivan de la secuencia antes citada, mediante sustitución, eliminación y/o adición de uno o varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que codifica a la APPL y donde dichas proteínas relacionadas con la APPL tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 2 y pueden unirse a las proteínas de las HDAC de acuerdo con la invención. En otra realización, la presente invención provee fragmentos de las proteínas de APPL, donde los citados fragmentos comprenden al menos 100, 150, 200, 250 o 300 aminoácidos que son contiguos en la proteína madre y donde los citados fragmentos son capaces de unirse a las HDAC o sus fragmentos de unión a la APPL. En una realización particular, dicho fragmento consiste en la HDAC que une el fragmento de APPL (ID. DE SEC. N.º: 3), así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 3 y son capaces de unirse a las proteínas de la HDAC, en particular a HDAC1. Los fragmentos de las APPL según se han definido anteriormente en la presente quedan incluidos dentro de la definición de proteínas relacionadas con la APPL, tal como se usa en todo el presente texto.

25 Tal como se ha utilizado en la presente memoria descriptiva con anterioridad, las "HDAC" son enzimas que catalizan la eliminación de la modificación con acetilo en los residuos de lisina de proteínas, incluidas las histonas nucleosómicas núcleo H2A, H2B, H3 y H4. Tal como se utiliza en la presente invención, estas enzimas consisten en las proteínas de la HDAC 1 a 11, en particular, la HDAC1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 5 o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 5 y son capaces de unirse a la APPL o a la HDAC que une el fragmento de APPL. También constituye un objeto de la presente invención proporcionar fragmentos de dichas proteínas de la HDAC, donde los citados fragmentos comprenden al menos 20 aminoácidos que son contiguos en la proteína madre, pero que convenientemente pueden contener al menos 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos, que son contiguos en la proteína madre y donde los citados fragmentos son capaces de unirse a la APPL o a la HDAC que une el fragmento de APPL. En una realización particular, dicho fragmento comprende el dominio de histona deacetilasa (ID. DE SEC. N.º: 6) o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 6. En una realización más particular, los citados fragmentos comprenden la región de unión de la APPL que consiste en los aminoácidos 51-84 de la HDAC1 (ID. DE SEC. N.º: 7) o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la ID. DE SEC. N.º: 7. Los homólogos de la región de unión de la APPL pueden caracterizarse por tener una metionina (M) en las posiciones 1 y 14, un aminoácido hidrofóbico en la posición 3; una prolina (P) en las posiciones 6 y 31; una alanina (A) en la posición 9; un glutamato (E) en las posiciones 12 y 13, un aminoácido aromático en la posición 19 y una histidina (H) en la posición 18, cuando se compara con la ID. DE SEC. N.º: 7. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un aminoácido aromático se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W) o histidina (H), y un aminoácido hidrofóbico se selecciona del grupo que consiste en isoleucina (I), leucina (L), valina (V), cisteína (C), alanina (A), glicina (G), metionina (M), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W), histidina (H), treonina (T) o prolina (P). Incluso en otra realización más, la HDAC que une el fragmento de APPL consiste en la ID. DE SEC. N.º: 6 o la ID. DE SEC. N.º: 7.

50 Los métodos para comparar la identidad y similitud de dos o más secuencias son ampliamente conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, es posible usar los programas disponibles en el Winconsin Sequence Analysis Package, versión 9.1 (Devreux J. et al, Nucleic Acid Res., 12, 387-395, 1984), por ejemplo, los programas BESTFIT y GAP, para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y el porcentaje de similitud entre dos secuencias de péptidos o polipéptidos. El BESTFIT emplea el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (J. Mol. Biol., 147, 195-197, 1981) y encuentra la mejor región individual de similitud entre dos secuencias. BESTFIT es más adecuado para comparar dos secuencias de polinucleótidos o dos secuencias de péptidos o polipéptidos que son disímiles en cuanto a su longitud; programa que asume que la secuencia más corta representa una porción de la más larga. En comparación, GAP alinea dos secuencias, hallando una "similitud máxima", de acuerdo con el algoritmo de Needleman y Wunsch (J.Mol.Biol., 48, 443-453, 1970). El GAP es más adecuado para comparar las secuencias que tienen aproximadamente la misma longitud y se prevé una alineación sobre toda la longitud. Con preferencia, los parámetros "Gap Weight" [peso de la brecha] y "Length Weight" [peso del

largo] usados en cada programa son 50 y 3, para las secuencias de polinucleótidos y 12 y 4 para las secuencias de polipéptidos, respectivamente. Con preferencia, los porcentajes de identidades y similitudes se determinan cuando las dos secuencias que se comparan están alineadas de manera óptima. Otros programas para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias también son conocidos en la técnica, por ejemplo, la familia BLAST de programas (Altschul S F et al, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997).

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un “compuesto” es un ensamblaje orgánico o inorgánico de átomos de cualquier tamaño e incluye pequeñas moléculas (con un tamaño inferior a 2500 Daltons aproximadamente) o moléculas de mayor tamaño, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas enteras y polinucleótidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un compuesto de “prueba” es un compuesto empleado en una prueba para evaluar si dicho compuesto de prueba puede ser un agonista o antagonista de la enzima de la HDAC. El hecho de que el compuesto de prueba sea o no un agonista o antagonista real de una enzima de la HDAC se determina en un ensayo de acuerdo con la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un “agonista” es un compuesto que interactúa con una enzima de la HDAC y la activa. Una enzima activada de la HDAC cataliza la eliminación del acetilo de los residuos acetilados de la lisina de proteínas y por ejemplo, puede evaluarse midiendo la liberación del ácido acético de un sustrato del péptido de histona marcado con acetilo de manera detectable.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un “antagonista” es un compuesto que interactúa con la activación de una enzima de la HDAC y la inhibe o la previene.

Polinucleótidos

La molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica la APPL o un fragmento de ella —donde dicha molécula de ácido nucleico es ARN, ADN, ADNc o bien ADN genómico— puede usarse para la invención de la interacción de la APPL y los péptidos relacionados con las HDAC o sus fragmentos.

La molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica la HDAC o sus fragmentos, donde dicha molécula de ácido nucleico es ARN, ADN, ADNc o bien ADN genómico, puede usarse para la invención de la interacción de la APPL y las proteínas relacionadas con la APPL con dicha HDAC o fragmentos de la HDAC.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, “aislada” se refiere al hecho de que los polinucleótidos, las proteínas y los polipéptidos, o sus fragmentos respectivos en cuestión, han sido removidos de su medio *in vivo*, para que puedan ser manipulados por el experto, por ejemplo, aunque sin limitación, mediante secuenciamiento, restricción digestión, mutagénesis dirigida al sitio y subclonación en los vectores de expresión para un fragmento de ácidos nucleicos, así como también, obtener la proteína o los fragmentos de proteína en cantidades que brindan la oportunidad de generar anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, secuenciamiento de aminoácidos, y digestión de péptidos. En otras palabras, “aislada” indica que una secuencia natural ha sido removida de su contexto celular normal. De esta manera, la secuencia puede estar en una libre de células o ubicarse en un medio celular o contexto de ácido nucleico diferente. Por tanto, los ácidos nucleicos reivindicados en este documento pueden estar presentes como material heterólogo en las células enteras o en los lisados celulares o en una forma parcial, sustancial o totalmente purificada.

Un polinucleótido se considera “purificado” cuando se lo purifica lejos de los contaminantes ambientales. De este modo, un polinucleótido aislado de las células se considera sustancialmente purificado cuando se lo purifica a partir de componentes celulares por métodos estándar, mientras que una secuencia de ácidos nucleicos químicamente sintetizada se considera sustancialmente purificada cuando se purifica a partir de sus precursores químicos. Una proteína o ácido nucleico “sustancialmente puros” comprenden típicamente al menos el 85 % de una muestra, prefiriéndose porcentajes mayores. Un método para determinar la pureza de una proteína o molécula de ácido nucleico, es por electroforesis de una preparación en una matriz tal como poliacrilamida o agarosa. La pureza se evidencia por la aparición de una única banda después de la tinción. Otros métodos para evaluar la pureza incluyen cromatografía, espectrometría de masas y centrifugación analítica.

La expresión “sus fragmentos” describe un trozo o subregión de una molécula de ácido nucleico cuya secuencia se describe en este documento, de modo tal que dicho fragmento comprenda 15 nucleótidos o más que sean contiguos en la molécula madre del ácido nucleico, aunque convenientemente puede contener al menos 40, 50 o 100 nucleótidos de la molécula madre de ácido nucleico. La frase “sus fragmentos” incluye “fragmentos funcionales”, en los que el fragmento, el trozo o la subregión aislados comprenden una región funcionalmente distinta, tal como un sitio activo, un sitio de unión o un sitio de fosforilación de un receptor. Los fragmentos funcionales pueden producirse por tecnología de clonación o como los productos naturales de técnicas de escisión alternativas. Tal como se utiliza con relación a las proteínas de la HDAC, un fragmento funcional retiene la actividad enzimática de dichas proteínas, es decir la remoción de la modificación por acetilo de residuos de lisina en las proteínas, lo cual incluye las histonas nucleosómicas núcleo H2A, H2B, H3 y H4. Su actividad se evalúa típicamente usando una histona acetilada

marcada de manera detectable como sustrato y midiendo la liberación del grupo acetilo marcado, tales como por ejemplo, los que se proveen en el Ejemplo 4, explicado más adelante en este documento. Los fragmentos funcionales de proteínas de la HDAC comprenderían mínimamente el dominio de histona deacetilasa de dichas proteínas, en particular, el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 6 y codificada por los ácidos nucleicos 109 a 1047 de la ID. DE SEC. N.º4, o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con los ácidos nucleicos 109 a 1047 de la ID. DE SEC. N.º 4.

Para la proteína de la APPL utilizada en la invención, puede ser de utilidad una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica a la APPL o a un fragmento de ella, que comprende un elemento seleccionado de un grupo que consiste en lo siguiente:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica a la APPL, que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **2**;

(b) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica a la APPL (ID. DE SEC. N.º: **1**);

(c) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL que comprende los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: **1**, así como también, sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: **3**;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL, que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **3**;

(e) una molécula de ácido nucleico que es complementaria con el polinucleótido de los ítems (a) a (d);

(f) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases secuenciales del polinucleótido de los ítems (a) a (d);

(g) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones severas con la molécula del polinucleótido de los ítems (a) a (d) o

(h) una molécula de ácido nucleico que codifica a la APPL, que comprende una secuencia de nucleótidos que se degenera como resultado del código genético, en una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de cualquiera de los elementos (a) a (g).

Para la proteína de la APPL utilizada en la invención, puede ser de utilidad una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica a la APPL o a un fragmento de ella, que comprende un elemento seleccionado de un grupo que consiste en lo siguiente:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica a la APPL, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **2**;

(b) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica a la APPL (ID. DE SEC. N.º: **1**);

(c) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL, que consiste en los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: **1**, así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: **1**;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL, donde dicha HDAC se une al fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **3**;

(e) una molécula de ácido nucleico que es complementaria con el polinucleótido de los ítems (a) a (d);

(f) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases secuenciales del polinucleótido de los ítems (a) a (d);

(g) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones severas con la molécula del polinucleótido de los ítems (a) a (d) o

(h) una molécula de ácido nucleico que codifica a la APPL, que comprende una secuencia de nucleótidos que se degenera como resultado del código genético, en una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de cualquiera de los elementos (a) a (g).

La APPL que codifica a la molécula de ácido nucleico consiste en la ID. DE SEC. N.º: **1**, y la HDAC que une el

fragmento de APPL que codifica a molécula de ácido nucleico consiste en los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: **1**.

