



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 924**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01900896 .0**

86 Fecha de presentación : **05.01.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1244787**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.10.2002**

54 Título: **Activadores de caspasas.**

30 Prioridad: **06.01.2000 US 479309**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es:
Board of Regents, the University of Texas System
201 West 7th Street
Austin, Texas 78701, US

72 Inventor/es: **Wang, Xiaodong y**
Du, Chunying

74 Agente: **González Palmero, Fe**

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

DESCRIPCIÓN

Activadores de caspasas.

5 **Introducción****Campo de la invención**

El campo de la invención son reguladores de enzimas que participan en la apoptosis celular.

10

Antecedentes

Una de las etapas reguladoras clave para la apoptosis es la activación de caspasas, que conduce a los cambios morfológicos característicos asociados con las células apoptóticas que incluyen la condensación de cromatina, fragmentación del ADN en fragmentos nucleosómicos, degradación de la membrana nuclear, externalización de fosfatidilserina y formación de cuerpos apoptóticos que se fagocitan rápidamente (Liu *et al.*, 1997 Cell 89, 175-184; Enari *et al.*, 1998 Nature 391, 43-50; Sahara, *et al.*, 1999 Nature 401, 168-173; Lazebnik, *et al.*, 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9042-9046; Martin *et al.*, 1996 J. Biol. Chem. 271, 28753-28756; Zhang *et al.*, 1999 J. Cell Biol. 145,99-108).

20

Una cascada de activación de caspasas apoptótica principal la desencadena el citocromo c, una proteína que funciona normalmente en la cadena de transporte electrónico en las mitocondrias (Liu *et al.*, 1996 Cell 86, 147-157). En células vivas, el holocitocromo c existe exclusivamente en el espacio intermembrana de las mitocondrias, y se secuestra, por tanto, lejos de su pareja citosólica mortal, Apaf-1 (Zou *et al.*, 1997 Cell 90, 405-413). Tras la recepción de estímulos apoptóticos, tales como la deficiencia sérica, activación de receptores de muerte de la superficie celular y daño excesivo del ADN, la membrana externa de las mitocondrias se vuelve permeable al citocromo c (revisado por Reed, 1997 Cell 91,559-562). Una vez liberado al citosol, el citocromo c se une a Apaf-1 con una estequiometría 2:1 y forma un complejo de Apaf-1/citocromo c oligomérico en presencia de dATP o ATP (Purring *et al.*, 1999 J. American Chem. Soc. 121, 7435-7436; Zou *et al.*, 1999 J. Biol. Chem. 274, 11549-11556). Este complejo de Apaf-1/citocromo c oligomerizado recluta entonces y activa la caspasa apical de esta ruta, la procaspasa-9 (Li *et al.*, 1997 Cell 91, 479-489; Zou *et al.*, 1999). A su vez, la caspasa-9 activa caspasas posteriores tales como caspasa-3, 6 y 7 que constituyen la actividad caspasa principal en una célula apoptótica (Li *et al.*, 1997; Srinivasa *et al.*, 1998 Mol. Cell 1, 949-957; Faleiro *et al.*, 1997 EMBO J. 16,2271-2281).

En el presente documento, se describe la identificación, purificación, donación molecular, y caracterización de un factor novedoso que promueve la activación de caspasa dependiente de citocromo c/Apaf-1. Como el citocromo c, esta proteína está ubicada normalmente en las mitocondrias y se libera al citosol cuando las células experimentan apoptosis. Se denomina esta proteína Smac, para el segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias, tras el citocromo c. La adición de Smac a extractos citosólicos produce una fuerte activación de caspasas en estos extractos incluso sin la adición de dATP. Smac también permite la activación de caspasas en presencia de niveles fisiológicos de sal de potasio.

40

Sumario de la invención

La invención proporciona métodos y las composiciones referentes a reguladores polipeptídicos (activadores e inhibidores) de enzimas que participan en la apoptosis celular, particularmente caspasas. En un aspecto particular, la invención proporciona secuencias de polipéptidos y polinucleótidos que son diagnósticas de activadores de caspasas. Estas secuencias y los polipéptidos y polinucleótidos que realizan estas secuencias encuentran una amplia variedad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas que implican detectar y/o modular la expresión y/o función de activadores o caspasas o genes o transcritos que codifican para tales activadores. En aspectos más particulares, la invención proporciona sondas genéticas e inmunológicas específicas para activadores de caspasas.

50

Puesto que la activación o la inactivación no deseadas de la apoptosis se han asociado con muchas enfermedades humanas tales como cáncer, enfermedad autoinmunitaria y enfermedades neurodegenerativas, los polipéptidos y polinucleótidos reguladores de caspasas descritos proporcionan tanto dianas farmacológicas como reguladores para promover o inhibir la apoptosis. También, puesto que las proteínas Smac nativas descritas se translocan de manera natural desde las mitocondrias al citosol durante la apoptosis, pueden usarse las proteínas Smac como marcadores de diagnóstico para la apoptosis durante fases normales o patológicas, por ejemplo usando proteínas Smac marcadas tales como proteínas de fusión o usando agentes de unión específicos para Smac detectables.

60

Descripción detallada de realizaciones particulares de la invención

Se presentan las siguientes descripciones de realizaciones particulares y ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación. A menos que se indique lo contrario o de otro modo, en estas descripciones y en toda la memoria descriptiva, los términos “un” y “una” significan uno/una o más, el término “o” significa y/o y se entiende que las secuencias de polinucleótidos engloban las cadenas opuestas así como estructuras principales alternativas descritas en el presente documento.

65

Las secuencias de polipéptidos objeto encuentran una amplia variedad de aplicaciones. En una realización, se usan las secuencias objeto para sintetizar polipéptidos que, a su vez, proporcionan varias aplicaciones, que incluyen su uso en micromatrices proteómicas (por ejemplo Silzel JW, *et al.* Clin Chem sept. de 1998; 44(9):2036-43), modelos para el diseño racional de fármacos, inmunógenos para la producción de anticuerpos, etc. También se usan las secuencias de polipéptidos para detectar específicamente secuencias que comprenden la SEQ ID NO:2, o fragmentos de la misma, particularmente al menos uno de SEQ ID NO:2, residuos 1-78 o SEQ ID NO:2, residuos 176-239, o fragmentos de la misma, o polipéptidos que comprenden tales secuencias. Puede usarse cualquier método de detección conveniente, incluyendo métodos computacionales para la detección directa de la secuencia (por ejemplo algoritmos de tipo BLAST, alineaciones, etc.) y métodos físicos para la detección inferencial de la secuencia de polímeros (por ejemplo, espectroscopia de masas, etc.).

Además de la síntesis directa, también pueden expresarse los polipéptidos objeto en sistemas celulares y libres de células (por ejemplo Jermutus L, *et al.*, Curr Opin Biotechnol. oct. de 1998; 9(5):534-48) a partir de polinucleótidos que codifican para ellos, tales como los correspondientes polinucleótidos originales o polinucleótidos que codifican para ellos de manera natural aislados con cebadores de oligonucleótidos degenerados y sondas generadas a partir de las secuencias de polipéptidos objeto (software "GCG", Genetics Computer Group, Inc, Madison WI) o polinucleótidos optimizados para sistemas de expresión seleccionados preparados mediante traducción inversa de los polipéptidos objeto de acuerdo con algoritmos informáticos (por ejemplo Holler *et al.* (1993) Gene 136, 323-328; Martin *et al.* (1995) Gene 154, 150-166).

Los polipéptidos objeto incluyen fragmentos de las secuencias enumeradas que tienen una secuencia de aminoácidos, especificidad de unión o función específicas de Smac. Los fragmentos preferidos comprenden al menos 8, preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35, lo más preferiblemente al menos 50 residuos consecutivos de la SEQ ID NO:2, particularmente de al menos uno de SEQ ID NO:2, residuos 1-78 o SEQ ID NO:2, residuos 176-239, y tienen actividad de unión, producción o inhibidora de la unión o producción de anticuerpos específicas para el polipéptido correspondiente.

La actividad o función específica puede determinarse mediante ensayos convenientes *in vitro*, basados en células, o *in vivo*: por ejemplo, ensayos de unión *in vitro*, etc. los ensayos de unión engloban cualquier ensayo en el que se evalúe la interacción molecular de un polipéptido objeto con una diana de unión. La diana de unión puede ser una diana de unión natural tal como una proteína de regulación o una diana de unión no natural tal como una proteína inmunitaria específica tal como un anticuerpo, o un agente específico tal como los identificados en ensayos de selección tal como se describe a continuación. Puede someterse a ensayo la especificidad de unión mediante las constantes de equilibrio de unión (normalmente de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} preferiblemente de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , más preferiblemente de al menos aproximadamente 10^9 M^{-1}), mediante ensayos de apoptosis o activación de caspasas, mediante la capacidad del polipéptido objeto para funcionar como mutantes negativos en células que expresan, para producir un anticuerpo específico en un huésped heterólogo (por ejemplo, un roedor o conejo), etc. En una realización particular, los fragmentos del polipéptido objeto proporcionan antígenos y/o inmunógenos específicos, especialmente cuando están acoplados a proteínas transportadoras. Por ejemplo, los péptidos están unidos covalentemente al antígeno de lapa californiana (KLH) y se emulsiona el conjugado en adyuvante completo de Freund. Se inmunizan los conejos de laboratorio según un protocolo convencional y se les extrae sangre. Se somete a ensayo la presencia de anticuerpos específicos mediante ensayos de inmunosorción en fase sólida usando el correspondiente polipéptido inmovilizado, véase, por ejemplo la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Polipéptidos de Smac inmunogénicos que producen conjugados de anticuerpo policlonal de conejo específico: polipéptido-KLH inmunizados según el protocolo descrito anteriormente

	Secuencia de polipéptido	Inmunogenicidad
5		
10	SEQ ID NO:2, residuos 1-8	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 4-13	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 7-17	+++
15	SEQ ID NO:2, residuos 13-24	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 18-27	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 35-49	+++
20	SEQ ID NO:2, residuos 47-54	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 71-78	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 83-92	+++
25	SEQ ID NO:2, residuos 115-124	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 141-148	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 166-174	+++
30	SEQ ID NO:2, residuos 176-184	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 183-191	+++
35	SEQ ID NO:2, residuos 192-200	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 201-208	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 209-216	+++
40	SEQ ID NO:2, residuos 215-222	+++
	SEQ ID NO:2, residuos 223-231	+++
45	SEQ ID NO:2, residuos 232-239	+++

Los polipéptidos objeto y fragmentos de los mismos están aislados o son puros: un polipéptido “aislado” no está acompañado por al menos parte del material con el que está asociado en su estado natural, preferiblemente constituyendo al menos aproximadamente el 0,5%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 5% en peso del polipéptido total en una muestra dada y un polipéptido puro constituye al menos aproximadamente el 90%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 99% en peso del polipéptido total en una muestra dada. Los polipéptidos pueden sintetizarse, producirse mediante tecnología recombinante o purificarse a partir de células. Se dispone de una amplia variedad de métodos moleculares y bioquímicos para la síntesis bioquímica, expresión molecular y purificación de las composiciones objeto, véase, por ejemplo Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.* Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., terscience, NY) o que se conocen por lo demás en la técnica.

