



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 339 730**

② Número de solicitud: 200800295

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

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **04.02.2008**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**24.05.2010**

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

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

⑦ Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

⑤ Resumen:

Composiciones y métodos para inhibir la actividad de p300.

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

ES 2 339 730 A1

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para inhibir la actividad de p300.

5 **Campo técnico de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

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

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

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

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

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

55 **Compendio de la invención**

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

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

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

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

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

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

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

### Breve descripción de las figuras

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

Figura 2. La fosforilación de la Serina 384 por PKC- $\theta$ , representa un paso esencial en la activación transcripcional de p300. A, Células Jurkat wild-type se cotransfectaron de forma transitoria con el plásmido reportero GAL4-luc, y con las siguientes construcciones de GAL4-p300: GAL4-p300 (FL) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), y GAL4-p300 (192-703) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), como se ha descrito en Materiales y Métodos. Veinticuatro horas después de la transfección las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de PMA/Ion, los extractos celulares se procesaron y se midió la actividad luciferasa. Los extractos se normalizaron a la actividad luciferasa Renilla. Se muestran los valores de RLU/ $\mu$ g de proteína de tres experimentos independientes (mean  $\pm$  S.D.) B, Células Jurkat wild-type se transfectaron transitoriamente con los plásmidos de expresión GAL4-p300 (192-703) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A), como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las proteínas GAL4-p300 fueron inmunoprecipitadas con un anticuerpo específico para GAL4. C, PKC- $\theta$  se inmunoprecipitó a partir de extractos celulares de Jurkat wild-type. Los inmunoprecipitados GAL4-p300 (192-703) wild type (WT) y Serina 384 mutante Alanina (S384A) se usaron como sustrato para PKC- $\theta$  en ensayos quinaza *in vitro*. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% y se revelaron por autoradiografía. El análisis densitométrico muestra la relación entre p300- $^{32}$ P y PKC- $\theta$  inmunoprecipitada, de tres experimentos independientes (mean  $\pm$  S.D). D, Efecto de la sobreexpresión de PKC- $\theta$  en la activación transcripcional de p300. Células Jurkat-pcDNA (barras blancas) o Jurkat-A238L (barras grises) se transfectaron transitoriamente con el plásmido vacío pEFneo y los plásmidos de expresión pEF-KC- $\theta$  wild type (wt) o el mutante constitutivamente activo PKC- $\theta$  (pEF-PKC- $\theta$  A/E) (1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells), y con las construcciones GAL4-p300 full length (FL) o amino terminal (192-703), junto con el plásmido reportero GAL4-luc (250 ng/10<sup>6</sup> cells) como se describe en Materiales y Métodos. Después de la transfección las células se incubaron en ausencia (-) o presencia (+) de PMA/Ion, y se midió la actividad luciferasa. Los extractos se normalizaron a la actividad luciferasa Renilla. Se muestran los valores de RLU/ $\mu$ g de proteína de tres experimentos independientes (mean  $\pm$  S.D.) E, Células Jurkat-pcDNA y Jurkat-A238L se transfectaron de forma transitoria con GAL4-p300 (192-703) wild type (WT), como se describe en Materiales y Métodos. Veinticuatro horas después de la transfección las células se incubaron en ausencia (-) o presencia (+) de PMA/Ion durante 2 h, los extractos celulares se inmunoprecipitaron con 4  $\mu$ g de anticuerpo policlonal de conejo contra PKC- $\theta$ , o con IgG como control negativo. Los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot con el mismo anticuerpo ( $\alpha$ PKC- $\theta$ ) para determinar los niveles de quinaza en el precipitado, y con anti GAL4 ( $\alpha$ GAL4) para detectar los niveles de PKC asociada con GAL4-p300 (192-703). El análisis densitométrico muestra la relación entre PKC coimmunoprecipitada y p300 presente en el precipitado, de tres experimentos independientes (mean  $\pm$  S.D).

Figura 3. Células Jurkat wild-type se transfectaron de forma transitoria con los plásmidos de expresión GAL4-p300 full length (FL) y amino terminal (192-703), wild type (WT) y Serina 384 muñante Alanina (S384A), como se describe en Materiales y Métodos. Los extractos nucleares de  $10^7$  células Jurkat transfectadas y tratadas (+) o no (-) con PMA/Ion durante 4 h fueron inmunoprecipitados con  $4 \mu\text{g}$  de anticuerpo policlonal de conejo contra GAL4, o con IgG como control negativo. Los inmunoprecipitados se analizaron por Western blot con el mismo anticuerpo GAL4 para determinar los niveles de estas proteínas en el precipitado, y con un anticuerpo anti Usinas acetiladas ( $\alpha\text{Ac.Lys}$ ) para detectar p300 acetiladas, como se describe en Materiales y Métodos. El análisis densitométrico muestra las veces de inducción de las proteínas GAL4-p300 estimuladas respecto las condiciones basales, de tres experimentos independientes (mean  $\pm$  S.D).

### 10 Descripción detallada de la invención

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

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

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

### 30 Variantes inactivas de p300 de la invención

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

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

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

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

### 55 Variantes constitutivamente activadas de p300 de la invención

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

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

## ES 2 339 730 A1

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

5

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

### 10 *Polinucleótidos, construcciones génicas, vectores y células de la invención*

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

15

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

20

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

30

- promotores específicos de tejido gástrico tales como el promotor de la subunidad beta de la ATPasa H/K, el promotor K19, el promotor de metalotioneína, el promotor TFF1, el promotor TFF2 y el promotor FOXa/HNF2 gamma,

35

- promotores específicos de páncreas tales como el promotor de la elastasa, el promotor Pdx-1, el promotor de la insulina o el promotor de la fosfoglicerato quinasa,

40

- promotores específicos de pulmón tales como el promotor de la proteína secretora de células Clara o el promotor del surfactante C,

45

- promotores específicos de tejido mamario tal como el promotor del virus del tumor mamario de ratón o el promotor de la proteína ácida del suero,

- promotores específicos de piel como el promotor de queratina o el promotor K14,

- promotores específicos de esófago como el promotor de la proteína L2 de EBV,

50

- promotores específicos de hígado como el promotor de la proteína urinaria mayoritaria o el promotor de albúmina,

- promotores específicos de colon como el promotor de la villina o el promotor de FABP-TS4,

55

- promotores específicos de próstata como el promotor de la criptidina 2, el promotor del antígeno específico de próstata (PSA), el promotor de C(3)1 de la proteína secretora de próstata de 94 amino ácidos (PSP94) o el promotor de la probasina,

- promotores específicos de riñón tales como el promotor de la uromodulina, el promotor de la proteína Tamm-Horsfall o el promotor de la gamma-glutamyl transpeptidasa de tipo 1,

60

- promotores específicos de vejiga tales como el promotor de la uroplaquina o el promotor de la urohingina,

- promotores específicos de útero como el promotor de la uteroglobina.

65

En otro aspecto, la invención se relaciona con vectores que comprenden el polinucleótido de la invención o las construcciones génicas de la invención. Así, es posible el uso de vectores derivados de vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCRI, RP4,

## ES 2 339 730 A1

fagos y vectores “shuttle” tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) así como vectores no virales tales como pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTI.