5 Para la proteína de la HDAC utilizada en la invención, puede ser de utilidad una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica la HDAC o un fragmento de ella, que comprende un elemento seleccionado de un grupo que consiste en lo siguiente:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **5**;

(b) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la ID. DE SEC. N.º: **4**, que codifica la HDAC1;

10 (c) una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1 que comprende los ácidos nucleicos 109 a 1047 de la ID. DE SEC. N.º: **4** así como también, de los mismos donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: **4**;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio de histona deacetilasa de la HDAC, que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6**;

15 (e) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC1 que comprende los ácidos nucleicos 235 a 336 de la ID. DE SEC. N.º: **4**, así como también, sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: **4**;

(f) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC, que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **7**;

20 (g) una molécula de ácido nucleico que es complementaria con el polinucleótido de los ítems (a) a (f);

(h) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases secuenciales del polinucleótido de los ítems (a) a (g);

(i) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones severas con la molécula del polinucleótido de los ítems (a) a (f); or

25 (j) una molécula de ácido nucleico que codifica la HDAC que comprende una secuencia de nucleótidos que se degenera como resultado del código genético, en una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de cualquiera de los elementos de los ítems (a) a (i).

30 Para la proteína de la HDAC utilizada en la invención, puede ser de utilidad una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica la HDAC o un fragmento de ella, que comprende un elemento seleccionado de un grupo que consiste en lo siguiente:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **5**;

(b) una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de la ID. DE SEC. N.º: **4**, que codifica a la HDAC1;

35 (c) una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1, que consiste en los ácidos nucleicos 109 a 1047 de la ID. DE SEC. N.º: **4**, así como también, de los mismos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: **4**;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio de histona deacetilasa de la HDAC, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6**;

40 (e) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC1 que consiste en los ácidos nucleicos 235 a 336 de la ID. DE SEC. N.º: **4**, así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: **4**;

45 (f) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **7** o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: **7**;

(g) una molécula de ácido nucleico que es complementaria con el polinucleótido de los ítems (a) a (f);

(h) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases secuenciales del polinucleótido de los ítems (a) a (f);

(i) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones severas con la molécula del polinucleótido de los ítems (a) a (f) o

5 (j) una molécula de ácido nucleico que codifica la HDAC que comprende una secuencia de nucleótidos que se degenera como resultado del código genético, en una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de cualquiera de los elementos de los ítems (a) a (i).

En una realización particular de la presente invención, la HDAC que codifica molécula de ácido nucleico consiste en la ID. DE SEC. N.º: 4, y la región de unión de la APPL que codifica una molécula de ácido nucleico que consiste en los ácido nucleicoes 109 a 1047 de la ID. DE SEC. N.º: 4, más en particular, el fragmento de ella que consiste en los ácidos nucleicos 235 a 336 de la ID. DE SEC. N.º: 4.

10 Los expertos en la técnica reconocerán que debido a la degeneración del código genético, podrían introducirse numerosas sustituciones "silentes" de pares de bases de nucleótidos en la secuencia identificada como ID. DE SEC. N.º: 1, ID. DE SEC. N.º: 4 o los fragmentos antes identificados de dichas secuencias, sin alterar la identidad de el o los aminoácidos codificados o productos proteicos. Todas estas sustituciones están incluidas en el alcance de la invención.

15 Los términos "complementario" o "complementariedad", tal como se utilizan en la presente memoria descriptiva, se refieren a la capacidad de los nucleótidos de la purina y pirimidina de asociarse a través de la unión del hidrógeno para formar moléculas de ácidos nucleicos de cadena doble. Los siguientes pares de bases se relacionan por complementariedad: guanina y citosina; adenina y timina; y adenina y uracilo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "complementario" significa que la relación antes citada se aplica sustancialmente a todos los
20 pares de bases que comprenden dos moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios en toda la extensión de dichas moléculas. "Parcialmente complementario" se refiere a la relación antes citada en la cual una de las dos moléculas de ácidos nucleicos de cadena simple es más corta que la otra, de modo tal que una porción de una de las moléculas sigue siendo de cadena simple.

25 El término "hibridización" tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva se refiere a un proceso en el cual una molécula de cadena simple de ácido nucleico se une con una cadena complementaria mediante apareamiento de bases de nucleótidos.

30 El término "severidad" se refiere a las condiciones de hibridización. Las condiciones de alta severidad son desfavorables para el apareamiento de bases no homólogas. Las condiciones de baja severidad tienen el efecto opuesto. La severidad se puede alterar, por ejemplo, por la temperatura y la concentración de la sal. Las "condiciones severas" se refieren a la incubación durante toda la noche a 42 °C, en una disolución que comprende 50 % de formamida, 5 x SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado, seguido por el lavado de los filtros en 0,1 x SSC, a 65 °C aproximadamente. Otras condiciones adecuadas de hibridización se describen en los ejemplos.

35 Para el fragmento de unión de la HDAC dentro de la APPL y el fragmento de unión de la APPL dentro de la HDAC utilizada en la invención, puede ser de utilidad una molécula de ácido nucleico aislada y purificada, seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

40 (a) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL que consiste en los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: 1 así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: 1;

(b) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL, donde dicha HDAC se une al fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 3;

45 (c) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC1 que consiste en los ácidos nucleicos 235 a 336 de la ID. DE SEC. N.º: 4 así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: 4;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 7 o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 7;

50 (e) una molécula de ácido nucleico que es complementaria con el polinucleótido de los ítems (a) a (d);

(f) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases secuenciales del polinucleótido de los ítems (a) a (e) o

(g) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones severas con la molécula del polinucleótido de los

ítems (a) a (f).

Un vector que comprende la molécula de ácidos nucleicos aislada según se ha definido con anterioridad, así como también, una célula hospedadora transformada de manera estable con dicho vector, son de utilidad para la invención. El término "vector" se refiere a cualquier portador de ADN exógeno que es útil para transferir el ADN en una célula hospedadora para la replicación y/o la expresión apropiada del ADN exógeno por la célula hospedadora. En consecuencia, en una realización específica, dicho vector es un vector de expresión, tales como pGL31uc, pBLCAT5 (LMBP 2451), pGMCSFlacZ (LMBP 2979), pEGFP o pSEAPbasic (DMB 3115), en el que los números LMBP y DMB se refieren a los números de acceso de estos vectores de expresión en el Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms. También se incluye en la invención una célula hospedadora que aloja un vector de acuerdo con la invención. Dicha célula hospedadora puede ser una célula procariótica, una célula eucariótica unicelular o una célula derivada de un organismo multicelular. La célula hospedadora, por ejemplo, puede ser una célula bacteriana, tales como una célula *E. coli*; una célula de una levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, o una célula de un mamífero, tales como células HEK293. Los métodos empleados para efectuar la introducción del vector en la célula hospedadora son métodos estándar, ampliamente conocidos para una persona familiarizada con los métodos de ADN recombinante.

Para la HDAC y/o la proteína de la APPL empleadas en la invención, puede ser de utilidad un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada y purificada seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente:

(a) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL que consiste en los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: 1 así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con los ácidos nucleicos 1554 a 1958 de la ID. DE SEC. N.º: 1;

(b) una molécula de ácido nucleico que codifica a la HDAC que une el fragmento de APPL, donde dicha HDAC se une al fragmento que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 3 o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la ID. DE SEC. N.º: 3

(c) una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1, que consiste en los ácidos nucleicos 109 a 1047 de la ID. DE SEC. N.º: 4, así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 4;

(d) una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 6 o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la ID. DE SEC. N.º: 6;

(e) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC1 que consiste en los ácidos nucleicos 235 a 336 de la ID. DE SEC. N.º: 4 así como también sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con dicho fragmento de la ID. DE SEC. N.º: 4;

(f) una molécula de ácido nucleico que codifica la región de unión de la APPL de la HDAC, que tienen la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 7 o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 o 99 % de identidad con la ID. DE SEC. N.º: 7;

(g) una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 15 bases secuenciales del polinucleótido de los ítems (a) a (f) o

(h) una molécula de ácido nucleico que se hibridiza en condiciones severas con la molécula del polinucleótido de los ítems (a) a (f).

Los vectores de acuerdo con la invención son de particular utilidad en un método para identificar los compuestos que modulan la interacción de la APPL con proteínas de la HDAC; dichos métodos incluyen, por ejemplo, el sistema de dos vectores híbridos, que es bien conocido para los biólogos moleculares (Fields & Song, Nature 340:245 1989). Esta técnica se basa en la reconstitución funcional *in vivo* de un factor de transcripción, que activa un gen reportero. Más particularmente, la técnica comprende proveer una célula hospedadora apropiada con un constructo de ADN que comprende un gen reportero, bajo el control de un promotor regulado por un factor de transcripción que tiene un dominio de unión de ADN y un dominio activador, que expresa en la célula hospedadora, una primera secuencia de ADN híbrida que codifica una primera fusión de un fragmento o toda una secuencia de ácidos nucleicos que codifica a la APPL o uno de sus fragmentos que se unen a HDAC y ya sea dicho dominio de unión de ADN o dicho dominio activador del factor de transcripción, expresan en la hospedadora al menos una segunda secuencia de ADN híbrida, que codifica a la HDAC o a un fragmento de la APPL de la misma junto con el dominio de unión de ADN o el dominio activador del factor de transcripción que no se incorpora en la primera fusión; detectar cualquier unión de las proteínas a investigar con una proteína de acuerdo con la invención, mediante la detección de la presencia de cualquier producto del gen reportero en la célula hospedadora.

Un ejemplo de dicha técnica utiliza la proteína de GAL4 en la levadura. La GAL4 es un activador de transcripción del metabolismo de la galactosa en la levadura y tiene un dominio separado para unir los activadores, corriente arriba de los genes que metabolizan galactosa, así como también, un dominio de unión de la proteína. Pueden construirse vectores de nucleótidos, comprendiendo uno de ellos los residuos de nucleótidos que codifican el dominio de unión de ADN de GAL4. Estos residuos del dominio de unión pueden fusionarse a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica a la APPL o uno de sus fragmentos que se unen a HDAC, según se han definido anteriormente en la presente. El otro vector comprende los residuos que codifican el dominio de unión de la proteína de GAL4, fusionados a los residuos que codifican a la HDAC o un fragmento de unión de la APPL de la misma, según se ha definido anteriormente en la presente. Toda interacción entre el factor neurotrófico codificado por el ácido nucleico de acuerdo con la invención y la proteína a testear conduce a la activación de la transcripción de una molécula reportera en una célula de levadura deficiente en la transcripción de GAL-4, en la que los vectores se han transformado. Con preferencia, una molécula reportera, tal como la β -galactosidasa se activa al producirse la restauración de la transcripción de los genes del metabolismo de la galactosa en las levaduras.

Polipéptidos

La presente invención también se refiere al uso de las enzimas de la HDAC o de sus fragmentos en un ensayo que aprovecha la interacción de la APPL y los péptidos relacionados con las enzimas de la HDAC, donde dicho polipéptido puede ser codificado por una molécula de ácido nucleico aislada y purificada, según se ha definido con anterioridad.

La enzima de la HDAC, según se la emplea allí, consiste en la enzima de la HDAC o sus fragmentos de unión a la APPL seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente;

(a) una proteína aislada y purificada de la HDAC1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **5**;

(b) un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6**;

(c) un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **7**;

En una realización, la proteína de la HDAC1 comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **5** o un fragmento de ella. En particular, un fragmento funcional de la misma, en el que un fragmento funcional de la HDAC1 retiene la actividad enzimática de dicha proteína, es decir, la eliminación de las modificaciones con acetilo de los residuos de lisina en las proteínas, lo cual incluye las histonas nucleosómicas núcleo H2A, H2B, H3 y H4. Los fragmentos funcionales de las proteínas de la HDAC mínimamente comprenderían el dominio de histona deacetilasa de las citadas proteínas, en particular, el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6** o sus homólogos, donde dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la ID. DE SEC. N.º: **6**. En una realización más particular, el fragmento funcional de la proteína de la HDAC consistiría en el polipéptido aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6** o sus homólogos, en el que dichos homólogos tienen al menos 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con la ID. DE SEC. N.º: **6**. En otra realización, la proteína de la HDAC1 consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **5** o sus fragmentos de unión a la APPL. El fragmento de unión de la APPL consiste en la ID. DE SEC. N.º: **7** o bien, comprende la secuencia de consenso según se han definido anteriormente en la presente. En particular, el fragmento de unión de la APPL consiste en la ID. DE SEC. N.º: **7** o bien, en sus homólogos, según se han definido anteriormente en la presente.