La invención proporciona agentes de unión específicos para los polipéptidos objeto, métodos de identificación y preparación de tales agentes, y su uso. Por ejemplo, los agentes de unión específicos son útiles en una variedad de aplicaciones de diagnóstico e industriales e incluyen receptores de polipéptidos sometidos a recombinación somática como anticuerpos específicos o receptores de antígenos de células T (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory), agentes de unión intracelular identificados con ensayos tales como selecciones de un solo, doble y triple híbrido, agentes de unión intracelular no naturales identificados en selecciones de bibliotecas químicas tal como se describe a continuación, etc. En consecuencia, la invención proporciona secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) y bibliotecas de tales secuencias.

Las secuencias de CDR objeto encuentran una amplia variedad de aplicaciones. En una realización, se usan las secuencias de CDR objeto para sintetizar polipéptidos que proporcionan, a su vez, varias aplicaciones, incluyendo micromatrices inmunológicas, reactivos de afinidad, etc. Además de la síntesis directa, también pueden expresarse los polipéptidos de CDR objeto en sistemas celulares y libres de células (por ejemplo, Jerumtius L, *et al.*, Curr Opin Biotechnol. oct. de 1998; 9(5):534-48) a partir de polinucleótidos que codifican para ellos, tales como los correspondientes polinucleótidos originales o polinucleótidos que codifican para ellos de manera natural aislados con cebadores de oligonucleótidos degenerados y sondas generadas a partir de las secuencias de polipéptidos objeto (software "GCG", Genetics Computer Group, Inc, Madison WI) o polinucleótidos optimizados para sistemas de expresión seleccionados preparados mediante traducción inversa de los polipéptidos objeto de acuerdo con algoritmos informáticos (por ejemplo, Holler *et al.* (1993) Gene 136, 323-328; Martin *et al.* (1995) Gene 154, 150-166). Generalmente, los polipéptidos de CDR se expresan y usan como el dominio de unión de una inmunoglobulina o fragmento de la misma.

La invención proporciona métodos eficaces de identificación de agentes, compuestos o compuestos líder para agentes que modulan la capacidad de los polipéptidos objeto para interactuar con una diana de unión. Se proporciona una amplia variedad de ensayos para agentes de unión incluyendo ensayos de unión proteína-proteína *in vitro* marcados, inmunoensayos, ensayo de activación de caspasas, ensayos basados en células tales como ensayos de apoptosis, etc. Los métodos son apropiados para la selección de alto rendimiento rentable, automatizada de bibliotecas químicas para determinar compuestos líder. Los ensayos de unión *in vitro* emplean una mezcla de componentes que incluyen el polipéptido objeto, que puede ser parte de un producto de fusión con otro péptido o polipéptido, por ejemplo una etiqueta para la detección o anclaje, etc. Las mezclas de ensayo comprenden una diana de unión. En una realización particular, la diana de unión es un anticuerpo específico para el polipéptido. Aunque pueden usarse dianas de unión nativas de longitud completa, frecuentemente se prefiere usar partes de las mismas siempre que la parte proporcione una afinidad de unión y avidez por el polipéptido objeto que pueden medirse de manera conveniente en el ensayo. La mezcla de ensayo también comprende un agente farmacológico candidato. Los agentes candidatos engloban numerosas clases químicas, aunque normalmente son compuestos orgánicos; preferiblemente compuestos orgánicos pequeños y se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos naturales o sintéticos. También puede incluirse en la mezcla una variedad de otros reactivos. Éstos incluyen reactivos como sales, tampones, proteínas neutras, por ejemplo pueden usarse albúmina, detergentes, inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc. Se incuban la mezcla resultante en condiciones mediante las cuales, salvo por la presencia del agente farmacológico candidato, el polipéptido se une específicamente a la diana de unión, parte o análogo con una afinidad de unión de referencia. Los componentes de la mezcla pueden añadirse en cualquier orden que proporcione las uniones requeridas y pueden realizarse las incubaciones a cualquier temperatura que facilite una unión óptima. Se seleccionan asimismo los periodos de incubación para una unión óptima pero también se minimizan para facilitar una rápida selección de alto rendimiento. Tras la incubación, se detecta la unión sesgada por el agente entre el polipéptido y una o más dianas de unión de cualquier manera conveniente. Puede usarse una variedad de métodos para detectar el marcador dependiendo de la naturaleza del marcador y otros componentes del ensayo, por ejemplo, mediante densidad óptica o electrónica, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiactivas, etc. o detectarse indirectamente con conjugados de anticuerpo, etc. Una diferencia en la afinidad de unión del polipéptido a la diana en ausencia del agente, en comparación con la afinidad de unión en presencia del agente, indica que el agente modula la unión del polipéptido a la diana de unión. Una diferencia, tal como se usa en el presente documento, es estadísticamente significativa y representa preferiblemente una diferencia de al menos un 50%, más preferiblemente de al menos un 90%.

Las secuencias de polinucleótidos objeto encuentran una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, también se usan las secuencias de polinucleótidos para detectar específicamente secuencias de Smac, particularmente la SEQ ID NO:1, su complemento inverso o un fragmento de los mismos, preferiblemente al menos uno de SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO: 1, nucleótidos 525-720, un complemento inverso de cualquiera, o un fragmento de cualquiera de los mismos, o polinucleótidos que comprenden tales secuencias. Puede usarse cualquier método de detección de secuencias conveniente. En una realización, se determinan secuencias candidatas o desconocidas y se comparan con una secuencia descrita para clasificar las secuencias candidatas o desconocidas. Por ejemplo, puede usarse un algoritmo tal como BLAST (por ejemplo, Build so12.5-x86 01:40:37 05-Feb-1998, Copyright (C) 1997 Warren R. Gish, usando los parámetros por defecto, Altschul *et al.*, Métodos in Enzymology, 215: 403-410 (1997)) para definir la relación con una o más secuencias objeto diagnósticas de relación con Smac en métodos basados en la informática.

En otra realización, se usan las secuencias descritas para sintetizar y/o se realizan en polinucleótidos que proporcionan, a su vez, varias aplicaciones, incluyendo metodologías basadas en micromatrices, véanse, por ejemplo, Nat Genet enero de 1999; 21 (1 Supl.), tema completo incl. Debouck C, *et al.* en 48-50; análisis de expresión génica, véanse, por ejemplo, Carulli JP, *et al.*, J Cell Biochem Suppl 1998; 30-31:286-96; diseño y descubrimiento de dianas farmacológicas, véase, por ejemplo Jones DA, *et al.*, Curr Opin Chem Biol feb. de 1999; 3(1):71-6; química combinatoria, véase, por ejemplo Lukas TJ, *et al.*, J Med Chem. 11 marzo de 1999; 42(5):910-919; ribozimas y agentes terapéuticos, véase por ejemplo Rossi JJ, Chem Biol feb. de 1999; 6(2):R33-7; mapeo; etc. En una realización, pueden aislarse, compararse y/o clasificarse polinucleótidos candidatos y/o desconocidos (por ejemplo mediante su relación) mediante hibridación con uno o más polinucleótidos descritos, por ejemplo, usando bibliotecas de micromatrices de los polinucleótidos descritos. También pueden usarse tales polinucleótidos como sondas y/o cebadores para ubicar, aislar, amplificar, etc., transcritos y genes naturales. En otra realización, los polinucleótidos descritos o fragmentos o bibliotecas de tales polinucleótidos se transfectan en células para una amplia variedad de aplicaciones de clonación,

presentación, expresión, etc., incluyendo sistemas de "n" híbridos, véanse, por ejemplo Vidal M, *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res. 27(4):919-929 & Proc Natl Acad Sci USA. 93(19):10315-20 y 10321-6; mapeo de interacciones proteína-ligando usando bibliotecas de presentación en fago de genoma completo, véanse por ejemplo Palzkill T, *et al.*, Gene 9 oct. de 1998; 221 (1):79-83; selección basada en ADN y selección de ligandos peptídicos, véase, por ejemplo, Bartoli F, *et al.*, Nat Biotechnol nov. de 1998; 16 (11):1068-73, etc.

En una realización particular, la invención proporciona micromatrices de los polinucleótidos descritos y sus usos tal como se describe o cita en el presente documento. Se conoce una amplia variedad de materiales y métodos en la técnica para formar matrices de polinucleótidos en elementos diferenciados de sustratos tales como vidrio, silicio, plástico, membranas de nylon, etc., incluyendo la deposición por contacto, por ejemplo las patentes estadounidenses números 5.807.522; 5.770.151, DeRisi JL, *et al.* Curr Opin Oncol enero de 1999; 11(1):76-9, etc.; métodos basados en fotolitografía, por ejemplo las patentes estadounidenses números 5.861.242; 5.858.659; 5.856.174; 5.856.101; 5.837.832, Lipshutz RJ, *et al.* Nat Genet enero de 1999; 21(1 Supl.):20-4, etc.; tecnologías de dispensación por chorro de tinta, por ejemplo, Lemmo AV, *et al.*, Curr Opin Biotechnol dic. de 1998; 9(6):615-7; métodos basados en trayectorias de flujo, por ejemplo la patente estadounidense número 5.384.261; métodos basados en nanolitografía de pluma inmersa ("dip-pen"), por ejemplo Piner, *et al.*, Science 29 de enero de 1999: 661-663, etc.; etc.

La invención también proporciona polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO:1, o con su complemento inverso. En una realización particular, la invención engloba un primer polinucleótido recombinante que comprende una secuencia de al menos 36, preferiblemente al menos 48, más preferiblemente al menos 96 nucleótidos de longitud, teniendo la secuencia similitud de secuencia con un segundo polinucleótido que consiste en la SEQ ID NO:1, preferiblemente SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-720, o un complemento inverso de los mismos, de tal manera que la secuencia y el segundo polinucleótido hibridan específicamente en la condición de hibridación n° 1, preferiblemente n° 2, más preferiblemente n° 3, etcétera hasta n° 10, tal como se identifica y enumera en las tablas A-C. Así, por ejemplo, si se prefiere la condición de hibridación n° 7, entonces las condiciones usadas para identificar y clasificar polinucleótidos relacionados u homólogos emplean el tampón de hibridación M a una temperatura de hibridación de 40°C, y el tampón de lavado E a una temperatura de lavado de 55°C. La condición n° 1 identifica polinucleótidos que tienen al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 50% con el polinucleótido diana (con el % de identidad calculado tal como se describe en el presente documento). Con cada condición posterior, la rigurosidad es tal que el polinucleótido aislado tiene una identidad de secuencia de al menos un 5% superior al que se aislaría usando el siguiente número de condición inferior. Así, por ejemplo, la condición n° 2 identifica polinucleótidos que tienen al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 55% con el polinucleótido diana, y las condiciones n° 9 y n° 10 identifican polinucleótidos que tienen al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 90% y el 95%, respectivamente, con el polinucleótido diana.