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

### Usos médicos de las formas inactivas de p300

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

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

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

### Trastornos causados por una activación indeseada de p300, NF- $\kappa$ B, NF-AT y/o c-jun

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

En otro aspecto, los compuestos de la invención permiten el tratamiento de trastornos causados por una activación indeseada de NF- $\kappa$ B. Estos trastornos incluyen, entre otros, enfermedades causadas por la producción excesiva de mediadores inflamatorios y por la propagación viral, en particular, enfermedades causadas por la hiperproliferación de queratinocitos y/o de células T, en particular enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes tales como enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, anemia hemolítica, anemia perniciosa, aftas, estomatitis añosa, artritis, arterioesclerosis, osteoartritis, artritis reumatoide, aspermiogénesis, asma bronquial, asma autoinmune, hemolisis autoinmune, enfermedad de Bechet, enfermedad de Boeck, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma de Burkitt, enfermedad de Crohn, corioiditis, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, crioglobulinemia, dermatitis herpetiformis, dermatomiositis, diabetes dependiente de insulina, diabetes juvenil, enfermedades demie-

linantes autoinmunes, contractura de Dupuytren, encefalomieltis, encefalomielitis alérgica, endoftalmia, enteiritis alérgica, síndrome enteropatía autoinmune, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, síndrome de Graves, enfermedad de Harnman-Rich, enfermedad de Hashimoto, pérdida repentina de audición, hepatitis crónica, enfermedad de Hodgkin, hemo-  
 5 globinuria paroximástica, hipogonadismo, ileítis regionales, iritis, leucopenia, lupus eritematoso diseminado, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, linfogranuloma, mononucleosis infecciosa, miastenia gravis, mielitis transversa, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, pénfigo vulgar, poliartritis nodosa, poliartritis crónica, polimiositis, poliradiculitis aguda, psoriasis, purpura, pioderma gangrenoso, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerosis atáxica, esclerosis sistémica progresiva, escleritis, esclerodermia,  
 10 esclerosis múltiple, esclerosis diseminada, infertilidad debida a anticuerpos anti-espermatozoides, trombocitopenia, timoma, uveítis anterior aguda, vitíligo, enfermedades asociadas al SIDA, SCID y virus de Epstein Barr tales como el síndrome de Sjorgren, el linfoma de células B asociado a SIDA o a virus de Epstein-Barr, enfermedades parasitarias tales como leishmaniasis y estados inmunosuprimidos tales como infecciones virales tras trasplantes, SIDA, cáncer, hepatitis activa crónica, el rechazo de trasplante a consecuencia del trasplante de un tejido u órgano y la enfermedad de injerto contra huésped que puede resultar del trasplante de médula ósea o de células troncales.

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

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

#### 50 *Usos médicos de las formas constitutivamente activas de p300*

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

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

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

*Trastornos causados por una inhibición indeseada de NF-κB*

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

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

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

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

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



y cuello, cáncer rectal, astrocitoma, preferiblemente astrocitoma de grado II, III o IV, glioblastoma, preferiblemente glioblastoma multiforme, cáncer de células pequeñas, y cáncer de células no pequeñas, preferiblemente cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma metastático, cáncer de próstata metastático independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastático dependiente de andrógenos y cáncer de mama.

5

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

15

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

30

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

40

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

45

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

50

Las composiciones de la invención pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 ó 0.00001 mg por cada kg de peso corporal y menos de 200 nmol de agente ARN, es decir, en torno a  $4.4 \times 10^{16}$  copias por kg de peso corporal o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7.5, 1.5, 0.75, 0.15 ó 0.075 nmol por Kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica. Las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente en el órgano en el que se observe el defecto que se desea tratar en cuyo caso se administran dosis de entre 0.00001 mg a 3 mg por órgano, o preferiblemente entre 0.0001 y 0.001 mg por órgano, en torno a 0.03 y 3.0 mg por órgano, en torno a 0.1 y 3.0 mg por órgano o entre 0.3 y 3.0 mg por órgano.

60

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

65

## ES 2 339 730 A1

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

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

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

20 (i) poner en contacto una célula que comprende  
(a) un polipéptido de fusión que comprende un primer componente formado por la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada y un segundo componente formado por un dominio de unión a ADN y

25 (b) un gen reportero acoplado operativamente a un promotor que comprende al menos una copia del sitio al que se une el dominio de unión de ADN presente en el polipéptido (i)

30 con un compuesto cuya actividad antitumoral se desea ensayar y

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

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

40 (a) un polipéptido de fusión que comprende un primer componente formado por la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada y un segundo componente formado por un dominio de unión a ADN y

45 (b) un gen reportero acoplado operativamente a un promotor que comprende al menos una copia del sitio al que se une el dominio de unión de ADN presente en el polipéptido (i).

50 En una forma preferida de realización, el polipéptido (i) comprende una variante de la secuencia SEQ ID NO:1 cuya actividad trans-activadora de la transcripción se encuentra constitutivamente activada. Preferiblemente, la variante de la SEQ ID NO:12 se encuentra constitutivamente activada mediante la sustitución del amino ácido en posición 193 de SEQ ID NO:1 por un análogo estructural de un fosfoamino ácido. En una forma aún más preferida de realización, el análogo estructural de un fosfoamino ácido es Asp.

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

## ES 2 339 730 A1

Genes reporteros que se pueden usar formando parte del componente (ii) invención incluyen luciferasa, proteína verde fluorescente y variantes de la misma que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda (por ejemplo, DS-Red o proteína fluorescente roja), cloranfenicol acetiltransferasa,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano.

5

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

10

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

15

20

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

25

30

35

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

40

45

50

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

55

60

65

En el caso de que las células utilizadas en el método de la invención hayan sufrido una amplificación de los genes que confieren resistencia a tal agente, es necesaria la incorporación sucesiva de dos construcciones. En este caso, es posible incorporar la construcción que codifica la proteína de fusión de forma estable usando los métodos ya

descritos y la construcción que contiene el gen reportero de forma transitoria. Alternativamente, es posible incorporar ambas construcciones de forma estable, en cuyo caso será necesario usar un marcador de selección distinto con cada construcción y efectuar el proceso de transfección/selección ya descrito dos veces. Normalmente, se considera que una célula expresa un marcador de forma estable cuando la expresión de dicho marcador no disminuye con sucesivos ciclos de proliferación, independientemente de la presencia en el medio de cultivo de agente de selección.

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

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

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

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

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

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

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

Si el gen reportero codifica una peroxidasa, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo de 2,2-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilenediamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidi-

na, ácido 5-amino salicílico, ácido 3-dimetilamino benzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) o substratos fluorogénicos del tipo del ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacetico, fenoxazines reducidas y benzotiazines reducidas, incluyendo los reactivos Amplex® Red y Amplex UltraRed y los dihidroxantenos reducidos.

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

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

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

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

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Western blot*

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

#### *Immunoprecipitación*

Extractos celulares y nucleares de células Jurkat, al 80-90% de confluencia, tratadas o no con PMA/Ion durante 4 h, se procesaron, y se determinó la concentración proteica. Los extractos se incubaron con los siguientes anticuerpos específicos: NFATc2 (sc-7296, Santa Cruz Biotechnology), NFκB-p65 (sc-109, Santa Cruz Biotechnology), c-Jun (sc-

## ES 2 339 730 A1

45, Santa Cruz Biotechnology), c-Fos (sc-52, Santa Cruz Biotechnology), p300 (sc-584, Santa Cruz Biotechnology), PKC (sc-10800, Santa Cruz Biotechnology), PKC- $\theta$  (sc-212, Santa Cruz Biotechnology), V5-TAG (MCA 1360, Serotec) y una IgG de conejo o ratón como control negativo, a una concentración final de 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se incubaron durante 3 horas a 4°C con bolas de proteína A/G-sefarosa (Sigma). Las muestras se centrifugaron y las bolas se lavaron tres veces con el buffer de lavado correspondiente (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, y 0.5% Nonidet P-40). Los inmunoprecipitados se mezclaron con buffer de carga SDS y se separaron mediante un gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) en gradiente de 4-15%, y se analizaron mediante Western blot.