La presente invención se refiere al uso de la APPL y de los péptidos relacionados en un ensayo de acuerdo con la invención, en el que la APPL o las proteínas relacionadas con la APPL se seleccionan del grupo que consiste en lo siguiente;

i) un polipéptido aislado que codifica la APPL, que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **2**;

ii) un polipéptido aislado que codifica la HDAC que une el fragmento de APPL que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **3**.

En una realización de la presente invención, la APPL consiste en la secuencia de aminoácidos codificada por la ID. DE SEC. N.º: **2**, una proteína relacionada con la APPL, según se ha definido anteriormente en la presente, o del fragmento de unión de la HDAC codificada por la ID. DE SEC. N.º: **3**.

Dada la identificación y la caracterización del fragmento de unión de la HDAC dentro de la APPL y el fragmento de unión de la APPL dentro de la HDAC, también constituye un objeto de la presente invención proveer un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **7**.

La proteína receptora y los péptidos de acuerdo con la invención incluyen todos los cambios posibles de aminoácidos conservadores, donde los "cambios de aminoácidos conservadores" se refieren a un reemplazo de uno

más residuos de aminoácidos en una proteína receptora o péptido parental sin afectar la actividad biológica de la molécula madre sobre la base de la sustituibilidad reconocida en la técnica de ciertos aminoácidos (véase, por ejemplo, M. Dayhoff, In Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Sup. 3, páginas 345-352, 1978).

5 Los expertos en la técnica reconocerán que los polipéptidos de acuerdo con la invención, es decir, las enzimas de la HDAC, el fragmento de unión de la APPL y la APPL o las proteínas relacionadas con la APPL, podrían obtenerse mediante una pluralidad de técnicas recombinantes de ADN, lo cual incluye, por ejemplo, la hibridación, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polimerase chain reaction*), o la síntesis de ADN *de novo* (véase, por ejemplo, T. Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed. Chap. 14 (1989)).

10 Los péptidos y los derivados de la presente invención pueden prepararse fácilmente de acuerdo con métodos de síntesis de péptidos bien establecidos, en líquidos estándar o, con preferencia, en fase sólida, cuyas descripciones generales están extensivamente disponibles o se los puede preparar en disolución, mediante el método en fase líquida o por cualquier combinación de química de disolución y fase sólida y fase líquida.

15 Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede ser aislado y/o purificado (por ejemplo, usando un anticuerpo), por ejemplo, después de la producción mediante la expresión a partir de ácido nucleico codificante. El polipéptido aislado y/o purificado puede usarse en la formulación de una composición, que puede incluir al menos un componente adicional, por ejemplo una composición farmacéutica que incluye un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo o portador.

20 Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede usarse como un inmunógeno o de lo contrario, para obtener anticuerpos específicos. Los anticuerpos son de utilidad en la purificación y otros contextos de manipulación de polipéptidos, análisis de diagnóstico y terapéuticos. Los anticuerpos a los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse, ventajosamente, mediante técnicas que son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales pueden prepararse inoculando un animal hospedador, tal como un ratón, con el factor de crecimiento o uno de sus epítopos y recuperando el suero inmune. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas, tales como lo describen Kohler R. y Milstein C., *Nature* (1975) 256, 25 495-497.

Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede usarse en el análisis de moléculas que se unen a él o para modular su actividad o función. Dichas moléculas pueden ser de utilidad en un contexto terapéutico (posiblemente, incluido el contexto profiláctico).

30 Un polipéptido o polipéptido marcado de la invención o fragmento de ella también se puede fijar a una fase sólida, por ejemplo la superficie de un pocillo de inmunoensayo o tira reactiva.

Dichos polipéptidos marcados y/o inmovilizados pueden envasarse en kits en un recipiente adecuado, junto con reactivos adecuados, controles, instrucciones y similares.

Tales polipéptidos y kits pueden usarse en métodos de detección de anticuerpos de dichos polipéptidos presentes en una muestra o porciones activas o sus fragmentos mediante un inmunoensayo.

35 Los métodos de inmunoensayo son ampliamente conocidos en la técnica y por lo general, comprenderán lo siguiente:

(a) proveer un polipéptido que comprende un epítipo que puede unirse mediante un anticuerpo contra dicha proteína;

40 (b) incubar una muestra biológica con dicho polipéptido en condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno y

(c) determinar si se forma el complejo de anticuerpo-antígeno que comprende dicho polipéptido.

Ensayos

Los ensayos de la presente invención se pueden diseñar en varios formatos, generalmente conocidos en la técnica de selección de compuestos para actividad biológica o para proteínas de unión.

45 Los polipéptidos de la presente invención son responsables de una o más funciones biológicas, lo cual incluye uno o más estados patológicos, en particular, las enfermedades antes citadas. Por tanto, es conveniente diseñar métodos de detección para identificar compuestos que estimulen o que inhiban la función de las HDAC.

50 Los ensayos de la presente invención aprovechan ventajosamente el hecho de que la APPL o las proteínas relacionadas con la APPL son cofactores para las enzimas de la HDAC y activan las enzimas de la HDAC al unirse a ellas.

5 Por tanto, la presente invención incluye métodos para identificar compuestos que se unen específicamente a las enzimas de la HDAC, donde dichos compuestos pueden ser agonistas o antagonistas de las enzimas de la HDAC. Los métodos de ensayo de la presente invención difieren de los descritos en el estado de la técnica porque los presentes ensayos incorporan al menos un paso en el que la interacción de la APPL o las proteínas relacionadas con la APPL con las HDAC se incorpora en el ensayo, o porque aplican el fragmento de unión de las APPL de las HDAC.

De esta manera, la presente invención contempla un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de unir una enzima de la HDAC que comprende lo siguiente:

10 a) incubar una sustancia de origen que contenga una enzima de la HDAC, o uno de sus fragmentos, con lo siguiente:

i) APPL o proteínas relacionadas con la APPL

ii) dicho compuesto de prueba y

b) medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de APPL o proteínas relacionadas con la APPL unidas a la enzima.

15 En una realización preferida, la presente invención contempla un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de unirse a la enzima de la HDAC1 que comprende lo siguiente:

a) incubar una sustancia de origen que contenga HDAC1, o uno de sus fragmentos, con lo siguiente:

i) APPL o proteínas relacionadas con la APPL

ii) dicho compuesto de prueba y

20 b) medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de APPL o proteínas relacionadas con la APPL unida a la enzima.

La sustancia de origen que contiene la HDAC1 se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

(a) un proteína de la HDAC1 aislada y purificada, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **5**;

25 (b) un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6**;

(c) un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **7**.

30 Sobre la base de la identificación de la región de unión de la APPL, la presente invención provee, asimismo, ensayos para identificar compuestos que modulan la interacción de la APPL o proteínas relacionadas con la APPL con dicha región de unión de la APPL. Tales compuestos pueden ser de utilidad como agonistas o antagonistas para modular la interacción de la APPL con otras enzimas, tales como por ejemplo, AKT2, DCC, FSHR y Rab5, que comprenden dicha región de unión de la APPL.

35 De esta manera, la presente invención provee un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de modular la interacción de la APPL o de las proteínas relacionadas con la APPL con la región de unión de la APPL que comprende lo siguiente:

a) incubar una sustancia de origen que contiene una región de unión de la APPL, con lo siguiente:

i) APPL o proteínas relacionadas con la APPL

ii) dicho compuesto de prueba y

40 b) medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de APPL o proteínas relacionadas con la APPL unidas a la región de unión.

En otra realización de la presente invención, la sustancia de origen que contiene la región de unión de la APPL se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

(a) un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: **6**;

45 (b) un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC.

N.º: 7.

El método de detección puede medir simplemente, la unión de un compuesto candidato al polipéptido o a las células o membranas portadoras del polipéptido, o una proteína de fusión de los mismos, por medio de una etiqueta directamente o indirectamente asociada con el compuesto candidato. De manera alternativa, el método de detección puede implicar la competencia con un competidor marcado. En una realización preferida, este competidor marcado es un ligando que según se sabe, se une al HDAC, tales como APPL o las proteínas relacionadas con la APPL. En otra realización, dicha proteína relacionada con la APPL consiste en el fragmento de unión de la HDAC codificada por la ID. DE SEC. N.º: 3.

Por tanto, en una realización más preferida, el método de detección comprende APPL marcada o etiquetada o proteínas relacionadas con la APPL marcadas, en el que dicha etiqueta se utiliza para medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de APPL o la proteína relacionada con la APPL unida a la enzima de la HDAC o un fragmento de unión de la APPL de la misma.

En consecuencia, la presente invención provee un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de unirse a la enzima de la HDAC1 que comprende lo siguiente:

i) incubar la enzima de la HDAC1 o un fragmento de unión de la APPL de la misma con una proteína marcada relacionada con la APPL, que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la ID. DE SEC. N.º: 2, con preferencia una proteína yodada relacionada con la APPL, que consiste en la ID. DE SEC. N.º: 3;

ii) adicionar el compuesto de prueba a la mezcla de incubación y

iii) medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de péptido relacionado con la APPL marcado unido a la enzima de la HDAC1 o sus fragmentos de unión a la APPL.

En una realización, la enzima de la HDAC1 tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 5, de manera alternativa el fragmento de unión de la APPL comprende la ID. DE SEC. N.º: 7. En otra realización, el fragmento de unión de la APPL consiste en la ID. DE SEC. N.º: 7 o comprende la secuencia de consenso, según se han definido anteriormente en la presente.

Los ejemplos de los posibles ensayos de unión son el ensayo de inmunoprecipitación, tal como se provee en los ejemplos mencionados más adelante en este documento, o el uso de un efecto de resonancia del plasmón superficial aprovechado por el instrumento Biacore (Malmqvist M., Biochem Soc Trans. 1999 Feb;27(2):335-40). En el último, la versión FLAG-tagged o His-tagged de los polipéptidos de la presente invención podría unirse al chip biosensor de un Biacore y unirse a la contrapartida de unión examinada en presencia y ausencia de compuestos para identificar los competidores del sitio de unión. Por ejemplo, en una realización, el fragmento de APPL que se une a la HDAC o sus homólogos, según se han definido anteriormente en la presente, se inmovilizaría en un chip Biacore que utiliza una Flag tag y la unión de la HDAC o sus fragmentos de unión a la APPL se examinarían en presencia y ausencia de compuestos para identificar los competidores del sitio de unión. De manera alternativa, el fragmento de la HDAC que se une a la APPL o sus homólogos, según se han definido anteriormente en la presente se inmovilizaría en un chip Biacore que utiliza una Flag tag y la unión de de APPL o el fragmento de unión de la HDAC de ella se examinaría en presencia y ausencia de compuestos para identificar los competidores del sitio de unión.

El etiquetado (*Tagging*) de los polipéptidos de acuerdo con la invención, también es útil para inmovilizar dichas moléculas en ensayos de unión con filtros convencionales (por ejemplo, usando el equipo de ensayos con filtros de Brandel) o en ensayos del tipo proximidad por centelleo de alta productividad (tecnología SPA y Cytostar-T flashplate; Amersham Pharmacia Biotech) para detectar la unión del ligando radiomarcado y el desplazamiento de dichos radioligandos por los competidores para el sitio de unión. La radioactividad puede medirse con un Packard Topcount o instrumentación similar, capaz de realizar mediciones rápidas con formatos de 96, 384, 1536 pocillos de microtitulación. La tecnología SPA/Cytostar-T es particularmente adaptable a la detección de alta productividad y por tanto, esta tecnología es adecuada para usar como un análisis de detección para los compuestos capaces de desplazar los ligandos estándar.