La SEQ ID NO:1 se deriva de un transcrito humano natural que codifica para una Smac natural (véanse los ejemplos, a continuación). Los polinucleótidos de hibridación de rigurosidad superior a modo de ejemplo de SEQ ID NO:1 (que tienen identidades de secuencia con la SEQ ID NO:1 de aproximadamente el 95%) se designan como SEQ ID NO:3-5 y los polinucleótidos de hibridación de rigurosidad inferior a modo de ejemplo de la SEQ ID NO:1 (que tienen identidades de secuencia con la SEQ ID NO:1 de aproximadamente el 90%) se designan como SEQ ID NO:6-8 en la lista de secuencias. En las situaciones en las que se desea clasificar polinucleótidos relacionados más estrechamente, se aumenta la condición de hibridación en incrementos de uno, hasta que se obtiene la especificidad deseada. Preferiblemente, cada polinucleótido de hibridación tiene una longitud que es de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 50%, más preferiblemente de al menos el 70% y lo más preferiblemente de al menos el 90% de la longitud de la secuencia de polinucleótido descrita en el presente documento con la que hibrida.

En las tablas A y B, se expresa la formamida como porcentaje (v/v) en un diluyente tamponado que comprende 1X a 6X SSC (1X SSC es NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM; SSPE puede sustituirse por SSC, 1X SSPE es NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4). Se conocen bien en la técnica procedimientos para hibridaciones de polinucleótidos (véanse Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989; Shilo y Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 78, 6789-6792; y publicación PCT WO 99/01466).

ES 2 288 924 T3

TABLA A

TABLA B

Tampón de hibridación	X SSC	% de formamida	Tampón de lavado	X SSC
G	1	25	A	0,2
H	2	25	B	0,3
I	3	25	C	0,4
J	4	25	D	0,5
K	5	25	E	0,6
L	6	25	F	0,8
M	1	0	G	1
N	2	0	H	2
O	3	0	I	3
P	4	0	J	4
Q	5	0	K	5
R	6	0	L	6

TABLA C

N° de condición de hibridación	Tampón de hibridación	Temperatura de hibridación	Tampón de lavado	Temperatura de lavado
1	R	25°C	L	35°C
2	R	25°C	L	40°C
3	R	27°C	L	47°C
4	R	34°C	H	45°C
5	R	40°C	F	45°C
6	O	40°C	E	50°C
7	M	40°C	E	55°C
8	L	42°C	D	60°C
9	H	42°C	C	65°C
10	G	42°C	B	70°C

La invención también proporciona fragmentos de los polinucleótidos homólogos y/o originales que pueden usarse en los métodos anteriores, especialmente como sondas de hibridación de ácidos nucleicos y cebadores de replicación/amplificación. Estos fragmentos son de longitud suficiente para hibridar específicamente con la correspondiente SEQ ID NO o complemento de la misma, que comprende generalmente al menos 12, preferiblemente al menos 24, más preferiblemente al menos 36 y lo más preferiblemente al menos 96 nucleótidos contiguos de la correspondiente SEQ ID NO (véase, por ejemplo la tabla 2).

ES 2 288 924 T3

TABLA 2

Fragmentos de polinucleótido de Smac a modo de ejemplo que hibridan con una cadena de la SEQ ID NO:1 en la condición de hibridación nº 5

	Fragmento de polinucleótido	Hibridación
5	SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-24	+
10	SEQ ID NO:1, nucleótidos 18-42	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 45-69	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 75-92	+
15	SEQ ID NO:1, nucleótidos 116-141	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 166-199	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 211-234	+
20	SEQ ID NO:1, nucleótidos 255-299	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 359-383	+
25	SEQ ID NO:1, nucleótidos 436-460	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 491-513	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-548	+
30	SEQ ID NO:1, nucleótidos 575-598	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 624-648	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 644-669	+
35	SEQ ID NO:1, nucleótidos 649-672	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 654-677	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 665-688	+
40	SEQ ID NO:1, nucleótidos 687-710	+
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 697-720	+

45 Los polinucleótidos objeto incluyen fragmentos de las secuencias enumeradas que tienen una secuencia específica de Smac. Los fragmentos preferidos comprenden al menos 34, preferiblemente al menos 36, preferiblemente al menos 56, más preferiblemente al menos 96, más preferiblemente al menos 186 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:1, particularmente de al menos uno de SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-720, un complemento inverso de cualquiera. Los polinucleótidos objeto y fragmentos de los mismos pueden unirse a otros componentes tales como marcadores u otras secuencias de polinucleótidos/polipéptidos (es decir, pueden ser parte de secuencias mayores) y son de secuencias sintéticas/no naturales y/o están aislados, es decir, no están acompañados por al menos parte del material con el que están asociados en su estado natural, preferiblemente constituyendo al menos aproximadamente el 0,5%, preferiblemente al menos aproximadamente el 5% en peso del ácido nucleico total presente en una fracción dada, y normalmente recombinante, significando que comprenden una secuencia no natural o una secuencia natural unida al/a el/los nucleótido(s) distinto(s) de al/a los que está unida en un cromosoma natural. Los polinucleótidos recombinantes que comprenden las SEQ ID NO objeto, o fragmentos de las mismas, contienen tal secuencia o fragmento en un extremo terminal, inmediatamente flanqueado por (es decir, contiguo a) una secuencia distinta de a la que está unida en un cromosoma natural, o flanqueado por una región flanqueante nativa inferior a 10 kb, preferiblemente inferior a 2 kb, más preferiblemente inferior a 500 bases, lo más preferiblemente inferior a 100 bases, que está en un extremo terminal o está flanqueado inmediatamente por una secuencia distinta de a la que está unida en un cromosoma natural. Aunque los ácidos nucleicos son normalmente ARN o ADN, a menudo es ventajoso usar ácidos nucleicos que comprenden otras bases o análogos de nucleótidos para proporcionar una estabilidad modificada, etc.

Ejemplos

I. Construcción de una micromatriz de ADN y uso para mediciones de la expresión de Smac

- 5 Se realizó la expresión génica comparativa usando bibliotecas de polinucleótidos formados como micromatrices sustancialmente tal como describen DeRisi, *et al.* Science 24 de octubre de 1997; 278: 680-686. El diseño y la construcción del equipo robotizado para la fabricación de micromatrices ("microarrayer") se realizan tal como se publicó el 10 de agosto de 1998 por Brown *et al.*, Departamento de Bioquímica de la Universidad de Stanford, en <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>. Todos los procedimientos se realizan a temperatura ambiente y con agua bidestilada a menos que se indique lo contrario. Software: J. DeRisi y V. Iyer (1999) ArrayMaker v1.5, publicado el 15 de feb. de 1999 en <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/software.html>.

1. Preparación de portaobjetos

		Mate- riales	Cdad.	Información de pedido
15	Portaobjetos de microscopio de vidrio	60	Gold Seal n°3010	
20	Gradillas de portaobjetos	2	Shandon Lipshaw n°121	<= cada gradilla contiene 30 portaobjetos
25	Cámara de portaobjetos	6	Shandon Lipshaw n°121	<= cada cámara contiene 350 ml
30	ddH ₂ O	~ 5 l		
35	NaOH	70 g		
	Etanol al 95%	420 ml		
40	Poli-L-lisina	70 ml	Sigma n°P 8920	
	PBS para cultivo tisular	70 ml		
45	Horno de vacío (45°C)			
	Caja de portaobjetos	1	Research Products International n°163000	

50

1. Se colocan los portaobjetos en las gradillas de portaobjetos. Se colocan las gradillas en las cámaras.

55 2. Se prepara la disolución de limpieza: se disuelven 70 g de NaOH en 280 ml de ddH₂O. Se añaden 420 ml de etanol al 95%. El volumen total es de 700 ml (= 2 X 350 ml); se agita hasta que se mezcle por completo. Si la disolución sigue siendo turbia, se añade ddH₂O hasta que sea transparente.

60 3. Se vierte la disolución en las cámaras con portaobjetos; se cubren las cámaras con tapas de vidrio. Se mezcla en un agitador orbital durante 2 h. Una vez que los portaobjetos están limpios, deben exponerse al aire lo menos posible. Las partículas de polvo interferirán en el recubrimiento y la impresión.

65 4. Se transfieren rápidamente las gradillas a cámaras nuevas llenas de ddH₂O. Se aclaran vigorosamente sumergiendo y sacando las gradillas. Se repiten 4 veces los aclarados con ddH₂O. Es crítico eliminar todas las trazas de NaOH-etanol.

5. Se prepara la disolución de polilisina: 70 ml de poli-L-lisina + 70 ml de PBS para cultivo tisular en 560 ml de agua. Se usa una probeta y un vaso de precipitados de plástico.

ES 2 288 924 T3

6. Se transfieren los portaobjetos a la disolución de polilisina y se agitan durante 15 min. - 1 h.

7. Se transfiere la gradilla a cámaras nuevas llenas de ddH₂O. Se sumerge y saca 5 veces para aclararlo.

5 8. Se centrifugan los portaobjetos sobre soportes de placas de microtitulación (se ponen toallitas de papel debajo de la gradilla para absorber el líquido) durante 5 min. a 500 rpm. Se transfieren las gradillas de portaobjetos para vaciar las cámaras con cubiertas para el transporte hasta el horno de vacío.

9. Se secan las gradillas de portaobjetos en el horno de vacío a 45°C durante 10 min. (El vacío es opcional).

10

10. Se guardan los portaobjetos en cajas de portaobjetos cerradas.

11. Antes de imprimir las matrices: se revisa un portaobjetos de muestra para garantizar que es hidrófobo, una gota de agua debe resbalar de él. Se revisa que el recubrimiento de polilisina no sea opaco. Someter a prueba los portaobjetos de impresión, híbrido y muestra de barrido para determinar la calidad del lote de portaobjetos.

15

2. Preparación de muestras de ADN

20 Se amplifican clones de polinucleótidos originales mediante PCR en un formato de 96 pocillos con cebadores unidos por el extremo amino en el extremo 5'. Se suspenden los productos de PCR purificados a una concentración de ~0,5 mg/ml en 3x SSC, y ~5 ng de cada producto formado como matriz sobre vidrio recubierto por medio de los procedimientos descritos a continuación. Se forman como matriz un total de 10.000 elementos sobre un área de 1,8 cm por 1,8 cm con los elementos separados 175 mm.

25

Precipitaciones de ADN

1. Se transfiere ADN a placas de cultivo tisular de fondo en V de 96 pocillos (Costar).

30

2. Se añade 1/10 vol. de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) + un volumen igual de isopropanol. Se almacena a -20°C durante unas cuantas horas.

3. Se centrifuga en Sorvall a 3500 rpm durante 45 min.

35

4. Se aclara con etanol al 70%, se centrifuga de nuevo.

5. Se seca al aire durante la noche cubriendo las placas con papel de aluminio o invirtiendo las placas sobre toallitas de papel. Alternativamente, se secan las placas en un Speed-vac (5 min.).