### 10 Construcción de plásmidos

El plásmido de expresión pcDNA-A238L expression plasmid se generó clonando el marco de lectura abierta del gen A238L procedente del aislado viral Ba71V de VPPA (African swine fever virus), en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). El NFAT-luc, que contiene tres copias en tándem del sitio de unión distal NFATc2/AP-1 (posición -286 a -257) del promotor de IL-2, fue cedido por el Dr. Gerald Crabtree (Departamento de Patología y Biología del Desarrollo, Howard Hughes Medical Institute, Stanford University Medical School, Stanford, CA). El plásmido reportero NF $\kappa$ B-p65 (pNF3TKLuc) contiene un trímero del motivo de unión de NF $\kappa$ B-p65 del gen upstream H-2K del promotor de la timidita quinasa y del gen reportero de la luciferasa. El plásmido AP-1-Luc presenta el elemento de respuesta a AP-1 (-73 a +63 pb) del promotor humano de la colagenasa fusionado al gen de la luciferasa. La construcción pGAL4-hNFATc2 contiene los primeros 451 aminoácidos del NFATc2 humano fusionado al dominio de unión a DNA (DBD) del factor de transcripción de levaduras GAL4. La construcción GAL4-p65 tiene el dominio de unión a DNA de GAL4 unido al dominio de transactivación carboxi terminal de p65. El plásmido GAL4-c-Jun expresa los primeros 166 aminoácidos de c-Jun humano fusionado al DBD del factor de transcripción de levaduras GAL4. GAL4-cFos y GAL4-Sp1 fueron cedidos por el Dr. Manuel Fresno (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain) y el Dr. Stefan Roberts (División de Gene Expression, Department de Biochemistry, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK) respectivamente. La construcción GAL4-luciferasa (pGAL4-Luc) contiene cinco sitios de unión a GAL4 derivados de la fusión del gen GAL4 y el gen reportero luciferasa. La construcción GAL4-p300 full-length (FL) y los mutantes (192-703), (1-1301) y (1239-2414) fueron cedidos por Dr. Perkins. La expresión del plásmido pCI-p300 wild-type y su mutante de delección histona acetil transferasa (HAT), pCI-p300 $\Delta$ HAT, fue cedido por el Dr. Joan Boyes (Institute of Cancer Research, London, UK) y el plásmido pCDNA3-A238L-SV5 fue cedido por la Dr. Linda K. Dixon (Institute for Animal Health, Woking, Surrey, UK). Los plásmidos de expresión de PKC- $\theta$  wild-type y el mutante constitutivamente activo (pEF-PKC- $\theta$  wt y pEF-PKC- $\theta$  A/E, respectivamente) fueron cedidos por el Dr. Martín Villalba (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique-Unité Mixte de Recherche, Montpellier, France). El plásmido vacío pEFneo fue cedido por el Dr. Manuel Fresno. GAL4-p300 (FL)Ser384Aa y GAL4-p300(192-703)Ser384Aa fueron generados utilizando el *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis fueron: p300S384A; forward (5'-CCACATGACACACTGCCAGGCAGGCAAGTCTGCCAAGTGGC-3') y reverse (5'-GCCACTTGGCAGACTTGCCTGGCAGTGTGTCATGAGG-3'). Los nucleótidos subrayados indican la sustitución de la Serina por Alanina. El plásmido pRL-tk-luc (Promega) se utilizó en todos los casos para evaluar la eficiencia de transfección.

### Ensayos de transfección y ensayos luciferasa

Se generaron células Jurkat que expresan de manera estable la proteína A238L. Para la transfección transitoria, las células se transfectaron con 250 ng de plásmidos reporteros o con 1  $\mu\text{g}$  de plásmidos de expresión por  $10^6$  células, utilizando el sistema *LipofectAMINE Plus Reagent* (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. En los ensayos de co-transfección se añadió la misma dosis de plásmido de expresión por  $10^6$  células. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C, se lavaron e incubaron con medio con suero durante 24 h y se estimularon o no con PMA/Ion. Como control de la transfección para el ensayo luciferasa, se co-transfectó en todos los casos el plásmido control Renilla luciferasa *pRL-TK-luc* (Promega). A los tiempos post-estimulación indicados, las células se usaron con 200  $\mu\text{l}$  de *Cell Culture Lysis Reagent* (Promega) y se centrifugaron a velocidad máxima durante 5 min a 4°C, y 20  $\mu\text{l}$  de cada sobrenadante se utilizó para determinar los valores de la actividad luciferasa de luciérnaga y Renilla en un luminómetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory) utilizando *Dual Luciferase Assay System* (Promega). Las transfecciones se normalizaron a los valores de luciferasa de Renilla, y los resultados se expresaron como unidades de luminiscencia relativas ajustados a la concentración de proteínas de cada muestra determinado por el método BCA. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los datos se representan como unidades de luciferasa relativas (RLU) (mean  $\pm$  S.D).

### Ensayo de fosforilación *in vitro* en fase sólida

Utilizamos 2  $\mu\text{g}$  de MBP (miosin binding protein) (sc-4113, Santa Cruz Biotechnology) o los inmunoprecipitados GAL4-p300(192-703)wt y GAL4-p300(192-703)S384A como sustrato de la fosforilación *in vitro*, en los cuales se inmunoprecipitó pan-PKC o PKC- $\theta$  de células Jurkat. Extractos celulares de  $10^7$  células Jurkat se cultivaron en ausencia o presencia de PMA/Ion durante 30 minutos. Las células se lisaron en buffer RIPA formado por 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl y 1% NP-40, suplementado con inhibidores de fosfatasa (1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, y 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) e inhibidores de proteasa (0.5 mM fluoridro fenilmetilsulfonil) 1  $\mu\text{g}$  de pepstatina, 2  $\mu\text{g}$  de leupeptina, y 2  $\mu\text{g}$  de aprotinina por ml).

Los extractos clarificados se incubaron toda la noche con 4  $\mu\text{g}$  de anticuerpo contra PKC (sc-10800, Santa Cruz Biotechnology) o contra PKC- $\theta$  (sc-212, Santa Cruz Biotechnology) para inmunoprecipitarlos. Los precipitados fueron resuspendidos en buffer kinasa constituido por 20 mM HEPES (pH 7.6), 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 20  $\mu\text{M}$  ATP, y 1  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (actividad específica, 3,000 Ci/mol) suplementado con inhibidores de fosfatasa y mezclado con el sustrato correspondiente. Después de 30 min a 30°C, la reacción kinasa se determinó lavando con buffer TNT que contiene 20 mM Trizma base (pH 7.5), 200 mM NaCl y 1% Tritón X-100, y está suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). Las proteínas fosforiladas se separaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, y se revelaron por autoradiografía.