Asimismo, estos métodos de detección pueden comprobar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por la activación o inhibición de la enzima, utilizando sistemas de detección apropiados para la actividad enzimática de dicha enzima. La actividad enzimática generalmente se evalúa usando un sustrato apropiado que en el procesamiento, provee una señal mensurable. Los ensayos para medir la actividad/activación de las HDAC son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, entre otros a la histona acetilada marcada con radioactivos o marcada con fluorescente como un sustrato y medir la liberación del grupo acetilo marcado, tales como por ejemplo, los que se proveen en el ejemplo 4 mencionado más en adelante en este documento.

Por tanto, la presente invención provee un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de modular la actividad de las HDAC que comprende lo siguiente:

- a) incubar la HDAC o sus fragmentos funcionales con dicho compuesto de prueba;
- b) medir el efecto del compuesto de prueba en la actividad de la enzima de la HDAC y
- c) comparar este efecto con la actividad de la enzima de la HDAC cuando se une con la APPL o las proteínas relacionadas con la APPL.

5 La enzima de la HDAC se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente:

- a) HDAC1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 5;
- b) el dominio de histona deacetilasa de la HDAC1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 6.

10 El efecto del compuesto de prueba sobre la enzima de la HDAC se evalúa típicamente usando una histona acetilada marcada con radioactivos o marcada con fluorescente como sustrato y medir la liberación del grupo acetilo marcado. En particular, se evalúa usando el péptido histona H4 acetilada marcada con radioactivos, como se provee en el ejemplo 4 mencionado más adelante en este documento.

El experto apreciará fácilmente que el descubrimiento de la interacción de la APPL o las proteínas relacionadas con la APPL con HDAC también se puede usar en un método para el diseño racional o basado en la estructura de un agonista o antagonista de la HDAC:

- 15 a) sondear la estructura del sitio de unión en la HDAC con APPL o derivados de la APPL;
- b) identificar los átomos de contacto en el sitio de unión de la proteína de la HDAC que interactúan con el ligando de la APPL durante la unión;
- c) diseñar compuestos de prueba que interactúen con los átomos identificados en (b) para modular la actividad de la enzima de la HDAC y
- 20 d) poner en contacto dicho compuesto de prueba diseñado con una HDAC o un fragmento funcional de ella, para medir la capacidad de dicho compuesto a fin de modular actividad de la HDAC.

Se apreciará asimismo que este será normalmente un proceso reiterativo.

La presente invención provee asimismo, un método para evaluar el potencial de un compuesto de prueba de interactuar con el sitio de unión de la APPL, donde dicho método comprende lo siguiente:

- 25 (a) utilizar técnicas de modelado molecular para formular una estructura tridimensional del sitio de unión de la APPL;
- (b) emplear medios informáticos para llevar a cabo una operación de adecuación entre el compuesto de prueba y la estructura tridimensional del sitio de unión de la APPL y
- (c) analizar los resultados de dicha operación de adecuación para cuantificar la asociación del compuesto de prueba con la estructura tridimensional del sitio de unión de la APPL.

30 Las técnicas de modelado molecular son conocidas en la técnica, lo cual incluye tanto hardware como software apropiados para crear y utilizar los modelos de los receptores y conformaciones enzimáticas.

Hay numerosos programas informáticos disponibles y adecuados para los procesos de de modelado por computadoras, construcción de modelos e identificar, seleccionar y evaluar por medios informáticos los potenciales compuestos que interactúan con el atpE en los métodos aquí descritos. Estos incluyen, por ejemplo: GRID (disponible por medio de Oxford University, Reino Unido), MCSS (disponible por medio de Accelrys, Inc., San Diego, CA), AUTODOCK (disponible por medio de Oxford Molecular Group), FLEX X (disponible por medio de Tripos, St. Louis. MO), DOCK (disponible por medio de University of California, San Francisco, CA), CAVEAT (disponible por medio de University of California, Berkeley), HOOK (disponible por medio de Accelrys, Inc., San Diego, CA) y sistemas de bases de datos en 3D, tales como MACCS-3D (disponible por medio de MDL Information Systems, San Leandro, CA), UNITY (disponible por medio de Tripos, St. Louis. MO) y CATALYST (disponible por medio de Accelrys, Inc., San Diego, CA). Las potenciales sustancias candidatas también se pueden diseñar por medios informáticos designados como "de novo", usando paquetes de software tales como LUDI (disponible por medio de Biosym Technologies, San Diego, CA), LEGEND (disponible por medio de Accelrys, Inc, San Diego, CA) y LEAPFROG (disponible por medio de Tripos, St. Louis. MO). La energía de deformación y la repulsión electrostática de los compuestos puede analizarse usando programas tales como GAUSSIAN 92, AMBER, QUANTA/CHARMM e INSIGHT II/DISCOVER. Estas técnicas de evaluación y modelado por computadoras pueden llevarse a cabo en cualquier hardware adecuado, incluso, por ejemplo, estaciones de trabajo de Silicon Graphics, Sun Microsystems y otras. Estas técnicas de modelado, así como los métodos, el hardware y los paquetes de software son representativos y no pretenden ser una lista completa. Otras técnicas de modelado conocidas en la técnica también pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. Véase, por ejemplo, N.C. Cohen, Molecular Modeling in

Drug Design, Academic Press (1996).

En una realización de la presente invención, la estructura tridimensional del sitio de unión de la APPL se genera usando las coordenadas atómicas de la proteína HDAC8 (Base de datos de proteínas 1W22) +/- la desviación de la media de la raíz cuadrada de los átomos de dichos aminoácidos de no más de 10Å, con preferencia, no más de 5 Å.

5 Uso terapéutico

En general, los agonistas o antagonistas pueden emplearse con fines terapéuticos y profilácticos, para tales enfermedades como se ha mencionado anteriormente. Los compuestos pueden identificarse a partir de una variedad de fuentes, por ejemplo, células, preparaciones sin células, bibliotecas químicas y mezclas de productos naturales. Tales agonistas o antagonistas identificados de esta manera pueden ser péptidos naturales o modificados, ligandos, 10 enzimas, etc., según sea el caso, del polipéptido receptor o pueden ser imitaciones estructurales o funcionales de los mismos (véase Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1 (2):Chapter 5 (1991)).

Por tanto, la presente invención se refiere al uso del fragmento de unión de la APPL o sus homólogos como un medicamento y para usar en el tratamiento para inhibir el crecimiento de los tumores. Los ejemplos de tumores que se pueden inhibir son, aunque no en forma taxativa, el cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma y incluso 15 cáncer de pulmón no microcítico), cánceres pancreáticos (por ejemplo, carcinoma pancreático, tales como, por ejemplo carcinoma pancreático exócrino), cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer prostático, incluso enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (AML, *acute myelogenous leukemia*)), cáncer folicular 20 de la tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS, *myelodysplastic syndrome*), tumores de origen mesenquimal (por ejemplo, fibrosarcomas y rhabdomiosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo, queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama avanzado), carcinoma renal, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico.

El fragmento de unión de la APPL consiste en la ID. DE SEC. N.º: 7.

Por tanto, la presente invención puede identificar un compuesto en un ensayo de acuerdo con la invención, en el que dicho compuesto es capaz de unir y/o modular la actividad enzimática de la HDAC y en el que dicho compuesto es un agonista o antagonista de la enzima, según se determina en cualquiera de los ensayos antes descritos. Dichos compuestos pueden usarse como un medicamento y pueden emplearse en el tratamiento de inhibir el crecimiento de tumores. Los ejemplos de los tumores que pueden ser inhibidos, son aunque no taxativamente, cáncer de pulmón 30 (por ejemplo, adenocarcinoma e incluso, cáncer de pulmón no microcítico), cánceres pancreáticos (por ejemplo, carcinoma pancreático, tales como, por ejemplo carcinoma pancreático exócrino), cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer prostático, incluso enfermedad avanzada, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (AML), cáncer folicular de la tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal (por ejemplo, fibrosarcomas y rhabdomiosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo, queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama avanzado), carcinoma renal, carcinoma de ovario, carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico. 35

Así, en otro aspecto, la presente invención provee un método para prevenir, tratar o mejora una afección médica relacionada con un trastorno de la actividad de la HDAC que comprende administrarle a un mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de proteínas relacionadas con la APPL y el fragmento de unión de la APPL, de manera opcional en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable, en una cantidad efectiva para modular la actividad enzimática de la HDAC. Tales portadores incluyen, aunque no taxativamente, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. Se contemplan envases y kits 40 farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes llenos de uno o más de los ingredientes de las composiciones antes citadas de la invención. Los polipéptidos y otros compuestos de la presente invención pueden emplearse solos o en forma conjunta con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos. 45

La composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo, a una vía sistémica u oral. Las formas preferidas de la administración sistémica incluyen: inyección, típicamente inyección intravenosa. Pueden usarse otras vías inyectables, tales como la subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Los medios alternativos para la administración sistémica incluyen la administración transmucosal y transdérmica utilizando penetrantes, tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si un polipéptido de la presente invención puede formularse en una formulación entérica o encapsulada, la administración oral también puede ser posible. La administración de estos compuestos también puede ser tópica y/o localizada, en forma de parches, bálsamos, 50 pastas, geles y similares.

El intervalo de dosificación requerido depende de la elección del péptido o de otros compuestos de la presente invención, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la afección del sujeto y del

5 criterio del médico tratante. Las dosificaciones adecuadas, no obstante ello, se ubican en el intervalo de 0,01 mg/kg a 300 mg/kg de peso corporal, en particular de 5 mg/kg a 150 mg/kg de peso corporal, más en particular todavía, de 2 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal. Sin embargo, se prevé que haya muchas variaciones en la dosificación necesaria, en vista de la variedad de los compuestos disponibles y las eficiencias diferentes de las diversas vías de administración. Por ejemplo, sería de esperar que la administración oral requiera mayores dosificaciones que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándar para la optimización, como se entiende bien en la técnica. Por lo general, el médico tratante determinará la cantidad de modulador de la HDAC a administrar como agente terapéutico para tratar el trastorno proliferativo de las células, tales como la aterosclerosis, la restenosis y el cáncer, en cada caso en particular.

10 La presente invención se comprenderá mejor por referencia a los detalles experimentales presentados a continuación, pero los expertos en la técnica se apreciarán fácilmente que estos son meramente ilustrativos de la invención, según se describe de manera más detallado en las reivindicaciones que se presentan más adelante. De manera adicional, en toda esta solicitud, se citan diversas publicaciones. La descripción de estas publicaciones se incorpora en este documento por referencia, para describir de manera más detallada el estado de la técnica al cual pertenece la presente invención.

Ejemplo 1: identificación de la APPL como una proteína de unión de la HDAC1 novedosa

20 Para identificar las proteínas novedosas asociadas con la HDAC1, se llevó a cabo un análisis de dos híbridos de levaduras usando la HDAC1 de extensión completa como cebo contra una biblioteca de ADNc de cerebro humano. Esto dio como resultado la identificación de una proteína que contenía el fragmento de un dominio de PTB (aa 489-639), descrita previamente como APPL⁷ o DIP13 α ⁸, una proteína adaptadora que puede ejercer una función importante en la señalización celular. El fragmento identificado (aa 489-639) de la APPL se superpuso completamente con el dominio de PTB de APPL (aa 500-634) y se denominará en adelante APPL-PTB.