40

5. Se resuspende el ADN en 30 µL de 3X SSC durante la noche.

6. Se transfiere en alícuotas de 4 µL a placas de 384 pocillos (Coming Costar nº 6557) para preparar conjuntos de placas de impresión por septuplicado. Se sellan bien las placas con papel de aluminio (R.S. Hughes nº 425-3) para su almacenamiento. Para el almacenamiento a largo plazo, se secan los conjuntos de placas de impresión y se almacenan a temperatura ambiente. Antes de su uso, se resuspenden los sedimentos en 4 µL de dH₂O durante la noche.

45

7. Se pone el ADN sobre los portaobjetos de polilisina con un equipo de fabricación de matrices de 16 puntas. Se secan las placas de impresión para su almacenamiento entre el uso por 2ª y 3ª vez.

50

3. Procesamiento posterior de las matrices

Entonces se procesan posteriormente las micromatrices para fijar el ADN a la superficie de vidrio antes de la hibridación con el procedimiento descrito a continuación:

55

60

65

ES 2 288 924 T3

	Materiales para 30 matrices	Cdad.	Información de pedido
	Cámara húmeda	1	Sigma n°H 6644
5	Bloque térmico invertido (70-80°C)	1	
	Punta trazadora de diamante	1	VWR n°52865-005
10	Gradilla de portaobjetos	1	Shandon Lipshaw n°121
	Cámara de portaobjetos	2	Shandon Lipshaw n°121
15	Anhídrido succínico	5,5 g	Aldrich n°23.969-0
	1-Metil-2-pirrolidinona	325 ml	Aldrich n°32.863-4
20	Borato de sodio (1 M, pH 8)	25 ml	<= Se usa ácido bórico y se ajusta el pH con NaOH
	ddH ₂ O	~ 1 l	
25	Vaso de precipitados de 2 l	1	
	Etanol al 95%	350 ml	
30	1. Se rehidratan las matrices: Se llena el fondo de la cámara húmeda con 1X SSC. Se ponen las matrices bocabajo sobre IX SSC y se cubre la cámara con la tapa. Se rehidrata hasta que brillan los puntos de la matriz. Se deja que los puntos se hinchen ligeramente pero no que se encuentren unos con otros.		
35	2. Se seca rápidamente cada matriz (con el lado del ADN hacia arriba) en un bloque térmico invertido a 70-80°C durante 3 segundos.		
	3. Se marcan los límites de la matriz en la parte trasera del portaobjetos usando la punta trazadora de diamante. La matriz se volverá invisible tras el procesamiento posterior.		
40	4. Se retícula con UV el ADN al vidrio con un Stratalinker fijado para 65 mJ. (Se fija la pantalla en "650", que es 650 x 100 µJ.) (Opcional.)		
45	5. Se ponen las matrices en una gradilla de portaobjetos. Se tiene la cámara de portaobjetos vacía, lista sobre el agitador orbital.		
	6. Se prepara la disolución de bloqueo: Se disuelven 5,5 g de anhídrido succínico en 325 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Inmediatamente después de que se disuelva el anhídrido succínico, se añaden 25 ml de borato de sodio.		
50	7. Inmediatamente después de que se mezcle la disolución de borato de sodio, se vierte la disolución en la cámara de portaobjetos vacía. Se sumerge la gradilla de portaobjetos en la disolución varias veces. Se mezcla en el agitador orbital durante 15-20 min. Mientras tanto, se calientan ~700 ml de agua (suficiente para cubrir la gradilla de portaobjetos) hasta 95°C en un vaso de precipitados de 2 l.		
55	8. Se sumerge suavemente la gradilla de portaobjetos en agua a 95°C durante 2 min.		
	9. Se sumerge la gradilla de portaobjetos 5 veces en etanol al 95%.		
60	10. Se centrifugan los portaobjetos sobre soportes de placas de microtitulación (se ponen toallitas de papel debajo de la gradilla para absorber el líquido) durante 5 min. a 500 rpm.		
	11. Se usan las matrices inmediatamente o se guardan en una caja de portaobjetos. Se centrifuga durante 1 min. a alta velocidad.		
65	4. <i>Hibridación de matrices</i>		
	Se almacenan todas las mediciones en una base de datos informática para el análisis que demuestran expresión específica de Smac. Instrucciones para las sondas de ADN fluorescentes:		

ES 2 288 924 T3

1. El volumen de sonda final debe ser de 10-12 μ l, a 4X SSC, conteniendo ADN competidor etc. según se requiera.
2. Se establece la matriz en la cámara de hibridación. Se ponen 10 μ l de 3X SSC sobre el borde del portaobjetos para proporcionar humedad.
3. Se añaden 0,3 μ l de SDS al 10% a la sonda.
4. Se lleva a ebullición la sonda durante 2 min.
5. Se pipetea la sonda sobre la matriz, y se pone suavemente un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm sobre ella.
6. Se cierra la cámara de hibridación y se sumerge en un baño de agua a 63°C.
7. Se hibrida durante 4-24 h.
8. Se desmonta la cámara de hibridación y se aclara la matriz en 1X SSC/SDS al 0,03%.
9. Se transfiere la matriz a una gradilla de portaobjetos nueva y se aclara una 2ª vez con 0,2X SSC.
10. Se aclara una 3ª vez con 0,05X SSC. Es crítico eliminar todo el SDS:
11. Se centrifugan los portaobjetos sobre soportes de placas de microtitulación (se ponen toallitas de papel debajo de la gradilla para absorber el líquido) durante 5 min. a 500 rpm.
12. Se barre la matriz inmediatamente.

II. Identificación y caracterización de polipéptidos y polinucleótidos de Smac naturales

Identificación de Smac. En un experimento, se observó por casualidad que los extractos celulares preparados en un tampón que contenía detergentes tenían significativamente más actividad de activación de la caspasa-3 comparado con los preparados en el tampón sin detergente. Razonando que podría haber un factor unido a la membrana que promueve la activación de la caspasa-3 además de los factores solubles en agua conocidos Apaf-1, citocromo c, y procaspasa-9, se solubilizó el sedimento de membrana en un detergente y se añadió de nuevo al sobrenadante centrifugado a 100.000 x g de extractos solubles en tampón, (S-100). Los extractos de membrana solubilizados (SME, “solubilized membrane extracts”) con detergente no tuvieron actividad de activación de la caspasa-3 por sí mismos, pero estimularon significativamente la actividad de activación de la caspasa-3 cuando se añadieron a la fracción S-100. Simplemente añadir la misma cantidad de detergente a S-100 no tuvo efecto sobre la activación de la caspasa-3. Este experimento indica que hay un factor que promueve la activación de la caspasa-3 en la fracción de membrana del que normalmente carece la fracción soluble en agua.

Los experimentos previos de fraccionamiento y reconstitución bioquímicos basados solamente en los extractos S-100 han permitido identificar tres proteínas que son necesarias y suficientes para reconstituir la reacción de activación de la caspasa-3 en presencia de dATP 1 mM. Estas proteínas son Apat-1, una proteína de 130 kDa que es el homólogo de mamífero de la proteína CED-4 en *C. elegans* (Zou *et al.*, 1997; Yuan y Horvitz 1992 Development 116, 309-320); procaspasa-9 (Li *et al.*, 1997), y citocromo c que se liberaba en la S-100 durante el procedimiento de homogeneización (Liu *et al.*, 1996). Para examinar si los extractos de membrana solubilizados con detergente contienen proteínas que sustituyen a Apaf-1, o citocromo c, o procaspasa-9, en primer lugar se sometió a inmunodepleción estas tres proteínas individualmente a partir de los extractos S-100 y se añadió la fracción de membrana solubilizada con detergente a estos extractos sometidos a depleción. No se observó actividad de activación de la caspasa-3 en estos extractos sometidos a depleción, lo que indica que este factor no puede sustituir a Apaf-1, citocromo c, o procaspasa-9. Además, la actividad de este factor depende de la presencia de Apaf-1, citocromo c, y procaspasa-9. Se denominó esta actividad Smac para el segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias, porque esta proteína está ubicada normalmente en las mitocondrias.

Purificación de Smac. Usando un experimento de reconstitución como ensayo, se fraccionó la fracción de membrana procedente de células HeLa en cultivos grandes solubilizadas en CHAPS al 0,5%. Se puntuó la actividad de Smac por su capacidad para estimular la activación de la caspasa-3 en S-100. Se logró la purificación de Smac mediante un procedimiento de seis etapas (véase Procedimientos experimentales, a continuación). Se eluyó la actividad Smac desde una columna Mono Q como un único pico a NaCl ~250 mM. Se sometieron las mismas fracciones de proteína a SDS-PAGE seguido por tinción con plata. Una banda de proteína que migró a 25 kDa se correlacionó con la actividad Smac. Smac nativo corre ~100 kDa en una columna de filtración en gel, lo que indica que Smac es un homotetrámero. Una proteína contaminante de 50 kDa que también se observó en la fracción activa no se correlacionó con el pico de actividad.

Clonación molecular de Smac. La banda de proteína de 25 kDa procedente de las fracciones 3 y 4 eluida de la columna Mono Q se sometió a digestión trípica. Se purificaron los cuatro péptidos resultantes mediante HPLC en fase inversa y se secuenciaron mediante el método de degradación de Edman. Las búsquedas en bases de datos revelaron que estas secuencias peptídicas coinciden con un ADNc no caracterizado previamente en la base de datos de

EST (T53449). Usando la secuencia de EST como sonda, se clonó un ADNc que codifica para Smac a partir de una biblioteca de ADNc de células HeLa. El ADNc y la secuencia de aminoácidos codificada se describen como la SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente. Se encontró un codón de terminación en el marco antes de la metionina de iniciación, lo que indica que el ADNc codifica para la región codificante de longitud completa de Smac. Se usó la secuencia proteica de longitud completa de Smac para hacer una búsqueda frente a la base de datos de proteínas (GeneBank y Prosite) y no se encontró ninguna secuencia de proteína o motivo que sea homólogo a Smac.

Para someter a prueba la distribución tisular de Smac, se realizó un análisis de transferencia de tipo Northern usando inmunotransferencias de ARNm procedentes de múltiples tejidos de adulto humano. En todos los tejidos examinados, se detectó un ARNm predominante de ~1,5 kb, lo que indica la expresión ubicua de Smac. La mayor expresión de ARNm de Smac fue en los testículos de adulto y elevada en corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovario. La expresión de ARNm de Smac es baja en cerebro, pulmón, timo y leucocitos de sangre periférica.

Smac es una proteína mitocondrial que se libera en el citosol durante la apoptosis. Para localizar la ubicación exacta de Smac en las células, se generó un anticuerpo policlonal contra la Smac recombinante expresada en bacterias (aminoácidos 95-239) y se usó este anticuerpo para ubicar Smac mediante inmunotinción y fraccionamiento biológico. La inmunotinción de células vivas mediante el anticuerpo contra Smac reveló un patrón punteado de ubicación mitocondrial, ubicación conjunta con citocromo c. Sin embargo, cuando las células experimentaron apoptosis inducida por irradiación UV, tanto la tinción de Smac como de citocromo c cambiaron de un patrón mitocondrial punteado a un patrón citosólico más difuso. Ambas proteínas comenzaron a mostrar una tinción citosólica difusa 2 horas después de la irradiación UV y el patrón se hizo más evidente después de 8 horas. Las células que mostraron la distribución más difusa de citocromo c y Smac también demostraron tener cromatina condensada, tal como se midió mediante tinción con DAPI.