## Ejemplo 2

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

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

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

Para analizar la relevancia de la Ser 384 en la modulación de la actividad de p300, se generaron mutantes que sustituyen la Ser en posición 384 por Ala (S384A), sobre la proteína p300 completa, GAL4-p300(FL) S384A, y sobre la construcción que contiene la región amino-terminal GAL4-p300 (192-703) S384A, las cuales fueron ensayadas para actividad Gal4-luc. Nuestros resultados mostraron que dicha mutación en la p300 completa es responsable de una importante reducción de la transactivación de p300 y que la sustitución de la Ser384 por alanina en GAL4-p300 (192-703) S384A eliminó completamente la actividad transcripcional mediada por esta región. (Fig. 2A). Estos datos claramente indican que la Ser384 es esencial en la trans-activación mediada por el dominio N-terminal de p300, y directamente señalan a este residuo como fundamental en la regulación global de este coactivador. Previamente ha sido demostrada la importancia de los miembros  $\zeta$ ,  $\varepsilon$  y  $\theta$  de la familia PKC en la activación de NF-ATc2, NF- $\kappa$ B-p65, y c-Jun en células T. Teniendo en cuenta estos datos, la Ser384 parece ser un sustrato potencial de PKC. Por lo tanto, y para caracterizar el isotipo de PKC responsable de la fosforilación de la Ser384, se sobre-expresaron separadamente los imitantes GAL4-p300 (192-703), wt, y GAL4-p300 (192-703) S384A en células Jurkat. Después, se utilizaron extractos nucleares para inmunoprecipitarlos con un anticuerpo específico para GAL4, y posteriormente revelarlos con un anticuerpo frente a p300 para asesorarnos de la expresión de los transfectantes transfected constructs (Fig. 2B). Los extractos inmunoprecipitados fueron entonces utilizados como sustratos de sucesivos ensayos quinasas usando PKC- $\zeta$ ,  $\varepsilon$  y  $\theta$ , previamente obtenidos de células Jurkat y Jurkat estimuladas con PMA/Ion. Los resultados muestran que ni PKC- $\zeta$ , ni  $\varepsilon$  fueron capaces de fosforilar la construcción GAL4-p300 (192-703) que comprende el extremo N-terminal de p300, mientras que PKC- $\theta$  fosforiló esta proteína de fusión, revelando la importancia de PKC- $\theta$  en la fosforilación de este dominio regulador p300. Además, se observó un menor nivel de fosforilación cuando GAL4-p300 (192-703) se usó el mutante S384A como sustrato (Fig. 2C), confirmando la relevancia de la S384 como diana de la PKC- $\theta$  en células T. Para reconfirmar el papel de A238L y de PKC- $\theta$  en la inhibición de la activación de p300, células Jurkat-pcDNA o Jurkat-A238L fueron transfectadas con el vector vacío pEFneo, pEF-PKC- $\theta$  wt, o con un vector que expresa un mutante constitutivamente activo de PKC- $\theta$  (pEF-PKC- $\theta$  A/E) y además con GAL4-p300 de cadena completa (full-length o FL) o la construcción N-terminal (192-703), junto con el plásmido reportero GAL4-luc, como se describe en el ejemplo 1. La Fig. 2D muestra cómo la sobre-expresión del mutante constitutivamente activo PKC- $\theta$  (pEF-PKC- $\theta$ A/E), revierte completamente la inhibición inducida por A238L, incrementando por tanto la relevancia de PKC- $\theta$  en el mecanismo de inhibición llevado a cabo por la proteína viral. Los resultados también indican que PKC- $\theta$  debe estar activada para ejercer su función, un punto que ya se había establecido previamente por

## ES 2 339 730 A1

otros laboratorios. Para demostrar la relación entre PKC- $\theta$  y la inhibición inducida por A238L, se inmunoprecipitó la quinasa de Jurkat-pcDNA y Jurkat-A238L, previamente transfectadas con GAL4-p300 (192-703) wt. La Fig. 2E muestra la presencia de GAL4-p300 (192-703) en los inmunoprecipitados de células Jurkat-pcDNA estimuladas, pero no en las Jurkat-A238L.

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

### Ejemplo 3

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

### Ejemplo 4

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

### Ejemplo 5

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

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

### Ejemplo 6

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

65



# ES 2 339 730 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:1 o una variante de la misma que muestra al menos un 80% de identidad de secuencia y que carece de actividad trans-activadora de la transcripción.
2. Un polipéptido según la reivindicación 1 en el que el amino ácido en posición 193 de SEQ ID NO:1 no es un amino ácido fosforilable ni un análogo estructural de un fosfoaminoácido.
- 10 3. Un polipéptido según la reivindicación 2 en donde el amino ácido en posición 193 en la secuencia de SEQ ID NO:1 es Ala.
4. Un polinucleótido que codifica un polipéptido tal que definido en las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Una construcción génica que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4.
6. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 4 o una construcción génica según la reivindicación 5.
- 20 7. Una célula que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6.
8. Un animal transgénico no humano que comprende, integrado en su genoma, un ácido nucleico según la reivindicación 4.
- 25 9. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 para su uso en medicina.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 35 11. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un polinucleótido según la reivindicación 4, una construcción génica según la reivindicación 5 o un vector según la reivindicación 6 para el tratamiento de trastornos causados por una activación indeseada de las proteínas p300, NF- $\kappa$ B, NFAT y/o c-jun.
- 40 12. Un polipéptido, polinucleótido, construcción génica o vector según la reivindicación 11 en donde la enfermedad está causada por una activación indeseada de NF- $\kappa$ B.
- 45 13. Un polipéptido, polinucleótido, construcción génica o vector según la reivindicación 12 en donde la enfermedad causada por una activación indeseada de NF- $\kappa$ B se selecciona del grupo de una enfermedad inflamatoria y una enfermedad autoinmune.
- 50
- 55
- 60
- 65