Ejemplo 2: interacción de la HDAC1 y la APPL

25 Para determinar si la interacción entre la HDAC1 y el fragmento de APPL (aminoácidos 489-639) también se producía en las células eucarióticas, se llevó a cabo una serie de ensayos de coimmunoprecipitación en las células HEK293. Tal como se muestra en la figura 1A, la APPL-PTB se coimmunoprecipitó con HDAC1 cuando ambas proteínas se sobreexpresaban (franja 4). Esta interacción es específica, dado que no se detectó complejo ante la ausencia de la sobreexpresión de la HDAC1 (figura 1A, franjas 2-4). La inmunoprecipitación inversa, es decir, de APPL-PTB también derivó en la coimmunoprecipitación de la HDAC1 (los datos no se muestran). El hecho de que el dominio de PTB de la APPL solo ya mostrara una coimmunoprecipitación eficiente con la HDAC1 indica que este dominio es suficiente para la interacción. Originalmente, se halló que los dominios de PTB interactuaban con motivos de NPXpY fosforilados, un motivo que no está presente en la HDAC1. Sin embargo, las recientes publicaciones indican que la unión de PTB no depende en gran medida del motivo NPXpY^{12,13}.

35 Posteriormente, confirmamos la interacción entre la HDAC1 y la proteína de APPL de extensión completa. El V5-APPL coimmunoprecipitó con la HDAC1-flag cuando estas dos proteínas se cotransfectaron (franja 4, figura 1B). En conclusión, podemos establecer que la HDAC1 sobreexpresada interactúa tanto con el dominio de PTB aislado de APPL, así como también, con la proteína de extensión completa. Es interesante que hasta la fecha, todas las proteínas descritas para unirse a la APPL, es decir, Akt2, DCC, FSHR y Rab5⁷⁻¹⁰ interactúan a través del dominio APPL PTB (unión de fosfotirosina). En consecuencia, alineamos todas las contrapartidas de unión APPL-PTB e identificamos una marcada secuencia de consenso, que está ubicada entre los residuos de aminoácidos 51 y 88 de la HDAC1 (figura 5) y que comprende la ID. DE SEC. N.º7. Es interesante que se identificara el mismo consenso en todas las HDAC de la clase I, incluso HDAC2, HDAC3 y HDAC8, pero no así en ninguno de los miembros de la familia de las clases II o de la clase III. El hecho de que numerosas proteínas de transducción de señales a la APPL señala un posible rol para la APPL, como proteína de andamio. Dado que el dominio de PTB de APPL participa en cada interacción, esto sugiere que diferentes contrapartidas de unión pueden competir entre sí. Descubrimos que la sobreexpresión de Akt2 bloqueaba la coimmunoprecipitación de APPL con HDAC1 (datos no mostrados), lo cual indica que la HDAC1 y Akt2 compiten para unirse a la APPL.

Ejemplo 3: colocalización de la HDAC1 y APPL endógenas

50 Para determinar si la APPL y HDAC1 endógenas interactúan, hemos investigado la localización de la APPL y HDAC1 en las células MDA-MB-231 de carcinoma de mama y en las células A2780 de carcinoma de ovario, usando inmunocitoquímica. La figura 2 muestra la colocalización de la HDAC1 y APPL en células durante la interfase. La tinción de la APPL muestra una estructura granular, que está presente predominantemente en el citoplasma, que previamente fue descrito también por Testa et al⁷. Una pequeña proporción de las vesículas de APPL, no obstante, se localiza en el núcleo, donde se superponen con la HDAC1. El análisis confocal 3D de la colocalización de las señales de APPL y HDAC1 endógenas mostró una clara superposición de APPL y HDAC1 dentro del núcleo (figura 2, gráficos de intensidad de píxeles). Esto muestra que las proteínas por cierto tienen la posibilidad de interactuar en las células inactivas. Para evaluar cómo pueden interactuar estas dos proteínas durante el avance del ciclo celular,

evaluamos la localización de la APPL y HDAC1 en las células en la mitosis (Figura 6). Durante la metafase, la HDAC1 se reorganiza alrededor de los cromosomas, mientras que la APPL está presente de manera más difusa. En anafase, la HDAC1 todavía está presente alrededor de los cromosomas. Lo más interesante es que durante esta etapa particular de la mitosis, la APPL parece localizarse predominantemente en el mismo lugar que la HDAC1: entre las cromátidas hermanas que se están separando, según resulta evidente a partir de una región amarilla dominante. En estadios posteriores, tanto la APPL como la HDAC1 se expresan de manera más difusa. Durante la última telofase y citoquinesis, la APPL y la HDAC1 se redistribuyen. La HDAC1 solo está presente en esta etapa en el núcleo, mientras que la APPL está presente predominantemente en el citoplasma, de modo que no podría detectarse ninguna superposición durante la telofase tardía y la citoquinesis. Los experimentos de colocalización en las células de MDA-MB-231 demostraron resultados comparables; la APPL tiene una estructura más granular, y parece haber más APPL en el núcleo de las células MDA-MB-231 durante la interfase que en las células A2780. En las células A2780, parece haber más HDAC1 presente en el citoplasma. El hecho de que en condiciones subestimuladas en las células en la interfase solo una fracción menor de la APPL se colocaliza con la HDAC1 puede explicar por qué los experimentos de coimmunoprecipitación y actividad de la HDAC1 fueron técnicamente desafiantes y dependieron del grado de sobreexpresión de APPL. Lo más interesante es que, Miaczynska et al. (2004)⁹ demostró que la APPL se transloca al núcleo en la estimulación de EGF en las células HeLa, lo cual sugiere que después de la activación de la vía de señalización de EGF, pueden interactuar mayores cantidades de APPL y HDAC1. En conclusión, podemos establecer que la APPL y HDAC1 se colocalizan claramente, enfatizando una relevancia fisiológica para la interacción observada.

Ejemplo 4: la APPL aumenta la actividad de la HDAC1 en las células HEK293 humanas

Como la HDAC1 y la APPL interactúan directamente en las células HEK293, nos preguntamos si la APPL tenía efecto en la actividad de la HDAC1. Ambas proteínas se sobreexpresaban igualmente en las células HEK293 (figura 3B). Después de 48 horas de sobreexpresión, las células se lisaron, la HDAC1 se inmunoprecipitó y la actividad se evaluó determinando la liberación de ácido acético a partir de un péptido de la Histona H4 marcada con [³H]acetilo. Notablemente, en presencia de la APPL sobreexpresada, la actividad de la HDAC1 aumentó aproximadamente 4 veces (figura 3A, condiciones comparativas 2 y 4), pese a que se inmunoprecipitaron cantidades iguales de la HDAC1 (figura 3B, panel superior). Estos resultados indican que la APPL es un regulador novedoso de la actividad enzimática de la HDAC1. No obstante, todavía no queda claro de qué manera la actividad de la HDAC1 aumenta por la APPL. Sobre la base de los mecanismos regulatorios conocidos de la actividad de la HDAC, esto puede implicar ya sea la estabilización del complejo HDAC-NuRD núcleo y/o el potenciamiento de las modificaciones post-traducción de la HDAC1.

Ejemplo 5: la APPL sobreexpresada reduce los niveles de acetilación de la histona H3 en las Células HEK293

Para validar aún más nuestra hipótesis de que la APPL aumenta la actividad de la HDAC1, se determinó el estado de acetilación de la histona H3. Teorizamos que si la APPL tuviera un efecto sobre la actividad de la HDAC1, los niveles de acetilación de la histona H3 deberían reducirse después de la sobreexpresión de la APPL. Por tanto, las células HEK293 se transfectaron con APPL y después de 48 horas, las células se enriquecieron para la población transfectada usando el sistema de selección pMACS (véanse los procedimientos experimentales). Se prepararon extractos de proteínas totales y analizaron por *Western blot*. Después de 48 horas de sobreexpresión de APPL, pudo detectarse una clara reducción en el estado de acetilación de la histona H3, en comparación con el control simulado (figura 4, comparación de las franjas 2 y 4), en tanto que el nivel de proteína H3 total permaneció igual en todas las franjas. También, como se esperaba, la sobreexpresión de la HDAC1 da como resultado una reducción de la acetilación de H3, indicando que la cantidad de actividad endógena de la HDAC1 presente es limitativa de la velocidad. La presencia de ambas proteínas sobreexpresadas no redujo aún más los niveles de acetilación de H3 (Figura 4A, franjas 5), pero cabe destacar que la acetilación de H3 ya se había suprimido con HDAC1 o APPL solo en este experimento (figura 5A, franjas 3 y 4). Este resultado muestra que la APPL reduce el estado de acetilación de la histona H3, que está en línea con una mayor actividad de la HDAC1.

Ejemplo 6: la APPL sobreexpresada reduce los niveles de las proteínas p21^{waf1,cip1} en las células HEK293

La actividad de la HDAC1 es crucial para mantener bajos niveles de expresión del inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina p21^{waf1,cip1}. El promotor de p21^{waf1,cip1} contiene varios sitios de unión Sp1, a través de los cuales la HDAC1 puede reclutarse. Hemos teorizado que si la APPL aumenta específicamente la actividad de la HDAC1 y reduce el estado de acetilación de H3, los niveles de la proteína de p21^{waf1,cip1} deberían caer ante la sobreexpresión de la APPL. Una vez más, las células HEK293 se transfectaron con HDAC1 y/o APPL durante 48 horas. Se prepararon extractos de proteína total y se analizaron con Western blot. Cuando la APPL se sobreexpresó, pudo detectarse una supresión casi completa en los niveles de proteína de p21^{waf1,cip1}, en comparación con el control (figura 4B, comparar las franjas 1 y 3). Este efecto es específico para p21^{waf1,cip1}, puesto que no pudo detectarse efecto alguno en p16, otro inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina. Para confirmar que la regulación a la baja observada mediada por la APPL de p21^{waf1,cip1} depende de la actividad endógena de la HDAC1, utilizamos un mutante de la HDAC1 (HDAC1-H141A). En este mutante, la histidina 141 se reemplaza por un residuo de alanina y esto muestra una reducción del 50 % en la actividad enzimática (Hassig et al., PNAS 95; 3519-3524 1998). Sin

embargo, la HDAC1-H141A, todavía tiene la capacidad de formar el complejo de remodelado de la cromatina Sin3A. Tal como se ilustra en la figura 4B, la coexpresión del mutante H141A invierte parcialmente la supresión de p21^{waf1,cip1} por APPL (comparar las franjas 4 y 6), lo cual demuestra una función clave para la HDAC1 en la supresión mediada por APPL de p21^{waf1,cip1}.

5 Conclusión

En este análisis, hemos identificado a la APPL (proteína adaptadora que contiene el dominio PH, el dominio de PTB, y el motivo de cremallera de la leucina) como un novedoso factor de interacción de la HDAC1. La APPL, también conocida como DIP13α, significa “proteína adaptadora que contiene un dominio de PH, un dominio de PTB y el motivo de cremallera de la leucina”⁷⁻¹⁰. Pese a que la APPL se describió originalmente como una proteína citoplásmica⁷, recientemente se la ha descrito como que se transloca al núcleo ante la estimulación con EGF⁹, donde interactúa temporalmente con el complejo NuRD/Mi2. Hay varias indicaciones de que la APPL desempeña un rol importante en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. En primer lugar, la APPL ha demostrado interactuar con el oncogén Akt2⁷. En segundo lugar, se describió que interactúa con la proteína pro-apoptósica DCC (eliminado en el cáncer colorrectal). La sobreexpresión de APPL aumenta la muerte de las células inducidas por DCC⁸. En tercer lugar, Miaczynska et al. demostraron recientemente que la manipulación de la APPL usando siRNA tiene efectos inhibitorios on la síntesis de ADN⁹. Pese a que la APPL claramente afecta el avance del ciclo celular, el mecanismo por el cual se produce actualmente se desconoce.

En este documento demostramos que la APPL es un novedoso factor de interacción directo de la HDAC1 y un factor clave en la regulación de su actividad enzimática. La sobreexpresión de APPL da como resultado un aumento de la actividad de la HDAC1 y un posterior estado de menor acetilación de la histona H3. Por otra parte, la sobreexpresión de APPL reduce el nivel de la proteína basal de p21^{waf1,cip1}, un importante regulador de punto de control del ciclo celular G1, cuyos niveles de expresión dependen estrictamente de la actividad de la HDAC1.