Para confirmar adicionalmente los resultados de inmunotinción, se aislaron las fracciones mitocondrial y citosólica de células HeLa normales o irradiadas con UV. En las células vivas, Smac y citocromo c estaban ubicados exclusivamente en las fracciones mitocondriales. 2 Horas después de la irradiación UV, tanto el citocromo c como Smac se observaron en la fracción citosólica. Smac y citocromo c citosólicos siguieron aumentando hasta las 8 horas con la correspondiente disminución de sus homólogos mitocondriales.

Smac de 25 kDa es necesaria para la actividad de estimulación de la activación de la caspasa-3. Para confirmar que la Smac de 25 kDa se requiere rotundamente para la actividad que promueve la activación de la caspasa-3, se usó el anticuerpo policlonal contra Smac para someterla a inmunodepleción a partir de los extractos de membrana solubilizados (SME) con detergente brutos. La inmunodepleción usando antisuero anti-Smac eliminó cuantitativamente la proteína de 25 kDa de los SME. El extracto sin la proteína de 25 kDa perdió su capacidad para estimular la activación de la caspasa-3 en S-100, lo que indica que la Smac de 25 kDa es necesaria para tal actividad. El suero preinmunizado del mismo animal no sometió a inmunodepleción la Smac de 25 kDa Smac ni la actividad de estimulación de la activación de la caspasa-3 a partir de SME.

La maduración de Smac requiere la escisión de su péptido señal. Para caracterizar adicionalmente la actividad Smac, se expresó el ADNc de longitud completa que codifica para Smac en un sistema de expresión de baculovirus. Se purificó la Smac recombinante hasta homogeneidad. Aunque el ADNc de longitud completa de Smac codifica para un marco de lectura abierto de 239 aminoácidos con un peso molecular de 27 kDa, Smac purificado a partir tanto de células HeLa como Sf-21 es aproximadamente de 25 kDa, menor que el marco de lectura abierto completo. El análisis de rueda helicoidal ("helical wheel") reveló que la región N-terminal de Smac se asemeja a una secuencia señal de direccionamiento mitocondrial típica: una hélice alfa con cadenas laterales de aminoácidos cargados positivamente en un lado (Arg-10, Arg-17, Arg-19, Lys-31, Lys- 32, Arg-33, Arg-40) (Revisado por Schatz y Dobberstein, 1996 Science 271, 1519-1526). El análisis de secuenciación directa indicó que la Smac madura purificada de células Sf-21 comenzaba en el aminoácido 56. Que la Smac de 25 kDa recombinante Smac expresada en células Sf-21 es completamente activa, indica que los aminoácidos 1-55 es el péptido señal de direccionamiento mitocondrial que se escindió posteriormente. También se observó Smac de longitud completa con su péptido señal intacto mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western en células Sf-21 infectadas con vector de baculovirus que contiene Smac de longitud completa. La Smac de longitud completa no mostró ninguna actividad, lo que indica que la escisión del péptido señal dentro de las mitocondrias es una etapa requerida para que Smac adquiera su actividad apoptótica.

Smac aumenta la sensibilidad de las células a los estímulos apoptóticos *in vivo*. Para estudiar el papel de Smac *in vivo*, se transfectaron transitoriamente células HeLa con Smac de longitud completa fusionado con una etiqueta FLAG en el extremo C-terminal de la proteína. La Smac expresada de manera transitoria en células no indujo la activación de la caspasa-3 ni la apoptosis sin estímulos apoptóticos. La Smac marcada con etiqueta FLAG estaba ubicada exclusivamente en las mitocondrias. Entonces se irradiaron las células transfectadas bajo una lámpara UV con una duración de tiempo creciente. Tras 2 segundos de irradiación UV, ~60% de las células transfectadas con Smac mostraron signos de apoptosis, tal como se midió mediante la condensación de su cromatina. También se observó caspasa-3 activa en extractos de estas células mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western y ensayo enzimático. Por el contrario, sólo ~20% de las células transfectadas con vector mostraron signos de apoptosis en las mismas condiciones y se detectó poca actividad de caspasa-3. Con una exposición a UV más larga, se observó más apoptosis y actividad de caspasa-3 pero la diferencia entre las células transfectadas con Smac y vector se volvió menor.

Smac promueve la activación de la caspasa-3 sin dATP exógeno y en presencia de una concentración fisiológica de sal de potasio. Los estudios bioquímicos previos sobre la activación de la caspasa-3 han identificado que Apaf-1, procaspasa-9 y citocromo c son necesarios y suficientes para la activación de la caspasa-3 (Zou *et al.*, 1999). La reacción de activación requiere una concentración óptima de dATP a 0,1 mM y KCl a 10 mM. *In vivo*, sin embargo, la concentración de dATP es de aproximadamente 10 mM y la de la sal de potasio de aproximadamente 150 mM, una concentración que es inhibidora para la activación de la caspasa-3 catalizada por Apaf-1, citocromo c y procaspasa-9. Para someter a prueba si la presencia de Smac promueve la activación de la caspasa-3 en concentraciones fisiológicas de dATP y sal de potasio, se añadió Smac recombinante purificada procedente de la expresión en baculovirus a S-100 dializado y se sometió a ensayo para determinar la activación de la caspasa-3. En ausencia de Smac, la activación de la caspasa-3 sólo se observó cuando la concentración de dATP alcanzó 0,1 mM y KCl a 10 mM. En presencia de Smac, la activación de la caspasa-3 se observó incluso cuando no se añadió dATP exógeno y la activación alcanzó una meseta a 10 mM de dATP. También se obtuvieron resultados similares con ATP. Sorprendentemente, en presencia de Smac, se observó una fuerte activación de la caspasa-9 y la caspasa-3 incluso cuando la concentración de K⁺ alcanzó 150 mM. La activación mejorada de la caspasa-3 se debió a la activación mejorada de la caspasa-9, la caspasa posterior para la activación de la caspasa-3.

Procedimientos experimentales: Materiales y métodos generales. Se obtuvieron los nucleótidos de Pharmacia; citocromo c de corazón de caballo de Sigma; anticuerpos monoclonales contra citocromo c de Pharmingen; materiales radiactivos de Amersham y patrones de peso molecular para SDS- PAGE y cromatografía de filtración en gel de Bio-Rad. Se determinaron las concentraciones de proteínas mediante el método de Bradford; se usaron métodos generales de biología molecular tal como se describe en Sambrook *et al.*, 1989 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Preparación de fracciones S-100 a partir de células HeLa. Se cultivaron células HeLa S3 humanas en placas de cultivo tisular de 150 mm en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco que contiene 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de sulfato de estreptomicina) complementado con un 10% (v/v) de suero de ternero fetal, y se hicieron crecer en monocapa a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se lavaron las células a una confluencia del 70% una vez con 1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se recogieron mediante centrifugación a 800 x g durante 5 min. a 4°C. Se resuspendieron los sedimentos celulares en 3 volúmenes de tampón A (Hepes 20 mM-KOH, pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA sódico 1 mM, EGTA sódico 1 mM, DTT 1 mM y PMSF 0,1 mM) y se prepararon extractos celulares tal como se describe en Liu *et al.*, 1996. Cuando era necesario mantener intactas las mitocondrias durante la preparación de extractos, se lisó el sedimento celular en tampón A que contenía sacarosa 250 mM tal como se describe en Yang *et al.*, 1997 Science 275, 1129-1132.

Ensayo para determinar la activación de la caspasa-3. Se tradujo y purificó caspasa-3 tal como se describe (Liu *et al.*, 1996). Se incubó una alícuota de 2 µl de la caspasa-3 traducida *in vitro* con las fracciones de proteína indicadas en presencia de dATP 1 mM y 1 mM de MgCl₂ adicional a 30°C durante 1 h en un volumen final de 20 µl de tampón A. Al final de la incubación, se añadieron 7 µl de tampón de muestra 4x SDS a cada mezcla de reacción. Tras llevar a ebullición durante 3 min., se sometió cada muestra a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15% (PAGE). Se transfirió el gel a un filtro de nitrocelulosa, que se expuso posteriormente a una placa de detección y cuantificación de la radiactividad ("phosphorimaging") y se visualizó en un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad Fuji BAS-1500.

Preparación de extractos de membrana solubilizados (SME). Se resuspendieron 250 ml de sedimento celular procedentes de 100 litros de células HeLa cultivadas en suspensión (5 x 10⁵ células/ml) en 1 litro de tampón A. Se homogeneizaron las células y se retiraron los núcleos tal como se describe en Liu *et al.*, 1996. Se centrifugó el sobrenadante a 10.000 x g durante 30 min. a 4°C para sedimentar la fracción pesada de membrana. Se resuspendió el sedimento de membrana resultante en 1 litro de tampón A que contenía un 0,5% (p/v) de CHAPS y se centrifugó la mezcla solubilizada a 100.000 x g durante 1 h a 4°C en un rotor Beckman SW 28. Se guardó el sobrenadante resultante (extractos de membrana solubilizados SME) a -80°C y se usó como el material de partida durante la purificación de la proteína Smac.

Purificación de Smac a partir de SME. Se llevaron a cabo todas las etapas de purificación a 4°C. Las etapas cromatográficas de columna de Q-Sepharose (Pharmacia) y columna de hidroxiapatita (Bio-Rad) se llevaron a cabo usando cromatografía por etapas convencional. Las etapas cromatográficas de fenil-Superose, Superdex 200 y Mono Q se realizaron en una estación automática de cromatografía líquida para la determinación rápida (FPLC) (Pharmacia).