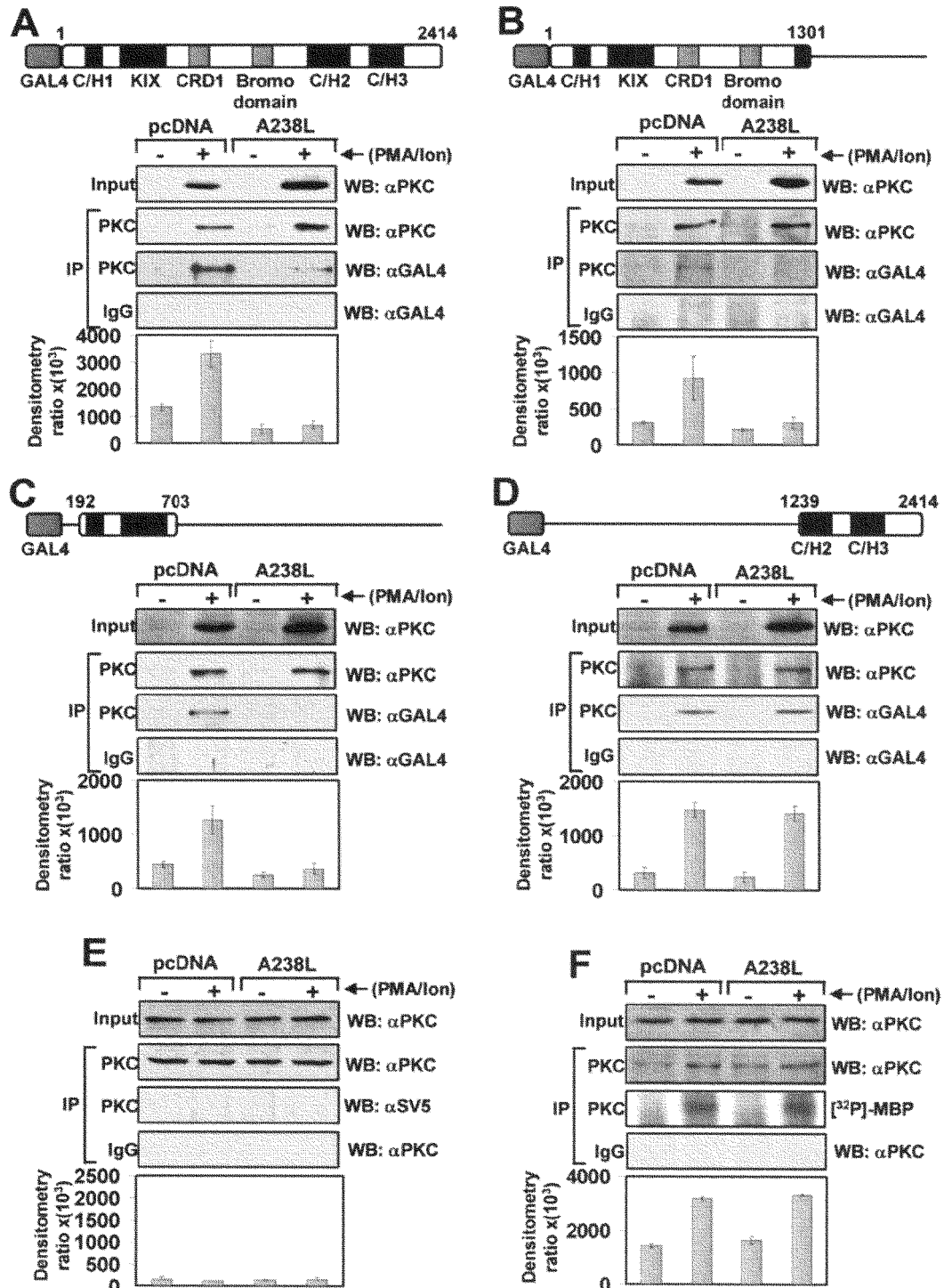


Figura 1

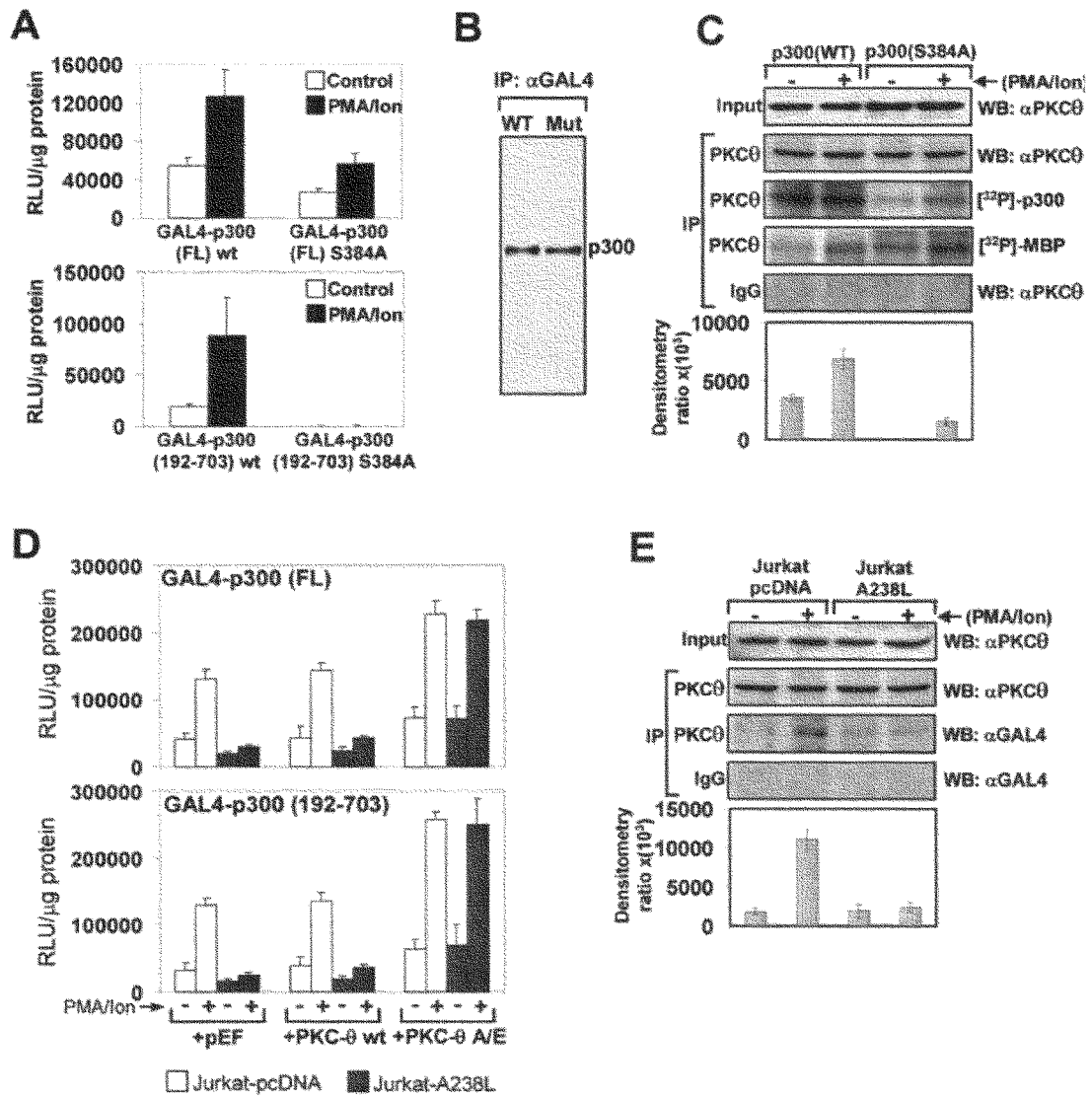


Figure 2

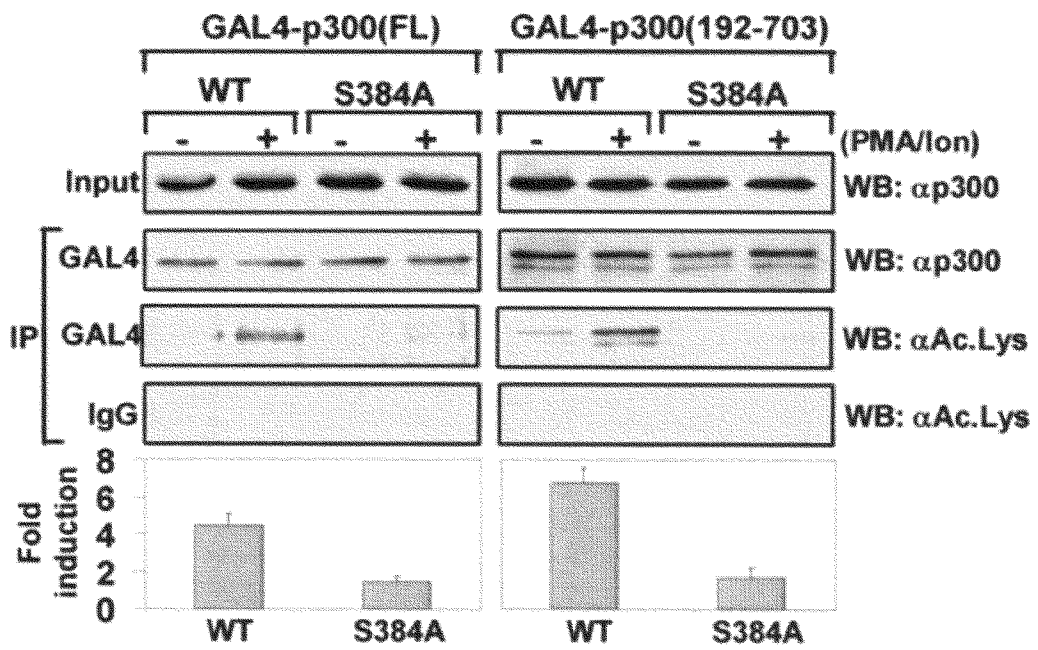


Figura 3

# ES 2 339 730 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CSIC

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

<130> P3657ES00

10 <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 512

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gln Pro Ala Pro Gln Val Gln Gln Pro Gly Leu Val Thr Pro Val  
55 115 120 125

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

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

Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg Gln Cys Asn Leu Pro

65

# ES 2 339 730 A1

	165	170	175
5	His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln 180	185	190
10	Ser Gly Lys Ser Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile 195	200	205
15	Ile Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu 210	215	220
20	Pro Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Arg Asn Gln Gln Pro Ile Leu Thr 225	230	235
25	Gly Ala Pro Val Gly Leu Gly Asn Pro Ser Ser Leu Gly Val Gly Gln 245	250	255
30	Gln Ser Ala Pro Asn Leu Ser Thr Val Ser Gln Ile Asp Pro Ser Ser 260	265	270
35	Ile Glu Arg Ala Tyr Ala Ala Leu Gly Leu Pro Tyr Gln Val Asn Gln 275	280	285
40	Met Pro Thr Gln Pro Gln Val Gln Ala Lys Asn Gln Gln Asn Gln Gln 290	295	300
45	Pro Gly Gln Ser Pro Gln Gly Met Arg Pro Met Ser Asn Met Ser Ala 305	310	315
50	Ser Pro Met Gly Val Asn Gly Gly Val Gly Val Gln Thr Pro Ser Leu 325	330	335
55	Leu Ser Asp Ser Met Leu His Ser Ala Ile Asn Ser Gln Asn Pro Met 340	345	350
60	Met Ser Glu Asn Ala Ser Val Pro Ser Leu Gly Pro Met Pro Thr Ala 355	360	365
65	Ala Gln Pro Ser Thr Thr Gly Ile Arg Lys Gln Trp His Glu Asp Ile 370	375	380
70	Thr Gln Asp Leu Arg Asn His Leu Val His Lys Leu Val Gln Ala Ile 385	390	395
75	Phe Pro Thr Pro Asp Pro Ala Ala Leu Lys Asp Arg Arg Met Glu Asn		