En resumen, hemos descubierto que la APPL potencia la actividad de la HDAC1 y modula las funciones a la baja de la HDAC1. Como la actividad de la HDAC1 es crucial para la proliferación celular del tumor, esto ilustra un rol oncogénico y/o pro-proliferativo para la APPL. Lo más interesante es que, Miaczynska et al. (2004)⁹ demostraron que con los experimentos de siRNA, después de la manipulación de APPL en las células HeLa, existe una clara reducción del porcentaje de células en la S-fase después de 48 horas. En conclusión, nuestros datos indican que la APPL interactúa directamente con la HDAC1 y que la sobreexpresión de APPL reduce la acetilación de la histona H3 y los niveles de la proteína de p21^{waf1,cip1} y aumenta la actividad enzimática de la HDAC1. Nuestros hallazgos indican que la APPL es importante para regular la actividad del oncogén HDAC1, señalando un rol clave para la APPL en la proliferación celular del tumor.

Referencias

1. Arts,J., de Schepper,S. & Van Emelen,K. Histone deacetylase inhibitors: from chromatin remodeling to experimental cancer therapeutics. *Curr.Med Chem.* 10, 2343-2350 (2003).
2. Lagger,G. et al. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 21, 2672-2681 (2002).
3. Sengupta,N. & Seto,E. Regulation of histone deacetylase activities. *J. Cell Biochem.*93, 57-67 (2004).
4. Pflum,M.K., Tong,J.K., Lane,W.S. & Schreiber,S.L. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J. Biol. Chem.* 276,47733-47741 (2001).
5. Zhou,Q. et al. Rapid induction of histone hyperacetylation and cellular differentiation in human breast tumor cell lines following degradation of histone deacetylase-1. *J. Biol. Chem.* 275, 35256-35263 (2000).
6. David,G., Neptune,M.A. & DePinho,R.A. SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol. Chem.* 277, 23658-23663 (2002).
7. Mitsuuchi,Y. et al. Identification of a chromosome 3p 14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2. *Oncogene* 18, 4891-4898 (1999).
8. Liu,J. et al. Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP 13 alpha. *J Biol. Chem.* 277, 26281-26285 (2002).
9. Miaczynska,M. et al. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 116, 445-456 (2004).
10. Nechamen,C.A. et al. Human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor interacts with the adaptor protein APPL1 in HEK 293 cells: potential involvement of the PI3K pathway in FSH signaling. *Biol. Reprod.*71, 629-636 (2004).

11. Lager, G. et al. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol. Cell Biol.* 23, 2669-2679 (2003).

12. Yan, K.S., Kuti, M. & Zhou, M.M. PTB or not PTB -- that is the question. *FEBS Lett.* 513, 67-70 (2002).

5 13. Guy, G.R., Yusoff, P., Bangarusamy, D., Fong, C.W. & Wong, E.S. Dockers at the crossroads. *Cell Signal.* 14, 11-20 (2002).

14. Fu, C.A. et al. TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *J Biol. Chem.* 274, 30729-30737 (1999).

15. Van, d.W., I et al. Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett.* 478, 77-83 (2000).

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Janssen Pharmaceutica N.V.
- <120> Ensayos de regulación de la HDAC, compuestos y composiciones terapéuticas
- <130> PRD2483

- <150> EP05104907.0
- < 151> 2005-06-06

- <150> EP05110148.3
- < 151> 2005-10-28

- <160> 7

- <170> PatentIn versión 3.1

- <210> 1
- < 211> 3042
- < 212> ADN

- < 213> homo sapiens

- <220>
- < 221> CDS
- < 222> (57)..(2186)

- < 223>
- <220>
- < 221> misc_feature
- < 222> (1554) .. (1958)
- < 223> Dominio de PTB / fragmento de unión de la HDAC

- <400> 1

```

cgcggggagc tgtgggcggc agctgcgtct cctgccactg cctcctctcc gccacgatgc      60
cggggatcga caagctgccc atcgaggaga cgctggagga cagcccgcag acaaggtctt      120
tactaggtgt atttgaagaa gatgccacag ctatttccaa ctatatgaac cagttgtatc      180
aagctatgca tcggatttat gatgcacaga atgaattaag tgcagcaaca cacctgacct      240

```

ES 2 607 455 T3

caaaactttt aaaagaatat gaaaaacagc gttttccatt gggaggtgat gatgaagtta	300
tgagctctac attgcaacag ttttcaaaag ttatagatga gcttagctct tgatcatgcag	360
tgctttcaac tcaacttgyct gatgccatga tgyttcccat taccagttt aaagaaagag	420
atctgaaaga aatactaaca ttaaaggaag tatttcagat tgcaagtaat gatcatgatg	480
ctgcgattaa tagatatagc cgtttatcaa aaaaaagaga aaatgacaag gtgaagtatg	540
aagtaacaga agatgtgtac acatccagaa agaaacaaca ccagaccatg atgcattatt	600
tttgtgcatt aaatactctt cagtacaaga agaaaatagc attgttagaa cctctacttg	660
ggtacatgca agctcagata agtttcttta agatgggttc tgaaaatctt aatgaacaac	720
tggaagaatt tttagctaatt attggaacaa gcgttcagaa tgyttcgagg gaaatggaca	780
gtgatataga gaccatgcaa cagacaatag aggatttga agtagccagt gatcccttat	840
atgtgectga cccagacccc accaaatttc ctgttaatcg aaatttaacc cgaaggtcg	900
gataccttaa tgctaggaat aaaacaggct tgytgcctc tacctgggac agacagtttt	960
acttcacgca ggytggaat ttaatgagtc aggccctggy ggatgtagca ggaggcctgg	1020
ccatggacat agacaactgt tcagtgtggy ctgtggactg tgaagacaga cgatattgtt	1080
ttcagatcac ctctttcgat ggaaaaaat ctcaatttt gcaagcagag agtaaaaaag	1140
atcatgaaga gtggactctgt acaataaaca acatatctaa acaaatatac ttaagtgaaa	1200
atccagagga aactgctyca cgagtaaatc aatcagctct ggaagctgct actccttccc	1260
catctttcca gcagaggcac gagagcctgc ggcacagcgc aggacaatct cggccaccga	1320
cagctcgaac cagcagttca ggatccttag gatctgagtc tacaattttg gctgccctct	1380
ctctagattc tcttgttgcc ccagacacc caatacagtt tgacataatt tctcctgtgt	1440
gtgaagatca gcctggccag gcaaaagcct ttggccaggy aggcagcgt acaaatccat	1500
ttggagaatc tggaggaagt acaaatctg aaactgaaga ttctattctt catcagttat	1560
ttattgtccg attccttgyt tcaatggagg tgaatcaga tgaccatcca gatgttgttt	1620
atgaaactat gcgccaaatc ttagctgcc gggccatcca taacatcttt cgtatgacag	1680
aatcgcttt attagtcact tgtgactggt taaagttaat tgatccacag acacaagtta	1740
caaggctcac gtttcatta ccttgtgtag ttttgtatgc tacacaccag gaaaataagc	1800
gccttttttg atttgttctt cggacatcaa ggggagaag tgaagtaat ctgtcatcag	1860
tctgctatat atttgagtca aacaatgagg gggaaaagat atgtgatctt gttggactgy	1920
caaaacagat agctttgcat gctgaaactgy atcgtagggc atcagaaaaa caaaaagaaa	1980
tagagagagt aaaagagaag caacagaaag aactcaataa acaaaaacag attgaaaagg	2040
acttggaga acaaaagtcgy ttgatagctg ctccagtag accaaacca gccagtagty	2100
aggggcagtt tgytgcctt agcagtagcc agtcagaaga gagtgatttg ggagaaggag	2160
gaaagaagag agaatcagaa gcataagctt atacttttgy taaatattcc cccttggat	2220
ttgacagttt ctatggtgaa atggcagaag glaacaacta tgytgaata tcaaggagga	2280
gattaagctt tataattgoc taattgttgy agctacattt taaaaaaag attgaacttg	2340
atgacttaag tttgcattga tcttttccc ccttaacat aatgtactat gtattaacat	2400
cctaaaggya acctgctcat ctccctgaag cagactgctg aagaaatata tttgctcaag	2460
aatttttccg tcaaatgtt gaacttttaa tctctgcaat tgytaattggy tgytccata	2520

ES 2 607 455 T3

```

ggaatcattt attcttcagg cttagacatt catggatag cttttctttc attaggaaca 2580
ttttgctggg gatgaggaag ctttagctg aataagtta aagccctta taccygaatt 2640
ctacaagttt gcaaatattt taacaatatt aaatgtgcaa tagaactttt ttaaaataat 2700
tggaacggga ttttacagtt aaggtttcaa attgtggcag gtggtactgt tgatctcagg 2760
gtactttctg ggattgctca cttttctcta atgtactgca cttgatgcca gtcggaaaga 2820
agcttaagtg tcttcagttc aagattgata gagcccttgg cattttatta tcacattctt 2880
agttctcagg ttgggacttc aattactgct gcagagcogt agtggttaaa aataagatat 2940
tggaatttat taaaagattt ttgttcaata catttttagat taggattgac aagtaaagat 3000
actgctatgy aatgtaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 3042

```

<210> 2
 <211> 709
 <212> PRT

<213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (500)..(635)
 <223> Dominio de PTB / fragmento de unión de la HDAC

<400> 2

```

MPGIDKLPTE ETLEDSPQTR SLIGVFEEDA TAISNYMNQL YQAMHRIYDA QNELSAATHL 60
TSKLLKEYEK QRFPGLGDEE VMSSTLQQFS KVIDELSSCH AVLSTQLADA MFPITQPKK 120
RDLKEILTLK EVFQIASNDH DAAINRYSRL SKKRENDKVK YEVTEDVYTS RKKQHQTMMH 180
YFCALNTLQY KKKIALLEPL LGYMQAQISF FKMSENLENE QLEEFANIG TSVQNVRRER 240
DSDIETMQQT IEDLEVASDP LYVDPDPPTK FVNRNLTRK AGYLNARNKT GLVSSTWDRQ 300
FYFTQGGNLM SQARGDVAGG LAMIDNCSV MAVDCEDRRY CFQITSPDCK KSSILQAESK 360
KDHEEWICTI NNISKQIYLS ENPEETAARV NQSALEAVTP SPSFQQRHES LRPAAGQSRP 420
PTARTSSSGS LGSESTNLAA LSLDSLVAPE TPIQFDIISP VCEQPQGAQ AFGQGGRRTN 480
PFGBSGGSTK SETEDSILHQ LFIVRFLGSM EVKSDDHPDV VYETMRQILA ARAIHNIFRM 540
TESHLLVTCF CLKLIDPQTQ VTRLTFPLPC VVLYATHQEN KRLFGFVLRV SSGRSESNLS 600
SVCYIFESNN EGEKICDSVG LAKQIALHAE LDRRASEKQK EIERVKEKQK KELNKQKQIE 660
KDLLEEQSRLI AASSRPNQAS SEQQFVVLSS SQSEESDLGE GKKRESEA 709

```

<210> 3
 <211> 135

ES 2 607 455 T3

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 3

```
QLFIVRFLGS MEVKSDDHPD VVYETMRQIL AARAIHNIFR MTESHLVTC DCLKLIDPQT    60
QVIRLTFFLP CVVLYATHQE NKRLFGFVLR TSSGRSESNL SSVCYIFESN NEGEKICDSV    120
GLAKQIALHA ELDRR                                                    135
```

<210> 4

< 211> 2120

< 212> ADN

< 213> homo sapiens

<220>

< 221> CDS

< 222> (85) .. (1533)

< 223>

<220>

< 221> misc-feature

< 222> (109)..(1047)

< 223> Dominio de histona deacetilasa

<220>

< 221> misc-feature

< 222> (235) .. (336)