Se aplicó 1 litro de fracción de membrana solubilizada (5 g de proteína total) en una columna de Q-Sepharose (volumen del lecho de 100 ml) equilibrada con tampón A. Se lavó la columna con 200 ml de tampón A seguido por 500 ml de tampón A que contenía NaCl 100 mM. Se eluyeron los materiales unidos en la columna mediante 500 ml de tampón A que contenía NaCl 300 mM. Se recogieron fracciones de 50 ml y se sometieron a ensayo para determinar la actividad Smac. Se reunieron fracciones de proteína activa de 150 ml y se precipitaron añadiendo sulfato de amonio sólido hasta una saturación del 40% y se recogieron los precipitados de proteína mediante centrifugación a 35.000 x g durante 20 min. Se disolvió el sedimento de proteína resultante en 170 ml de tampón A y se cargó en una columna de hidroxiapatita (volumen del lecho de 50 ml) equilibrada con tampón A. Se lavó la columna con 150 ml de tampón A seguido por 150 ml de tampón A que contenía NaCl 1 M, y luego con 150 ml de tampón A de nuevo. Se eluyeron los materiales unidos con 100 ml de KPO₄ 0,12 M, pH 7,5. Se recogieron fracciones de 10 ml y se sometieron a ensayo

para determinar la actividad Smac. Se reunió un total de fracciones de proteína activa de 40 ml y se añadieron 3,1 g de sulfato de amonio para preparar una concentración final de sulfato de amonio a 0,5 M. Se equilibró la mezcla de proteína-sulfato de amonio mediante rotación durante 1 h seguido por centrifugación a 35.000 x g durante 40 min. Se cargó el sobrenadante resultante (44 ml) en una columna de fenil-Superose 5/5 (Pharmacia) equilibrada con tampón A que contenía sulfato de amonio 0,5 M. Se lavó la columna con 30 ml de tampón A que contenía sulfato de amonio 0,5 M y se eluyó con un gradiente lineal de 100 ml desde tampón A que contenía sulfato de amonio 0,5 hasta tampón A. Se recogieron fracciones de 5 ml y se sometieron a ensayo para determinar la actividad Smac. Se recogió un total de fracciones activas de 15 ml que eluyeron con sulfato de amonio 130-180 mM y se cargaron en dos ejecuciones separadas en una columna de filtración en gel Superdex 200 (26/60) equilibrada con tampón A que contenía NaCl 100 mM. Se eluyó la columna con el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 4 ml partiendo de 90 ml de elución y se sometieron a ensayo para determinar la actividad Smac. Se reunió un total de fracciones activas de 24 ml y se cargaron en una columna Mono Q 5/5 equilibrada con tampón A que contenía NaCl 100 mM. Se lavó la columna con 10 ml de tampón A que contenía NaCl 200 mM y se eluyó con un gradiente lineal de 20 ml desde NaCl 200 mM hasta NaCl 500 mM, ambos en tampón A. Se recogieron fracciones de 1 ml y se sometieron a ensayo para determinar la actividad Smac. Se eluyeron las fracciones activas (2 µg de proteína total) con NaCl 270-300 mM en tampón A y se tomaron alícuotas con la adición de glicerol al 20% y se guardaron a -80°C.

Secuenciación proteica de Smac. Se escindió la banda de 25 kDa (~8 pmol) procedente de la columna Mono Q de un gel de SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie. Se digirió la banda mediante tripsina (Promega) y se separaron los péptidos resultantes mediante una columna de FPLC en fase inversa capilar (LC Packing, Inc.). Se secuenciaron cuatro péptidos individuales en un secuenciador de Applied Biosystems.

Clonación de ADNc de Smac. Se obtuvieron cuatro secuencias de polipéptidos y se usaron para hacer una búsqueda en la base de datos de EST (tBlastn). Se identificó un clon de EST positivo (T53449) y se usó como molde para diseñar oligonucleótidos para obtener los clones de ADNc a partir de la biblioteca de ADNc de HeLa mediante PCR. Se calentó una alícuota de 1 ml (10⁸ ufp) de la biblioteca de ADNc de HeLa de 1Exlox (Yokoyama *et al.*, 1993 Cell 75, 187-197) a 99°C durante 15 min. para liberar el ADN que se amplificó directamente con cebadores usando una reacción de PCR con 1 ciclo de 94°C durante 1 min. y 35 ciclos de 94°C durante 30 s; 55°C durante 30 s; y 72°C durante 1 min. seguido por una extensión a 72°C durante 10 min. Se obtuvo un producto de PCR de 559 pb y posteriormente se secuenció tras su subclonación en el vector PCR II usando un kit de clonación TA (Invitrogen). Se marcó el producto de PCR de 559 pb con a-³²P-dCTP usando el kit de marcaje de cebado aleatorio *red*i prime II (Amersham) y se usó como sonda para examinar una biblioteca de ADNc de 1Exlox de HeLa hibridando filtros por duplicado a 42°C durante la noche en tampón Rapid-hyb (Amersham). Se lavaron los filtros dos veces con 1 x solución salina-citrato (SSC)/SDS al 0,1% durante 15 min. a temperatura ambiente y una vez con 0,5 x SSC/SDS al 0,1% durante 10 min. a 65°C. De cada 5 x 10⁵ placas examinadas, se identificaron 14 clones positivos y se secuenciaron. Se obtuvo el ADNc de longitud completa de 719 pb.

Producción de anticuerpos policlonales contra Smac. Se diseñaron cebadores para amplificar por PCR un ADNc de Smac de plásmido de 437 pb. Se subclonó en marco el fragmento de ADN amplificado que codifica para los aminoácidos 95-239 de Smac en los sitios XhoI/BamHI del vector de expresión bacteriano pET-15b (Novagen). Se transformó el plásmido de expresión en bacterias BL21 (DE3). En una preparación de Smac típica, se añadieron 5 ml de un cultivo bacteriano durante la noche que contenía el vector de expresión de Smac a 500 ml de caldo LB y se cultivó mediante agitación a 250 rpm a 37°C. Cuando la absorbancia del cultivo a 600 nm alcanzó 0,8, se añadió isopropil-1-tio-B-D-galactopiranosido (IPTG) al cultivo a una concentración final de 1 mM y se agitó el cultivo durante otras 3 h. Se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación y se resuspendió el sedimento bacteriano en 10 ml de tampón B (GuHCl 6 M, fosfato de sodio 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0). Tras centrifugación a 10.000 x g durante 15 min., se cargó el sobrenadante en una columna de afinidad de níquel (4 ml). Se lavó la columna con 300 ml de tampón B seguido por 300 ml de tampón C (urea 8 M, fosfato de sodio 0,1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0). Se eluyó la columna con tampón C que contenía imidazol 250 mM. Se purificaron ~10 mg de proteína Smac a partir de un cultivo de 500 ml. Se usó esta proteína de fusión de Smac purificada para generar anticuerpos policlonales mediante la inmunización de conejos.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para Apaf-1, caspasa-9 y citocromo c tal como se describió previamente (Li *et al.*, 1997). Se generó antisuero anti-Smac mediante la inmunización de conejos con una proteína de fusión de Smac recombinante (véase anteriormente). Se realizó el análisis de inmunotransferencia de Smac con una inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa del rábano usando reactivos de detección de inmunotransferencia de tipo Western por quimioluminiscencia (ECL) amplificada (Amersham).

Análisis de transferencia de tipo Northern. Se adquirieron inmunotransferencias de ARN poli(A)⁺ que contenían 2 µg de ARN poli(A)⁺ por carril de múltiples tejidos de adulto humano de Clontech. Se hibridaron las inmunotransferencias con 2 x 10⁶ cpm/ml del fragmento de PCR de Smac de 559 pb con cebado aleatorio usado en la selección de la biblioteca de ADNc (véase anteriormente) en tampón Rapid-hyb (Amersham) a 65°C durante la noche. Se lavaron los filtros una vez con 2 x SSC/SDS al 0,1% durante 15 min. a 65°C seguido por 1 x SSC/SDS al 0,5% durante 15 min. a 65°C. Luego se separaron los mismos filtros y se hibridaron a 65°C durante 2 h con una sonda de ADNc de β-actina de 2,0 kb y luego se lavaron los filtros como anteriormente. Se expusieron los filtros a película de rayos X con una pantalla de intensificación a -80°C.

Inmunotinción. Se sembraron células HeLa adhesivas a 1×10^4 células por portaobjetos de cámara (Nalge Nunc International) en medio DMEM complementado con un 10% (v/v) de suero de ternero fetal, y se hicieron crecer en monocapa a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. 24 h después, se retiró el medio y se irradiaron las células HeLa a 3,5 cm bajo una lámpara UV (5.000 mW/cm², Philips, G36T6L) durante 15 s. Luego se continuó cultivando las células tratadas en medio DMEM nuevo durante varias horas tal como se indica. Se terminaron los cultivos celulares lavando tres veces con PBS seguido por fijación en paraformaldehído al 3% recién preparado en PBS durante 10 min. Se lavaron las células fijadas tres veces con PBS durante 15 min. cada vez seguido por permeabilización en Triton X-100 al 0,15% en PBS durante 15 min. Luego se bloquearon las células durante 60 min. en tampón de bloqueo (albúmina sérica bovina al 2% en PBS) seguido por una incubación de 4 h con o bien un antisuero contra Smac (1:200) o bien un anticuerpo monoclonal de ratón contra citocromo c (1:200). Se lavaron las células tres veces en 10 min. cada vez con tampón de bloqueo seguido por una incubación de 1 h con o bien un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fluoresceína (1:500) (Molecular Probe) para Smac, o IgG de cabra anti-ratón marcado con rojo Texas (1:500) (Molecular Sonda) para citocromo c. Se lavaron las células inmunoteñidas tres veces en 10 min. cada vez con PBS seguido por tinción con DAPI 1 µg/ml (Molecular Probe) y se examinaron bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800.

Transfección de células HeLa con ADNc de Smac. Se subclonó un ADNc de 719 pb que contenía la región codificante completa de Smac y una etiqueta Flag en el extremo carboxilo-terminal en sitios *Xho* I/*Eco*RI de un vector pcDNA 3.1 (-) (Invitrogen) y se designó el plásmido como pcDNA-Smac y se preparó usando un kit de plásmidos Qiagen Midi. Se establecieron células HeLa a 1×10^5 por placa de 60 mm en medio DMEM complementado con un 10% (v/v) de suero de ternero fetal, y se hicieron crecer en monocapa a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Tras la incubación durante 24 h, se transfectó cada placa con o bien 4 mg de vector pcDNA 3.1 (-) o bien 4 mg de pcDNA-Smac usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche). Tras 16 h, se retiró el medio de cultivo y se irradiaron las células con UV tal como se describió anteriormente durante diferentes duraciones de tiempo. Tras la irradiación, se cultivaron las células transfectadas en medio DMEM nuevo durante 6 h adicionales y se recogieron para la preparación de extractos S-100 en presencia de CHAPS al 0,5% en tampón A. Se cargó un total de 20 µg de proteína en una SDS-PAGE al 15% y se transfirió el gel a un filtro de nitrocelulosa, que se sometió posteriormente a inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal contra Smac o un anticuerpo monoclonal contra caspasa-3 humana (Transaction Laboratories).

Producción de proteína Smac recombinante en un sistema de expresión de baculovirus. Se subclonó un ADNc de 719 pb que codifica para la Smac de longitud completa fusionada con una etiqueta de 9-histidina en el extremo carboxilo-terminal en sitios *Bam* H I/*Not* I del vector de expresión de baculovirus pFastBac1 (Life Technologies, Inc.). Se transformó el plásmido de expresión en células de *E. coli* DH10Bac (Life Technologies, Inc). Se purificó el ADN viral recombinante, bácmido, según el procedimiento de expresión de baculovirus Bac-To-Bac y se confirmó mediante análisis de amplificación por PCR. Luego se usó el ADN para transfectar las células de insecto, Sf-21 usando el reactivo CellFECTIN (GIBCO-BRL). Se hicieron crecer las células en medio IPL41 complementado con un 10% de suero de ternero fetal (FCS), fosfato de triptosa 2,6 g/L, hidrolizado de levaduras ("yeastolate") 4 g/L y 0,1% de Pluronic F-68 más penicilina (100 u/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y fungizona (0,25 g/ml). Se analizó la expresión de la Smac recombinante mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se amplificó la cepa viral hasta 100 ml y se usó para infectar 1 litro de células Sf21 a una densidad de 2×10^6 células/ml. Tras una infección de 24 h, se recogieron las células mediante centrifugación y se resuspendió el sedimento celular en 5 volúmenes de tampón A que contenía un 0,5% de CHAPS. Se lisaron las células resuspendidas mediante homogenización y se centrifugaron los lisados celulares a $10.000 \times g$ durante 1 h a 4°C. Se cargó el sobrenadante en una columna de afinidad de níquel de 3 ml. Se lavó la columna con 300 ml de tampón A que contenía NaCl 1 M e imidazol 15 mM seguido por una equilibración con 20 ml de tampón A. Se eluyó la Smac unida a la columna con imidazol 250 mM en tampón A. Se guardó la proteína Smac eluida en múltiples alícuotas a -80°C.