# ES 2 339 730 A1

	405		410		415											
5	Leu	Val	Ala	Tyr	Ala	Arg	Lys	Val	Glu	Gly	Asp	Met	Tyr	Glu	Ser	Ala
				420					425					430		
10	Asn	Asn	Arg	Ala	Glu	Tyr	Tyr	His	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Tyr	Lys
			435					440					445			
15	Ile	Gln	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	Arg	Arg	Thr	Arg	Leu	Gln	Lys	Gln
		450					455					460				
20	Asn	Met	Leu	Pro	Asn	Ala	Ala	Gly	Met	Val	Pro	Val	Ser	Met	Asn	Pro
	465					470					475					480
25	Gly	Pro	Asn	Met	Gly	Gln	Pro	Gln	Pro	Gly	Met	Thr	Ser	Asn	Gly	Pro
					485					490					495	
30	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Met	Ile	Arg	Gly	Ser	Val	Pro	Asn	Gln	Met	Met
				500					505					510		
30	<210> 2															
	<211> 2414															
	<212> PRT															
35	<213> <i>Homo sapiens</i>															
	<400> 2															
40	Met	Ala	Glu	Asn	Val	Val	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Lys	Arg	Pro
	1				5					10					15	
45	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Gly	Thr	Asp
				20					25					30		
50	Phe	Gly	Ser	Leu	Phe	Asp	Leu	Glu	His	Asp	Leu	Pro	Asp	Glu	Leu	Ile
			35					40					45			
55	Asn	Ser	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu	Thr	Asn	Gly	Gly	Asp	Ile	Asn	Gln	Leu
		50					55					60				
60	Gln	Thr	Ser	Leu	Gly	Met	Val	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Lys	His	Lys	Gln
	65					70					75					80
65	Leu	Ser	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Asn	Leu	Asn	Met	Gly
					85						90				95	
65	Val	Gly	Gly	Pro	Gly	Gln	Val	Met	Ala	Ser	Gln	Ala	Gln	Gln	Ser	Ser
				100					105					110		

# ES 2 339 730 A1

Pro Gly Leu Gly Leu Ile Asn Ser Met Val Lys Ser Pro Met Thr Gln  
 115 120 125

5

Ala Gly Leu Thr Ser Pro Asn Met Gly Met Gly Thr Ser Gly Pro Asn  
 130 135 140

10

Gln Gly Pro Thr Gln Ser Thr Gly Met Met Asn Ser Pro Val Asn Gln  
 145 150 155 160

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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



# ES 2 339 730 A1

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

Pro Thr Gln Pro Gln Val Gln Ala Lys Asn Gln Gln Asn Gln Gln Pro  
 485 490 495

45

Gly Gln Ser Pro Gln Gly Met Arg Pro Met Ser Asn Met Ser Ala Ser  
 500 505 510

50

Pro Met Gly Val Asn Gly Gly Val Gly Val Gln Thr Pro Ser Leu Leu  
 515 520 525

55

Ser Asp Ser Met Leu His Ser Ala Ile Asn Ser Gln Asn Pro Met Met  
 530 535 540

60

Ser Glu Asn Ala Ser Val Pro Ser Leu Gly Pro Met Pro Thr Ala Ala  
 545 550 555 560

65

Gln Pro Ser Thr Thr Gly Ile Arg Lys Gln Trp His Glu Asp Ile Thr  
 565 570 575

Gln Asp Leu Arg Asn His Leu Val His Lys Leu Val Gln Ala Ile Phe  
 580 585 590

# ES 2 339 730 A1

Pro Thr Pro Asp Pro Ala Ala Leu Lys Asp Arg Arg Met Glu Asn Leu  
           595                                  600                                  605

5

Val Ala Tyr Ala Arg Lys Val Glu Gly Asp Met Tyr Glu Ser Ala Asn  
         610                                  615                                  620

10

Asn Arg Ala Glu Tyr Tyr His Leu Leu Ala Glu Lys Ile Tyr Lys Ile  
   625                                  630                                  635                                  640

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

Cys Pro Val Asn Ser Pro Ile Met Pro Pro Gly Ser Gln Gly Ser His  
                                   805                                  810                                  815

Ile His Cys Pro Gln Leu Pro Gln Pro Ala Leu His Gln Asn Ser Pro  
                                   820                                  825                                  830

# ES 2 339 730 A1

	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Pro	His	His	Thr	Pro	Pro	Ser
			835					840					845			
5	Ile	Gly	Ala	Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Ala	Pro	Val	Pro
		850					855					860				
10	Thr	Pro	Pro	Ala	Met	Pro	Pro	Gly	Pro	Gln	Ser	Gln	Ala	Leu	His	Pro
	865					870					875					880
15	Pro	Pro	Arg	Gln	Thr	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Thr	Gln	Leu	Pro	Gln	Gln
					885					890					895	
20	Val	Gln	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ala	Asp	Gln	Pro	Gln	Gln
				900					905					910		
25	Gln	Pro	Arg	Ser	Gln	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Val	Pro	Thr	Pro	Asn
			915					920					925			
30	Ala	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Ser	Gln	Pro	Ala
		930					935						940			
35	Val	Ser	Ile	Glu	Gly	Gln	Val	Ser	Asn	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr
	945					950					955					960
40	Glu	Val	Asn	Ser	Gln	Ala	Ile	Ala	Glu	Lys	Gln	Pro	Ser	Gln	Glu	Val
					965					970					975	
45	Lys	Met	Glu	Ala	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Gln	Pro	Glu	Pro	Ala	Asp	Thr
				980					985					990		
50	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys	Val	Glu	Asp	Cys	Lys	Met	Glu
			995				1000						1005			
55	Ser	Thr	Glu	Thr	Glu	Glu	Arg	Ser	Thr	Glu	Leu	Lys	Thr	Glu	Ile	
		1010					1015					1020				
60	Lys	Glu	Glu	Glu	Asp	Gln	Pro	Ser	Thr	Ser	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	
		1025					1030					1035				
65	Pro	Ala	Pro	Gly	Gln	Ser	Lys	Lys	Lys	Ile	Phe	Lys	Pro	Glu	Glu	
		1040					1045					1050				
70	Leu	Arg	Gln	Ala	Leu	Met	Pro	Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Gln	
		1055					1060					1065				