< 223> Fragmento de unión de la APPL

<400> 4

```
ctccccctg ggtcggacgc tgagcggagc cgcgggucggg agggcggacg gaccgactga    60
cggtagggac gggaggcgag caagatggcg cagacgcagg gcaccocggag gaaagtctgt    120
tactactacg acggggatgt tggaaattac tattatggac aaggccacc aatgaagcct    180
cacogaatcc gcatgactca taatttgetg ctcaactatg gtctctaccg aaaaatggaa    240
atctatcgcc ctcaaaaage caatgctgag gagatgacca agtaccacag cgatgactac    300
attaaattct tgcgctccat cegtccagat aacatgtcgg agtacagcaa gcagatgcag    360
```


ES 2 607 455 T3

agattcaacg ttggtgagga ctgtccagta ttcgatggcc tgtttgagtt ctgtcagttg 420
 tctactggtg gttctgtggc aagtgctgtg aaacttaata agcagcagac ggacatcgct 480
 gtgaattggg ctgggggacct gcaccatgca aagaagtccg aggcactctgg cttctgttac 540
 gtcaatgata tctctctggc catcctggaa ctgctaaagt atcaccagag ggtgctgtac 600
 attgacattg atattcacca tgggtgacggc gtggaagagg ccttctacac cacggaccgg 660
 gtcactgactg tgtcctttca taagtatgga gactacttcc caggaactgg ggacctacgg 720
 gatatacggg ctggcaaagg caagtattat gctgttaact acccgctccg agacgggatt 780
 gatgacgagt cctatgaggg cattttcaag cgggtcatgt ccaaagtaat ggagatgttc 840
 cagcctagtg cgggtgtctt acagtgtggc tcagactccc tatctgggga tgggttaggt 900
 tgcttcaatc taactatcaa aggacacggc aagtgtgtgg aatttgtcaa gagctttaac 960
 ctgcctatgc tgatgctggg aggcgggtgt tacaccattc gtaacgttgc ccggtgctgg 1020
 acatatgaga cagctgtggc cctggatagc gagatcctca atgagcttcc atacaatgac 1080
 tactttgaat actttggacc agatttcaag ctccacatca gtccttccaa tatgactaac 1140
 cagaacacga atgagtacct ggagaagatc aaacagcgac tgtttgagaa ccttagaatg 1200
 ctgccgcacg cacctggggg ccaaatgcag gcgattcctg aggacgccat ccctgaggag 1260
 agtggcgatg aggacgaaga cgacctgac aagcgcatct cgatctgctc ctctgacaaa 1320
 cgaattgcct gtgaggaaga gttctccgat tctgaagagg agggagaggg gggccgcaag 1380
 aactcttcca acttcaaaaa agccaagaga gtcaaacag aggatgaaaa agagaaagac 1440
 ccagaggaga agaaagaagt caccgaagag gagaaaacca aggaggagaa gccagaagcc 1500
 aaaggggtca aggaggaggc caagtggcc tgaatggacc tctccagctc tggcttctctg 1560
 ctgagtccct cacttttctt ccccaacccc tcagatttta tattttctat ttctctgtgt 1620
 atttatataa aaatttatta aatataaata tccccagga cagaaaccaa ggccccgagc 1680
 tcagggcagc tgtgctgggt gagctcttcc aggagccacc ttgccaccca ttcttccctg 1740
 tcttaacttt gaaccataaa ggggtgccag tctgggtgaa agggatactt ttatgcaacc 1800
 ataagacaaa ctctgaaat gccaaagtgc tcttagtag ctttgaaag gtgcccttat 1860
 tgaacattct agaaggggtg gctgggtctt caaggatctc ctgttttttt caggctceta 1920
 aagtaacatc agccatttt agattgggtc tgtttctgta ccttcccact ggctcaagt 1980
 gagccaagaa acaactgcctg ccctctgtct gtcttctcct aattctgcag gtggagggtg 2040
 ctagtctagt ttcctttttg agatactatt ttcatttttg tgagcctctt tgtaataaaa 2100
 tggtacattt ctatatcctc 2120

<210> 5
 <211> 482
 <212> PRT

<213> homo sapiens

ES 2 607 455 T3

<400> 5

```

MAQTQGTTRK VCYYYDGDVG NYYYGQGHM KPHRIRMTHN LLLNYGLYRK MEIYRPHKAN      60
AEEMTKYHSD DYIKFLRSIR PDNMSEYSKQ MQRFNVEDC FVFDGLFEFC QLSTGGSVAS      120
AVKLNKQQTD IAVNWAGGLH HAKKSEASGF CYVNDIVLAI LELLKYHQRV LYIDIDIHHG      180
DGVVEAFYTT DRVMTVSFHK YGEYFPGTGD LRDIGAGK GK YYAVNYPLRD GIDDESYEAI      240
FKPVMSKVME MFQPSAVVLQ CGSDSLSGDR LGCFLNTIKG HAKCVEFVKS FNLPLMLGG      300
GGYTIRNVAR CWTYETAVAL DTEIPNELPY NDYFEYFGPD FKLHISPSNM TNQNTNEYLE      360
KIKQRLFENL RMLPHAPGVQ MQAIPEDAIP EESGDEDEDD PDKRISICSS DKRIACEEFP      420
SDSEEEGEGG RKNSSNPKKA KRVKTEDEKE KDPEEKKEVT EBEKTKKEKP EAKGVKKEVK      480
LA                                                                              482

```

<210> 6

< 211> 313

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 6

```

RKVCYYYDGD VGNYYGQGH PMKPHRIRMT HNLNLYGLY RKMEIYRPHK ANAEEMTKYH      60
SDDYIKFLRS IRPDNMSEYS KQMQRFNVEG DCPVFDGLFE FCQLSTGGSV ASAVKLNKQQ      120
TDIAVNWAGG LHHAKKSEAS GFCYVNDIVL AILELLKYHQ RVLVYIDIDIH HGDGVVEAFY      180
TTDRVMTVSF HKYGEYFPGT GDLRDIGAGK GKYYAVNYPL RDGIDDESYE AIFKPVMSKV      240
MEMFQPSAVV LQCGSDSLSG DRLGCFNLTI KGHAKCVEFV KSFNLPLMLL GCGGYTIRNV      300
ARCWTYETAV ALD                                                                313

```

<210> 7

< 211> 34

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 7

MEIYRPHKAN AEEMTKYHSD DYIKFLRSIR PDNM

34

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para el diseño racional o basado en la estructura de un agonista o antagonista de la HDAC, que utiliza la interacción de una proteína adaptadora que contiene un dominio de PH, un dominio de PTB y un motivo de cremallera de la leucina (APPL) o una proteína relacionada con la APPL con un enzima de histona deacetilasa (HDAC), donde dicho método comprende las siguientes etapas:
- a) sondear la estructura del sitio de unión del ligando en la HDAC con APPL o proteínas relacionadas con la APPL;
- b) identificar los átomos de contacto en el sitio de unión del ligando de la enzima de la HDAC que interactúa con el ligando de la APPL durante la unión;
- 10 c) diseñar compuestos de prueba que interactúen con los átomos identificados en (b) para modular la actividad de la enzima de la HDAC y
- d) poner en contacto dicho compuesto de prueba diseñado con HDAC o un fragmento funcional de ella, para medir la capacidad de dicho compuesto, a fin de modular la actividad de la HDAC,
- en el que la enzima de la HDAC es un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 5, ID. DE SEC. N.º: 6, o ID. DE SEC. N.º: 7, y en el que la APPL o la proteína relacionada con la APPL es un polipéptido aislado que comprende secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 2 o ID. DE SEC. N.º: 3.
- 15 2. Un fragmento de unión de la APPL aislado y purificado, que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 7.
3. Una molécula de ácido nucleico aislada y purificada, que codifica un fragmento de unión de la APPL codificado por los ácidos nucleicos 235 a 336 de la ID. DE SEC. N.º: 4.
- 20 4. Un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de unir una enzima de la HDAC que comprende lo siguiente:
- a) incubar una sustancia de origen que contiene una enzima de la HDAC, o uno de sus fragmentos, con lo siguiente:
- i) APPL o proteínas relacionadas con la APPL
- ii) dicho compuesto de prueba y
- 25 b) medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de APPL o proteínas relacionadas con la APPL unida a la enzima,
- en el que la enzima de la HDAC o un fragmento de ella es un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 5, ID. DE SEC. N.º: 6, o ID. DE SEC. N.º: 7, y en el que la APPL o una proteína relacionada con la APPL es un polipéptido aislado que comprende secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 2 o ID. DE SEC. N.º: 3.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que APPL o la proteína relacionada con la APPL están marcadas y en el que dicha etiqueta se utiliza para medir el efecto del compuesto de prueba en la cantidad de proteínas de la APPL unidas a la enzima.
- 35 6. Un método para identificar y obtener un compuesto de prueba capaz de modular la actividad de las HDAC que comprende lo siguiente:
- a) incubar una HDAC o sus fragmentos funcionales, con dicho compuesto de prueba;
- b) medir el efecto del compuesto de prueba en la actividad de la enzima de la HDAC y
- c) comparar este efecto con la actividad de la enzima de la HDAC ante la unión del ligando de la APPL o proteínas relacionadas con la APPL,
- 40 en el que la enzima de la HDAC o fragmento funcional de ella es un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 5, ID. DE SEC. N.º: 6, o ID. DE SEC. N.º: 7, y en el que el ligando de la APPL o proteína relacionada con la APPL es un polipéptido aislado que comprende secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 2 o ID. DE SEC. N.º: 3.
- 45 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el efecto del compuesto de prueba en la enzima de la HDAC se evalúa usando la histona acetilada marcada con radioactivos o marcada con fluorescente como sustrato y medir la liberación del grupo de acetilo marcado.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sustrato es un péptido de histona H4 acetilada marcada con radioactivos.
9. El fragmento de unión de la APPL que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID. DE SEC. N.º: 7 para usar como un medicamento.
- 5 10. El uso del fragmento de unión de la HDAC que comprende la ID. DE SEC. N.º: 3 en la fabricación de una composición para usar como un medicamento, en el tratamiento de las afecciones proliferativas, tales como el cáncer y la psoriasis, lo cual incluye, aunque sin limitación: cáncer de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma y incluso cáncer de pulmón no microcítico), cánceres pancreáticos (por ejemplo, carcinoma pancreático, tales como, por ejemplo carcinoma pancreático exócrino), cánceres de colon (por ejemplo, carcinomas colorrectales, tales como, por ejemplo, adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), cáncer prostático, incluso enfermedad avanzada,
- 10 tumores hematopoyéticos de linaje linfoide (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células B, linfoma de Burkitt), leucemias mieloides (por ejemplo, leucemia mielógena aguda (AML)), cáncer folicular de la tiroides, síndrome mielodisplásico (MDS), tumores de origen mesenquimal (por ejemplo, fibrosarcomas y rhabdomyosarcomas), melanomas, teratocarcinomas, neuroblastomas, gliomas, tumor benigno de la piel (por ejemplo, queratoacantomas), carcinoma de mama (por ejemplo, cáncer de mama avanzado), carcinoma renal, carcinoma de ovario,
- 15 carcinoma de vejiga y carcinoma epidérmico