III. Protocolo para el ensayo de interferencia de la unión polipéptido-anticuerpo de alto rendimiento

A. Reactivos

- Neutralite Avidin: 20 µg/ml en PBS.
- Tampón de bloqueo: BSA al 5%, Tween 20 al 0,5% en PBS; 1 hora a temperatura ambiente.
- Tampón de ensayo: KCl 100 mM, HEPES 20 mM pH 7,6, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 1%, NP-40 al 0,5%, b-mercaptoetanol 50 mM, BSA 1 mg/ml, cóctel de inhibidores de proteasas.
- Disolución madre 10x de polipéptido de ³³P-Smac: polipéptido "frío" 10^{-8} - 10^{-6} M complementado con 200.000-250.000 cpm de polipéptido marcado (contador Beckman). Se pone en la micronevera a 4°C durante la selección.
- Cóctel de inhibidores de proteasas (1000X): 10 mg de inhibidor de tripsina (n° BMB 109894), 10 mg de aprotinina (n° BMB 236624), 25 mg de benzamidina (n° Sigma B-6506), 25 mg de leupeptina (n° BMB 1017128), 10 mg de APMSF (n° BMB 917575), y NaVO₃ 2 mM (n° Sigma S-6508) en 10 ml de PBS.
- Anticuerpo: anticuerpo biotinilado 10^{-7} - 10^{-5} M en PBS.

ES 2 288 924 T3

B. Preparación de placas de ensayo

- Se recubren con 120 μ l de disolución madre de N-Avidin por pocillo durante la noche a 4°C.
- Se lavan 2 veces con 200 μ l de PBS.
- Se bloquean con 150 μ l de tampón de bloqueo.
- Se lavan 2 veces con 200 μ l de PBS.

C. Ensayo

- Se añaden 40 μ l de tampón de ensayo/pocillo.
- Se añaden 10 μ l de compuesto o extracto.
- Se añaden 10 μ l de 33 P-polipéptido (20-25.000 cpm/0,1-10 pmoles/pocillo = conc. final de 10^{-9} - 10^{-7} M).
- Se agita a 25°C durante 15 minutos.
- Se incuba durante 45 minutos adicionales a 25°C.
- Se añade anticuerpo biotinilado 40 μ M (0,1-10 pmoles/40 μ l en tampón de ensayo)
- Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se detiene la reacción lavando 4 veces con PBS 200 μ M.
- Se añade cóctel de centelleo 150 μ M.
- Se cuenta en un contador Topcount.

D. Controles para todos los ensayos (situados en cada placa)

- Unión no específica
- Soluble (anticuerpo no biotinilado) a una inhibición del 80%

Los ensayos que usan polipéptidos a modo de ejemplo que comprenden la SEQ ID NO:2 y mutantes de delección de los mismos proporcionan la detección de anticuerpos específicos para los mismos. De forma análoga, los ensayos complementarios que usan polipéptidos a modo de ejemplo que comprenden CDR específicas para secuencias seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2 y fragmentos de la misma proporcionan la detección de polipéptidos que comprenden tales secuencias correspondientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína Smac (segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias) aislada que comprende la SEQ ID NO:2, y que activa la caspasa-3 sin ATP exógeno y proporciona un marcador de apoptosis mediante su translocación desde las mitocondrias hasta el citosol, o un fragmento de polipéptido de la misma de al menos 8 aminoácidos contiguos de longitud, en la que el fragmento produce un anticuerpo específico para tal proteína Smac.
- 10 2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que el fragmento tiene al menos 12 aminoácidos de longitud.
- 10 3. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que el fragmento se selecciona del grupo que consiste en:

SEQ ID NO:2, residuos 1-8;	SEQ ID NO:2, residuos 176-184;
SEQ ID NO:2, residuos 4-13;	SEQ ID NO:2, residuos 183-191;
SEQ ID NO:2, residuos 7-17;	SEQ ID NO:2, residuos 192-200;
SEQ ID NO:2, residuos 13-24;	SEQ ID NO:2, residuos 201-208;
SEQ ID NO:2, residuos 18-27;	SEQ ID NO:2, residuos 209-216;
SEQ ID NO:2, residuos 35-49;	SEQ ID NO:2, residuos 215-222;
SEQ ID NO:2, residuos 47-54;	SEQ ID NO:2, residuos 223-231; y
SEQ ID NO:2, residuos 71-78;	SEQ ID NO:2, residuos 232-239.
- 30 4. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende SEQ ID NO:2, residuos 56-217.
- 5 5. Polinucleótido recombinante que codifica para un polipéptido según la reivindicación 1.
- 35 6. Polinucleótido recombinante que comprende SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-720, un complemento inverso de cualquiera, o un fragmento de alguno de al menos 24 nucleótidos de longitud, en el que el polinucleótido hibrida específicamente con ADNc que codifica para una proteína Smac (SEQ ID NO:1), en el que la proteína Smac activa la caspasa-3 sin ATP exógeno y proporciona un marcador de apoptosis mediante su translocación desde las mitocondrias hasta el citosol.
- 40 7. Polinucleótido según la reivindicación 6, en el que el fragmento tiene al menos 36 nucleótidos de longitud.
8. Polinucleótido según la reivindicación 6, en el que el fragmento se selecciona del grupo que consiste en:

SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-24;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 575-598;
SEQ ID NO:1, nucleótidos 18-42;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 624-648;
SEQ ID NO:1, nucleótidos 45-69;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 644-669;
SEQ ID NO:1, nucleótidos 75-92;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 649-672;
SEQ ID NO:1, nucleótidos 116-141;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 654-677;
	SEQ ID NO:1, nucleótidos 665-688;
SEQ ID NO:1, nucleótidos 166-199;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 687-710;
	y
SEQ ID NO:1, nucleótidos 211-234;	SEQ ID NO:1, nucleótidos 697-720.
SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-548.	
- 65 9. Polinucleótido según la reivindicación 6, que comprende SEQ ID NO:1, nucleótidos 166-651.
10. Primer polinucleótido recombinante que comprende una secuencia de al menos 36 nucleótidos de longitud, teniendo la secuencia similitud de secuencia con un segundo polinucleótido que consiste en SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-720, un complemento inverso de cualquiera, de tal manera que la secuencia

y el segundo polinucleótido hibridan específicamente en una condición de hibridación seleccionada de nº 1 - 10 de la tabla C, en el que el polinucleótido hibrida específicamente con un ADNc de Smac (SEQ ID NO:1), en el que el ADNc de Smac codifica para una proteína Smac que activa la caspasa-3 sin ATP exógeno y proporciona un marcador de apoptosis mediante su translocación desde las mitocondrias hasta el citosol.

11. Polinucleótido según la reivindicación 10, en el que la secuencia tiene al menos 96 nucleótidos de longitud.

12. Anticuerpo que se une específicamente con un polipéptido según la reivindicación 1.

13. Método de detección de una secuencia de polipéptido o polinucleótido específica con una sonda de polinucleótido o anticuerpo específica, que comprende la etapa de detectar una secuencia de:

al menos uno de la SEQ ID NO:2, o un fragmento de la misma de al menos 8 aminoácidos de longitud; o

al menos uno de SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-720, un complemento inverso de cualquiera, o un fragmento de alguno de al menos 24 nucleótidos de longitud, en el que dicha secuencia es proteína Smac o una secuencia de ADNc que codifica para la proteína Smac, en el que la proteína Smac activa la caspasa-3 sin ATP exógeno y proporciona un marcador de apoptosis mediante su translocación desde las mitocondrias hasta el citosol.

14. Método según la reivindicación 13, que comprende detectar un polipéptido o polinucleótido específico que comprende la etapa de detectar:

un polipéptido que comprende al menos uno de la SEQ ID NO:2, o un fragmento de la misma de al menos 8 aminoácidos de longitud; o

un polinucleótido que comprende al menos uno de SEQ ID NO:1, nucleótidos 1-234 o SEQ ID NO:1, nucleótidos 525-720, un complemento inverso de cualquiera, o un fragmento de alguno de al menos 24 nucleótidos de longitud.

15. Método de selección de un agente que modula la unión de un polipéptido según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método las etapas de:

incubar una mezcla que comprende:

un polipéptido aislado según la reivindicación 1,

una diana de unión de dicho polipéptido, y

un agente candidato;

en condiciones mediante las cuales, salvo por la presencia de dicho agente, dicho polipéptido se une específicamente con dicha diana de unión a una afinidad de referencia;

detectar la afinidad de unión de dicho polipéptido a dicha diana de unión para determinar una afinidad sesgada por el agente,

en el que una diferencia entre la afinidad sesgada por el agente y la afinidad de referencia indica que dicho agente modula la unión de dicho polipéptido a dicha diana de unión.