# ES 2 339 730 A1

5	Asp 1070	Pro	Glu	Ser	Leu	Pro	Phe 1075	Arg	Gln	Pro	Val	Asp 1080	Pro	Gln	Leu
10	Leu 1085	Gly	Ile	Pro	Asp	Tyr	Phe 1090	Asp	Ile	Val	Lys	Ser 1095	Pro	Met	Asp
15	Leu 1100	Ser	Thr	Ile	Lys	Arg	Lys 1105	Leu	Asp	Thr	Gly	Gln 1110	Tyr	Gln	Glu
20	Pro 1115	Trp	Gln	Tyr	Val	Asp	Asp 1120	Ile	Trp	Leu	Met	Phe 1125	Asn	Asn	Ala
25	Trp 1130	Leu	Tyr	Asn	Arg	Lys	Thr 1135	Ser	Arg	Val	Tyr	Lys 1140	Tyr	Cys	Ser
30	Lys 1145	Leu	Ser	Glu	Val	Phe	Glu 1150	Gln	Glu	Ile	Asp	Pro 1155	Val	Met	Gln
35	Ser 1160	Leu	Gly	Tyr	Cys	Cys	Gly 1165	Arg	Lys	Leu	Glu	Phe 1170	Ser	Pro	Gln
40	Thr 1175	Leu	Cys	Cys	Tyr	Gly	Lys 1180	Gln	Leu	Cys	Thr	Ile 1185	Pro	Arg	Asp
45	Ala 1190	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Gln 1195	Asn	Arg	Tyr	His	Phe 1200	Cys	Glu	Lys
50	Cys 1205	Phe	Asn	Glu	Ile	Gln	Gly 1210	Glu	Ser	Val	Ser	Leu 1215	Gly	Asp	Asp
55	Pro 1220	Ser	Gln	Pro	Gln	Thr	Thr 1225	Ile	Asn	Lys	Glu	Gln 1230	Phe	Ser	Lys
60	Arg 1235	Lys	Asn	Asp	Thr	Leu	Asp 1240	Pro	Glu	Leu	Phe	Val 1245	Glu	Cys	Thr
65	Glu 1250	Cys	Gly	Arg	Lys	Met	His 1255	Gln	Ile	Cys	Val	Leu 1260	His	His	Glu
70	Ile 1265	Ile	Trp	Pro	Ala	Gly	Phe 1270	Val	Cys	Asp	Gly	Cys 1275	Leu	Lys	Lys
75	Ser 1280	Ala	Arg	Thr	Arg	Lys	Glu 1285	Asn	Lys	Phe	Ser	Ala 1290	Lys	Arg	Leu

# ES 2 339 730 A1

5           Pro Ser Thr Arg Leu Gly Thr Phe Leu Glu Asn Arg Val Asn Asp  
               1295                                   1300                                   1305

10           Phe Leu Arg Arg Gln Asn His Pro Glu Ser Gly Glu Val Thr Val  
               1310                                   1315                                   1320

15           Arg Val Val His Ala Ser Asp Lys Thr Val Glu Val Lys Pro Gly  
               1325                                   1330                                   1335

20           Met Lys Ala Arg Phe Val Asp Ser Gly Glu Met Ala Glu Ser Phe  
               1340                                   1345                                   1350

25           Pro Tyr Arg Thr Lys Ala Leu Phe Ala Phe Glu Glu Ile Asp Gly  
               1355                                   1360                                   1365

30           Val Asp Leu Cys Phe Phe Gly Met His Val Gln Glu Tyr Gly Ser  
               1370                                   1375                                   1380

35           Asp Cys Pro Pro Pro Asn Gln Arg Arg Val Tyr Ile Ser Tyr Leu  
               1385                                   1390                                   1395

40           Asp Ser Val His Phe Phe Arg Pro Lys Cys Leu Arg Thr Ala Val  
               1400                                   1405                                   1410

45           Tyr His Glu Ile Leu Ile Gly Tyr Leu Glu Tyr Val Lys Lys Leu  
               1415                                   1420                                   1425

50           Gly Tyr Thr Thr Gly His Ile Trp Ala Cys Pro Pro Ser Glu Gly  
               1430                                   1435                                   1440

55           Asp Asp Tyr Ile Phe His Cys His Pro Pro Asp Gln Lys Ile Pro  
               1445                                   1450                                   1455

60           Lys Pro Lys Arg Leu Gln Glu Trp Tyr Lys Lys Met Leu Asp Lys  
               1460                                   1465                                   1470

65           Ala Val Ser Glu Arg Ile Val His Asp Tyr Lys Asp Ile Phe Lys  
               1475                                   1480                                   1485

              Gln Ala Thr Glu Asp Arg Leu Thr Ser Ala Lys Glu Leu Pro Tyr  
               1490                                   1495                                   1500

              Phe Glu Gly Asp Phe Trp Pro Asn Val Leu Glu Glu Ser Ile Lys  
               1505                                   1510                                   1515

# ES 2 339 730 A1

	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Arg	Lys	Arg	Glu	Glu	Asn	Thr
		1520					1525					1530			
5															
	Ser	Asn	Glu	Ser	Thr	Asp	Val	Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Lys	Asn	Ala
		1535					1540					1545			
10															
	Lys	Lys	Lys	Asn	Asn	Lys	Lys	Thr	Ser	Lys	Asn	Lys	Ser	Ser	Leu
		1550					1555					1560			
15															
	Ser	Arg	Gly	Asn	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Met	Pro	Asn	Val	Ser	Asn
		1565					1570					1575			
20															
	Asp	Leu	Ser	Gln	Lys	Leu	Tyr	Ala	Thr	Met	Glu	Lys	His	Lys	Glu
		1580					1585					1590			
25															
	Val	Phe	Phe	Val	Ile	Arg	Leu	Ile	Ala	Gly	Pro	Ala	Ala	Asn	Ser
		1595					1600					1605			
30															
	Leu	Pro	Pro	Ile	Val	Asp	Pro	Asp	Pro	Leu	Ile	Pro	Cys	Asp	Leu
		1610					1615					1620			
35															
	Met	Asp	Gly	Arg	Asp	Ala	Phe	Leu	Thr	Leu	Ala	Arg	Asp	Lys	His
		1625					1630					1635			
40															
	Leu	Glu	Phe	Ser	Ser	Leu	Arg	Arg	Ala	Gln	Trp	Ser	Thr	Met	Cys
		1640					1645					1650			
45															
	Met	Leu	Val	Glu	Leu	His	Thr	Gln	Ser	Gln	Asp	Arg	Phe	Val	Tyr
		1655					1660					1665			
50															
	Thr	Cys	Asn	Glu	Cys	Lys	His	His	Val	Glu	Thr	Arg	Trp	His	Cys
		1670					1675					1680			
55															
	Thr	Val	Cys	Glu	Asp	Tyr	Asp	Leu	Cys	Ile	Thr	Cys	Tyr	Asn	Thr
		1685					1690					1695			
60															
	Lys	Asn	His	Asp	His	Lys	Met	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Asp
		1700					1705					1710			
65															
	Asp	Glu	Ser	Asn	Asn	Gln	Gln	Ala	Ala	Ala	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly
		1715					1720					1725			
70															
	Asp	Ser	Arg	Arg	Leu	Ser	Ile	Gln	Arg	Cys	Ile	Gln	Ser	Leu	Val
		1730					1735					1740			

# ES 2 339 730 A1

	His	Ala	Cys	Gln	Cys	Arg	Asn	Ala	Asn	Cys	Ser	Leu	Pro	Ser	Cys
		1745					1750					1755			
5															
	Gln	Lys	Met	Lys	Arg	Val	Val	Gln	His	Thr	Lys	Gly	Cys	Lys	Arg
		1760					1765					1770			
10															
	Lys	Thr	Asn	Gly	Gly	Cys	Pro	Ile	Cys	Lys	Gln	Leu	Ile	Ala	Leu
		1775					1780					1785			
15															
	Cys	Cys	Tyr	His	Ala	Lys	His	Cys	Gln	Glu	Asn	Lys	Cys	Pro	Val
		1790					1795					1800			
20															
	Pro	Phe	Cys	Leu	Asn	Ile	Lys	Gln	Lys	Leu	Arg	Gln	Gln	Gln	Leu
		1805					1810					1815			
25															
	Gln	His	Arg	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Met	Leu	Arg	Arg	Arg	Met	Ala
		1820					1825					1830			
30															
	Ser	Met	Gln	Arg	Thr	Gly	Val	Val	Gly	Gln	Gln	Gln	Gly	Leu	Pro
		1835					1840					1845			
35															
	Ser	Pro	Thr	Pro	Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Thr	Gly	Gln	Gln	Pro
		1850					1855					1860			
40															
	Thr	Thr	Pro	Gln	Thr	Pro	Gln	Pro	Thr	Ser	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr
		1865					1870					1875			
45															
	Pro	Pro	Asn	Ser	Met	Pro	Pro	Tyr	Leu	Pro	Arg	Thr	Gln	Ala	Ala
		1880					1885					1890			
50															
	Gly	Pro	Val	Ser	Gln	Gly	Lys	Ala	Ala	Gly	Gln	Val	Thr	Pro	Pro
		1895					1900					1905			
55															
	Thr	Pro	Pro	Gln	Thr	Ala	Gln	Pro	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Pro
		1910					1915					1920			
60															
	Thr	Ala	Val	Glu	Met	Ala	Met	Gln	Ile	Gln	Arg	Ala	Ala	Glu	Thr
		1925					1930					1935			
65															
	Gln	Arg	Gln	Met	Ala	His	Val	Gln	Ile	Phe	Gln	Arg	Pro	Ile	Gln
		1940					1945					1950			
70															
	His	Gln	Met	Pro	Pro	Met	Thr	Pro	Met	Ala	Pro	Met	Gly	Met	Asn
		1955					1960					1965			