Figura 1

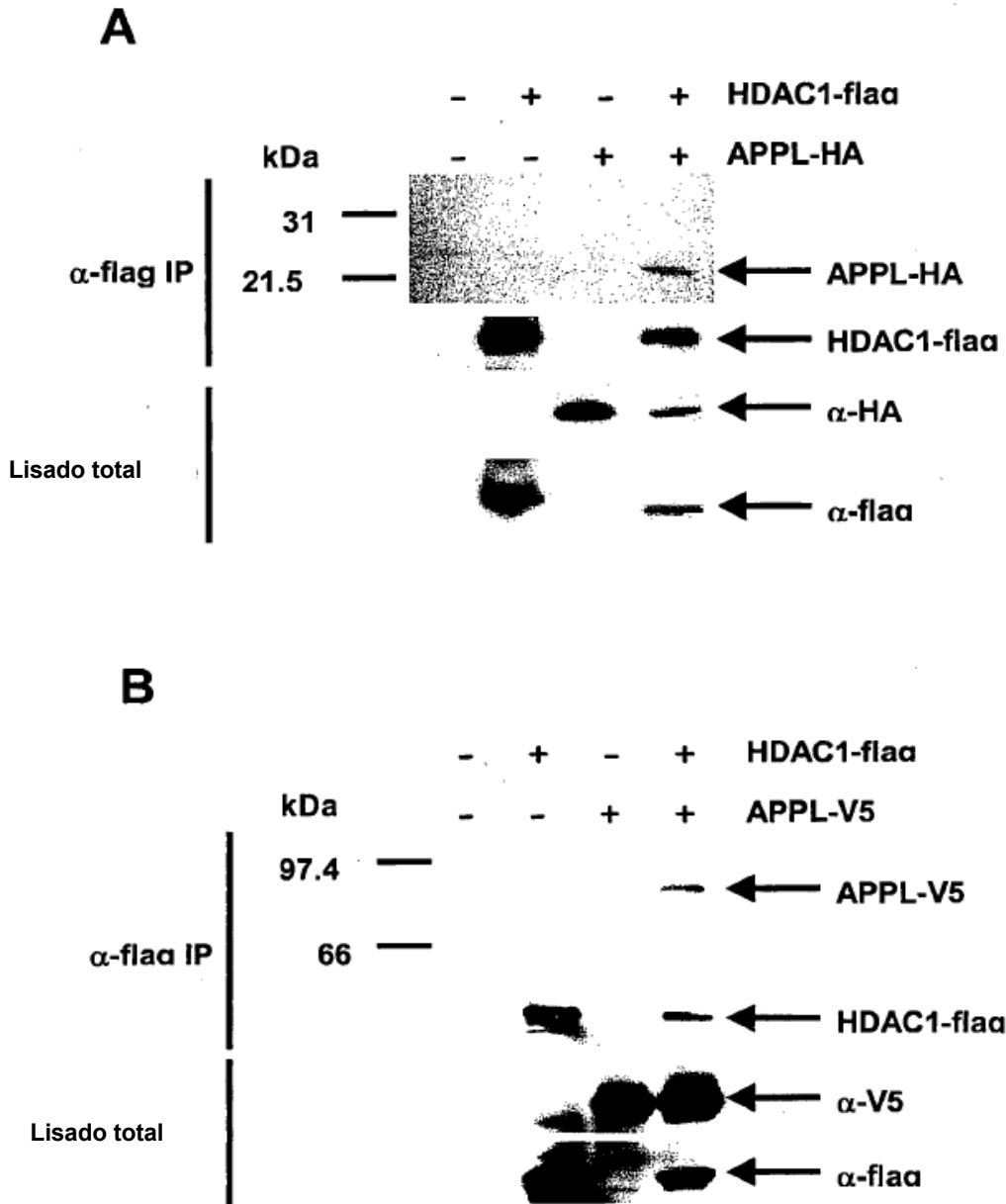


Figura 2

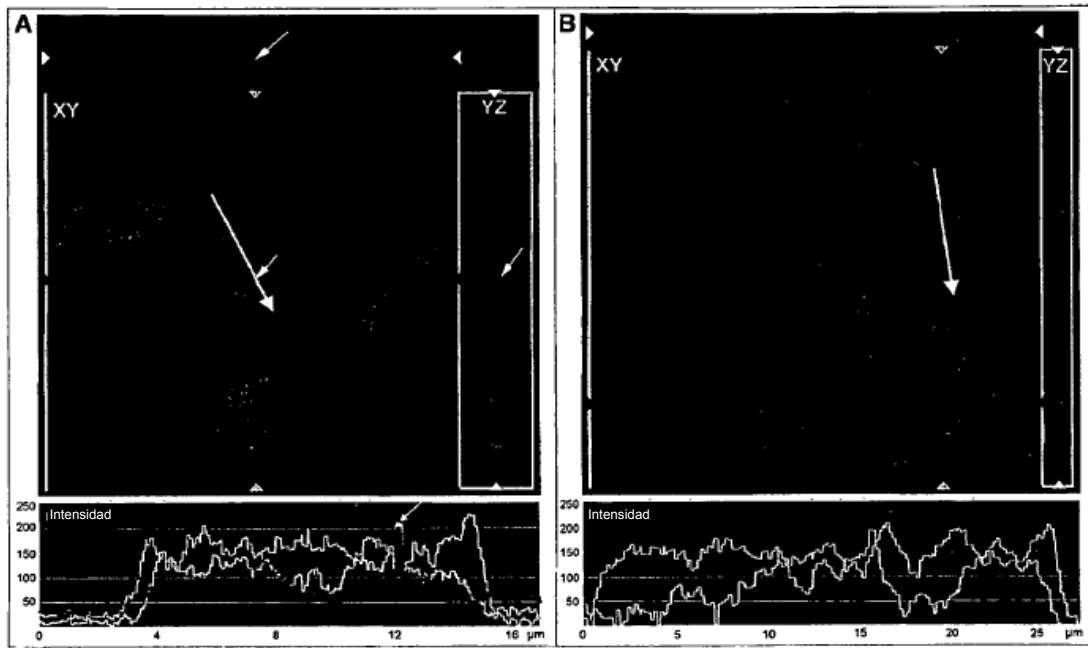
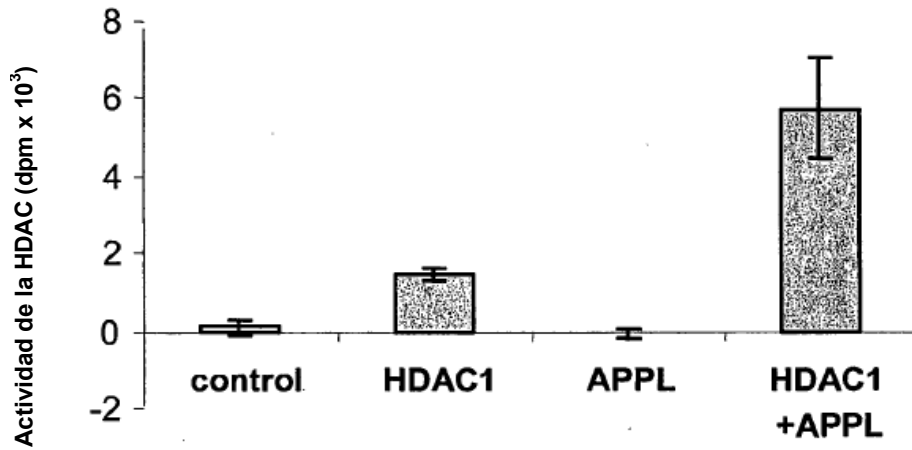


Figura 3

A



B

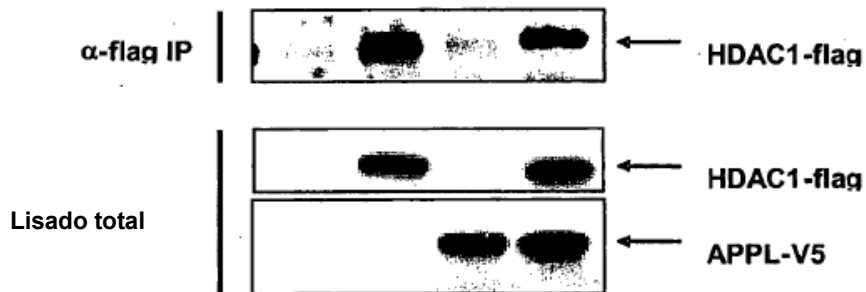


Figura 4

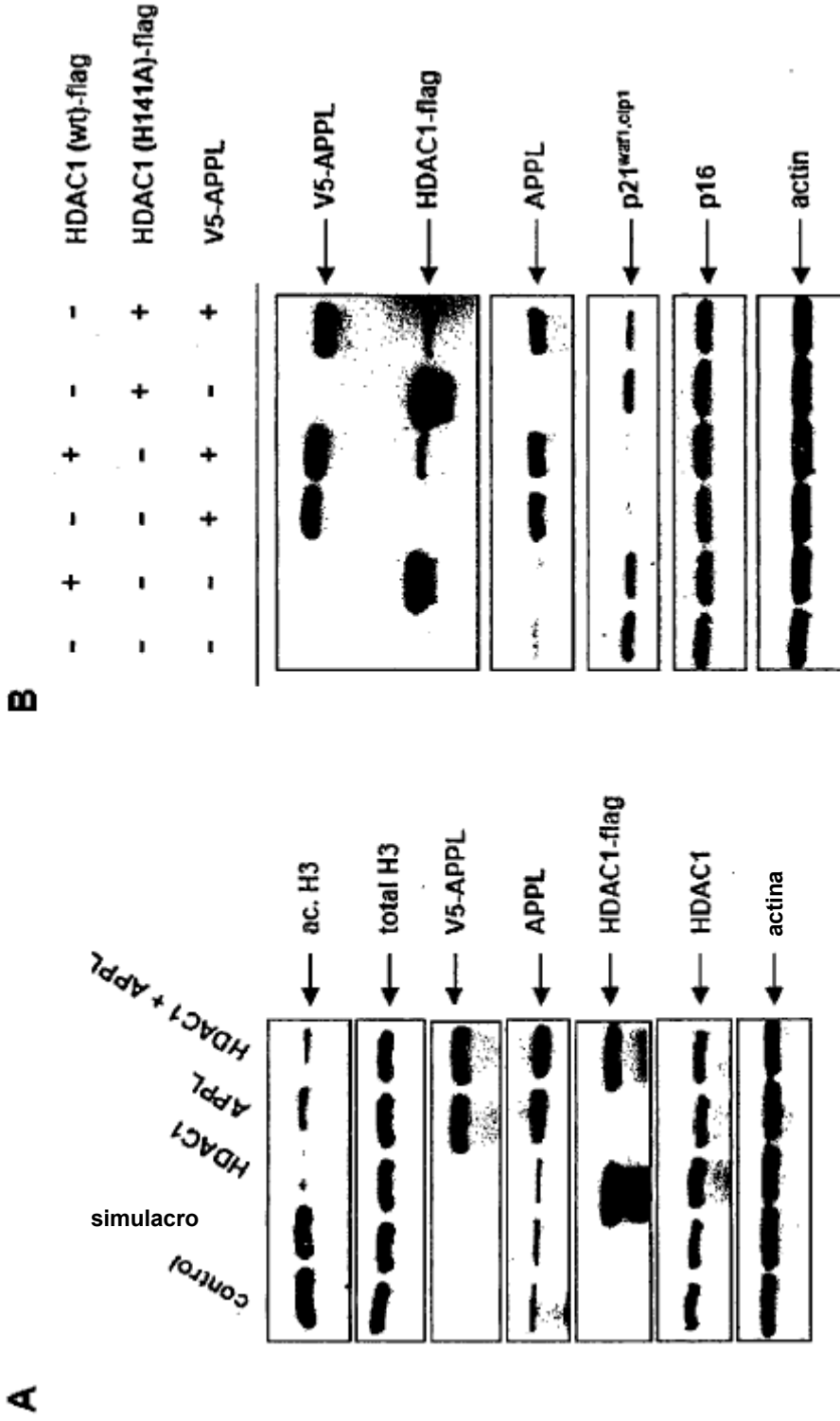


Figura 5

* 20 *

HDAC1 : MEIYRPHKANAEEMTKYHSDDYIKFLRSIRPDMSEYS : 38
 HDAC2 : MEIYRPHKATAEEMTKYHSDEYIKFLRSIRPDMSEYS : 38
 HDAC3 : MIVFKPYQASQHDMCRFHSEDYIDFLQRVSPPTNMQGFT : 38
 HDAC8 : MRIVKPKVASMEEMATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDDHP : 38

M 6 4P A eeM 5H3d Y6 fL 6 p nm

Figura 6