# ES 2 339 730 A1

5 Pro Pro Pro Met Thr Arg Gly Pro Ser Gly His Leu Glu Pro Gly  
 1970 1975 1980

10 Met Gly Pro Thr Gly Met Gln Gln Gln Pro Pro Trp Ser Gln Gly  
 1985 1990 1995

15 Gly Leu Pro Gln Pro Gln Gln Leu Gln Ser Gly Met Pro Arg Pro  
 2000 2005 2010

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

70 Gln Ala Gln Gln Met Asn Met Asn His Asn Thr Met Pro Ser Gln  
 2165 2170 2175

75 Phe Arg Asp Ile Leu Arg Arg Gln Gln Met Met Gln Gln Gln Gln  
 2180 2185 2190



# ES 2 339 730 A1

	Gln	Gln	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Ile	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asn	His
		2195					2200					2205			
5															
	Asn	Gln	Phe	Gln	Gln	Pro	Gln	Gly	Val	Gly	Tyr	Pro	Pro	Gln	Pro
		2210					2215					2220			
10															
	Gln	Gln	Arg	Met	Gln	His	His	Met	Gln	Gln	Met	Gln	Gln	Gly	Asn
		2225					2230					2235			
15															
	Met	Gly	Gln	Ile	Gly	Gln	Leu	Pro	Gln	Ala	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala
		2240					2245					2250			
20															
	Gly	Ala	Ser	Leu	Gln	Ala	Tyr	Gln	Gln	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Gln
		2255					2260					2265			
25															
	Met	Gly	Ser	Pro	Val	Gln	Pro	Asn	Pro	Met	Ser	Pro	Gln	Gln	His
		2270					2275					2280			
30															
	Met	Leu	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Ser	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Gln	Gln
		2285					2290					2295			
35															
	Ile	Pro	Asn	Ser	Leu	Ser	Asn	Gln	Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Pro	Val
		2300					2305					2310			
40															
	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln	Ser	Gln	Pro	Pro	His	Ser	Ser	Pro	Ser
		2315					2320					2325			
45															
	Pro	Arg	Met	Gln	Pro	Gln	Pro	Ser	Pro	His	His	Val	Ser	Pro	Gln
		2330					2335					2340			
50															
	Thr	Ser	Ser	Pro	His	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Ala	Gln	Ala	Asn	Pro
		2345					2350					2355			
55															
	Met	Glu	Gln	Gly	His	Phe	Ala	Ser	Pro	Asp	Gln	Asn	Ser	Met	Leu
		2360					2365					2370			
60															
	Ser	Gln	Leu	Ala	Ser	Asn	Pro	Gly	Met	Ala	Asn	Leu	His	Gly	Ala
		2375					2380					2385			
65															
	Ser	Ala	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Ser	Asp	Leu	Asn
		2390					2395					2400			
70															
	Ser	Asn	Leu	Ser	Gln	Ser	Thr	Leu	Asp	Ile	His				
		2405					2410								

ES 2 339 730 A1

<210> 3

<211> 512

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# ES 2 339 730 A1

	Ile	Ser	His	Trp	Lys	Asn	Cys	Thr	Arg	His	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Leu
		210					215					220				
5																
	Pro	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly	Asp	Lys	Arg	Asn	Gln	Gln	Pro	Ile	Leu	Thr
	225					230					235					240
10																
	Gly	Ala	Pro	Val	Gly	Leu	Gly	Asn	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Val	Gly	Gln
					245					250					255	
15																
	Gln	Ser	Ala	Pro	Asn	Leu	Ser	Thr	Val	Ser	Gln	Ile	Asp	Pro	Ser	Ser
				260					265					270		
20																
	Ile	Glu	Arg	Ala	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Gln	Val	Asn	Gln
			275					280					285			
25																
	Met	Pro	Thr	Gln	Pro	Gln	Val	Gln	Ala	Lys	Asn	Gln	Gln	Asn	Gln	Gln
		290					295					300				
30																
	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Gly	Met	Arg	Pro	Met	Ser	Asn	Met	Ser	Ala
	305					310					315					320
35																
	Ser	Pro	Met	Gly	Val	Asn	Gly	Gly	Val	Gly	Val	Gln	Thr	Pro	Ser	Leu
				325						330					335	
40																
	Leu	Ser	Asp	Ser	Met	Leu	His	Ser	Ala	Ile	Asn	Ser	Gln	Asn	Pro	Met
				340					345					350		
45																
	Met	Ser	Glu	Asn	Ala	Ser	Val	Pro	Ser	Leu	Gly	Pro	Met	Pro	Thr	Ala
			355					360					365			
50																
	Ala	Gln	Pro	Ser	Thr	Thr	Gly	Ile	Arg	Lys	Gln	Trp	His	Glu	Asp	Ile
		370					375					380				
55																
	Thr	Gln	Asp	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Val	His	Lys	Leu	Val	Gln	Ala	Ile
	385					390					395					400
60																
	Phe	Pro	Thr	Pro	Asp	Pro	Ala	Ala	Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Met	Glu	Asn
					405					410					415	
65																
	Leu	Val	Ala	Tyr	Ala	Arg	Lys	Val	Glu	Gly	Asp	Met	Tyr	Glu	Ser	Ala
				420					425					430		
70																
	Asn	Asn	Arg	Ala	Glu	Tyr	Tyr	His	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Tyr	Lys
			435					440					445			

# ES 2 339 730 A1

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

5

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

10

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

15

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

<210> 4  
 20 <211> 512  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 4

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

# ES 2 339 730 A1

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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

# ES 2 339 730 A1

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



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 339 730

② N° de solicitud: 200800295

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.02.2008**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SNOWDEN, A.W. et al. "A novel transcriptional repression domain mediates p21WAF1/CIP1 induction of p300 transactivation". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 01.04.2000. Vol. 20, N° 8, páginas 2676-2686; todo el documento, especialmente Fig. 3.	1-13
A	WO 9528499 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.) 26.10.1995, todo el documento.	1-13

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.03.2009

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

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

C07K, A61K, A01K, A61P

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

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



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.03.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión:**

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

**Consideraciones:**

La invención consiste en las variantes S193A de la SEQ ID nº 1. La SEQ ID nº 1 a su vez, es una proteína que corresponde a la secuencia 192-703 de la proteína p300. La variante S193A, carece de actividad transcripcional. Esta variante se utiliza en la preparación de composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SNOWDEN, A.W. et al. "A novel transcriptional repression domain mediates p21WAF1/CIP1 induction of p300 transactivation". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 01.04.2000. Vol. 20, N°. 8, páginas 2676-2686.	01-04-2000
D02	WO 9528499 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.)	26-10-1995

Observaciones sobre documentos:

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

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

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

La variante de la SEQ ID nº 1 en la que el aminoácido de la posición 193 es Ala, es nueva y tiene actividad inventiva

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