ES 2 288 924 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Wang, Xiaodong
 Du, Chunying
 5 <120> Activadores de caspasas
 <130> UTSDO630
 <140>
 10 <141>
 <160> 8
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 15 <210> 1
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> humano
 20 <220>
 <221> CDS ("secuencia codificante")
 <222> (1)..(717)
 25 <400> 1
 atg gcg gct ctg aag agt tgg ctg tcg cgc agc gta act tca ttc ttc 48
 Met Ala Ala Leu Lys Ser Trp Leu Ser Arg Ser Val Thr Ser Phe Phe
 30 1 5 10 15
 agg tac aga cag tgt ttg tgt gtt cct gtt gtg gct aac ttt aag aag 96
 Arg Tyr Arg Gln Cys Leu Cys Val Pro Val Val Ala Asn Phe Lys Lys
 35 20 25 30
 cgg tgt ttc tca gaa ttg ata aga cca tgg cac aaa act gtg acg att 144
 Arg Cys Phe Ser Glu Leu Ile Arg Pro Trp His Lys Thr Val Thr Ile
 40 35 40 45
 ggc ttt gga gta acc ctg tgt gcg gtt cct att gca cag aaa tca gag 192
 Gly Phe Gly Val Thr Leu Cys Ala Val Pro Ile Ala Gln Lys Ser Glu
 45 50 55 60
 cct cat tcc ctt agt agt gaa gca ttg atg agg aga gca gtg tct ttg 240
 Pro His Ser Leu Ser Ser Glu Ala Leu Met Arg Arg Ala Val Ser Leu
 50 65 70 75 80
 gta aca gat agc acc tct acc ttt ctc tct cag acc aca tat gcg ttg 288
 Val Thr Asp Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Gln Thr Thr Tyr Ala Leu
 55
 60
 65

ES 2 288 924 T3

	85	90	95	
5	att gaa gct att act gaa tat act aag gct gtt tat acc tta act tct Ile Glu Ala Ile Thr Glu Tyr Thr Lys Ala Val Tyr Thr Leu Thr Ser 100 105 110	336		
10	ctt tac cga caa tat aca agt tta ctt ggg aaa atg aat tca gag gag Leu Tyr Arg Gln Tyr Thr Ser Leu Leu Gly Lys Met Asn Ser Glu Glu 115 120 125	384		
15	gaa gat gaa gtg tgg cag gtg atc ata gga gcc aga gct gag atg act Glu Asp Glu Val Trp Gln Val Ile Ile Gly Ala Arg Ala Glu Met Thr 130 135 140	432		
20	tca aaa cac caa gag tac ttg aag ctg gaa acc act tgg atg act gca Ser Lys His Gln Glu Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Trp Met Thr Ala 145 150 155 160	480		
25	gtt ggt ctt tca gag atg gca gca gaa gct gca tat caa act ggc gca Val Gly Leu Ser Glu Met Ala Ala Glu Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Ala 165 170 175	528		
30	gat cag gcc tct ata acc gcc agg aat cac att cag ctg gtg aaa ctg Asp Gln Ala Ser Ile Thr Ala Arg Asn His Ile Gln Leu Val Lys Leu 180 185 190	576		
35	cag gtg gaa gag gtg cac cag ctc tcc cgg aaa gca gaa acc aag ctg Gln Val Glu Glu Val His Gln Leu Ser Arg Lys Ala Glu Thr Lys Leu 195 200 205	624		
40	gca gaa gca cag ata gaa gag ctc cgt cag aaa aca cag gag gaa ggg Ala Glu Ala Gln Ile Glu Glu Leu Arg Gln Lys Thr Gln Glu Glu Gly 210 215 220	672		
45				
50	gag gag cgg gct gag tcg gag cag gag gcc tac ctg cgt gag gat tga Glu Glu Arg Ala Glu Ser Glu Gln Glu Ala Tyr Leu Arg Glu Asp 225 230 235	720		

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> humana

ES 2 288 924 T3

<400> 2

```

5      Met Ala Ala Leu Lys Ser Trp Leu Ser Arg Ser Val Thr Ser Phe Phe
      1          5          10          15
      Arg Tyr Arg Gln Cys Leu Cys Val Pro Val Val Ala Asn Phe Lys Lys
          20          25          30
10     Arg Cys Phe Ser Glu Leu Ile Arg Pro Trp His Lys Thr Val Thr Ile
          35          40          45
      Gly Phe Gly Val Thr Leu Cys Ala Val Pro Ile Ala Gln Lys Ser Glu
          50          55          60
15     Pro His Ser Leu Ser Ser Glu Ala Leu Met Arg Arg Ala Val Ser Leu
      65          70          75          80
      Val Thr Asp Ser Thr Ser Thr Phe Leu Ser Gln Thr Thr Tyr Ala Leu
          85          90          95
      Ile Glu Ala Ile Thr Glu Tyr Thr Lys Ala Val Tyr Thr Leu Thr Ser
          100          105          110
25     Leu Tyr Arg Gln Tyr Thr Ser Leu Leu Gly Lys Met Asn Ser Glu Glu
          115          120          125
      Glu Asp Glu Val Trp Gln Val Ile Ile Gly Ala Arg Ala Glu Met Thr
          130          135          140
30     Ser Lys His Gln Glu Tyr Leu Lys Leu Glu Thr Thr Trp Met Thr Ala
      145          150          155          160
      Val Gly Leu Ser Glu Met Ala Ala Glu Ala Ala Tyr Gln Thr Gly Ala
          165          170          175
35     Asp Gln Ala Ser Ile Thr Ala Arg Asn His Ile Gln Leu Val Lys Leu
          180          185          190
40     Gln Val Glu Glu Val His Gln Leu Ser Arg Lys Ala Glu Thr Lys Leu
          195          200          205
      Ala Glu Ala Gln Ile Glu Glu Leu Arg Gln Lys Thr Gln Glu Glu Gly
          210          215          220
45     Glu Glu Arg Ala Glu Ser Glu Gln Glu Ala Tyr Leu Arg Glu Asp
      225          230          235

```

```

50     <210> 3
      <211> 720
      <212> ADN
55     <213> Secuencia artificial
      <220>
      <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia sintética
60     <400> 3

```

atggcgctctc tgaagagttg gctgttgccg agcgtaactt cattcttctg gtacagacag 60

65

ES 2 288 924 T3

5 tgtttgtgtg tttctgttgt ggctaactat aagaagcggg gtttctcaga aatgataaga 120
 ccaaggcaca aaactgtgac gattggctat ggagtaaccc tgtgagcggg tcctattgca 180
 cagaaatcag agccacattc cctttgtagt gaagcattga tgaggagtgc agtgtctttg 240
 gtaactgata gcacctctac ctttctctct ctgaccacat atgcattgat tgaagctatt 300
 actgaaaata ctaaggctgt ttatacctaa acttctcttt accgacaata aacaagttta 360
 cttgggataa tgaattcaga ggaggatgat gaagtgtggc aggtgttcat aggagccaga 420
 10 gctgagatga cttcaaaaaca ccaagtgtac ttgaagctgg aaacctcttg gatgactgca 480
 gttggtcatt cagagatggc agcagaagca gcatatcaa ctggcacaga tcaggcctct 540
 ataaccgcca agaatcacat tcagcagggtg aaactgcagg tggaagagga gcaccagctc 600
 tcccgaaag ctgaaaccaa gctggcagat gcacagatag aagagctccg tctgaaaaca 660
 15 caggaggtag gggaggagcg ggctgagtct gagcaggagg cctacctgcg tgtggattga 720

<210> 4

20 <211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia sintética

<400> 4

30 atggccgctc tgaagagttg gctgtcgccc agcgtaactt cattcttcac gtacagacag 60
 tgtttgtgtc ttctgttgt ggctaccttt aagaagcggg gtttctcaga attcataaga 120
 ccatgccaca aaactgtgac gattgccttt ggagtaaccc tgtgtcggg tcctattgca 180
 35 cagaaatcac agcctcattc ctttactagt gaagcattga tgacgagagc agtgtctttg 240
 gtaagagata gcacctctac ctttgtctct cagaccacat atgggttgat tgaagctatt 300
 agtgaatata ctaaggctgt ttatacgtta acttctcttt accgacaata tacaagttta 360
 cttggggaaa tgaattcaga ggaggaagat gaggtgtggc aggtgatgat aggagccaga 420
 40 gctgagatga gttcaaaaaca ccaagactac ttgaagctgc aaaccacttg gatgactgca 480
 gttgtctctt cacagatggc agcagaagct gcatatcaa ctgccgcaga tcaggcctct 540
 ataaccceca ggaatcacat tcagctcgtg aaactgcagg tggaagacgt gcaccagctc 600
 45 tccgggaaag cagaaaccaa gctgggagaa gcacagatag aagagctgcg tcagaaaaca 660
 caggagggag gggaggagcg ggctgagtgg gagcaggagg cctacctggg tgaggattga 720

<210> 5

50 <211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia sintética

<400> 5

60 atggcggcac tgaagagttg gctgtcgcg agcgaaactt cattcttctg gtacagacag 60

65

ES 2 288 924 T3

5 tttttgtgtg ttccctgttg ggctatcttt aagaagcggg gttactcaga attgataaga 120
 ccatggctca aaactgtgac gataggcttt ggagtaaccc tgtgtgcggt tcctattgca 180
 cagtaatcag agcctcattc ccttagtaat gaagcattga tgaggtgagc agtgtctttg 240
 gtaacagatt gcacctctac ctttcactct cagaccacat atgcgttgaa tgaagctatt 300
 actgtatata ctaaggctgt ttatacttta acttctcttt acggacaata tacaagttta 360
 10 cttgggaaac tgaattcaga ggagcaagat gaagtgtggc aggtgatgat aggagccaga 420
 gctgacatga cttcaaaaca ccaagactac ttgaagctgg aaagcacttg gatgactgca 480
 gttgctcttt cagagatggc agcacaagct gcatatcaaa ctggggcaga tcaggcctct 540
 ataacggcca ggaatcacat tcagctggtc aaactgcagg tggaagacgt gcaccagctc 600
 tcccgaaac cagaaaccaa gctggcacia gcacagatag aagagctcgg tcagaaaaca 660
 15 caggaggaac gggaggagcg ggctgagtgg gagcaggagg cctacctgcc tgaggattga 720

<210> 6
 20 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia sintética
 <400> 6

30 atggcggttc tgatgagttg gctgtcgcga agcgaaactt cattcttttag gtactgacag 60
 agttagtgtg ttccctgttg ggctatcttt tagaagcggg gtttctcaaa atagataaga 120
 ccaaggcaca aaacagtgcg gtttggtttt ggagttaccc tgagtgcgga tcctattgct 180
 35 ctgaaatcag agcctcattc cctaagtaga gaagcattga tgtgtgagc agtgtctttg 240
 gtaacagtta gtcctctac ctatcactct cagaccacat atgcgtagat agaagctatt 300
 actgtttata ctaaggctgt taatacctaa acttctcttt accgacttta tacaagttta 360
 caagggaaaa tgaattcaga ggaggttgat gaagtgtggc aggagatcaa aggagccagt 420
 40 gctgagatga cttcaataca ccaagtgtac ttgatgctgg aaaccactag gatgacagca 480
 gttggactat cagagatggc agctgatgct gcatatcaaa caggcgcaga acaggcctct 540
 atatccgctt ggaatcacat tcagcagggtg aatctgcagg aggatgaggt gcaccagctc 600
 tccaggaaaa cagaaaccta gctggctgaa gcacagatag aagtgtccg tctgaaaaca 660
 45 ctggaggatg gggaggagcg ggctgagacg gagcaggagg ccaaccagcg agaggattga 720

<210> 7
 50 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: secuencia sintética
 <400> 7

60 atggcggttc tgaagagttg cgtgtcgcgc agcgtaactt cattcttgcg gtacagacag 60

65

ES 2 288 924 T3

5 tgtttcgggtg ttcctgttgt ggctaagctt aagaagcggg gtttctcacg attgataaga 120
 ccatgcgaca aaactgtgac gattgcgttt ggagtaaccc tgtgtgccct tcctattgca 180
 cagaaatggg agcctcattc ccttacgagt gaagcattga tgaggagagc cgggtctttg 240
 gtaagcgata gcacctctac ctttctgtct gagaccacat atcggttgat tgaagctatt 300
 actgaatata ctaaccctgt ttataggtta acttctcttt accggaata tacaagttta 360
 cttgccaaaa tgaattcaga ccaggaagat gaagtgtggc acctgatcat aggagccaga 420
 10 cgtgagatga cttcaaaaca ccaacggtag ttgaagctgg aaaggacttg gatgactgca 480
 gttcctcttt cagagatggc acgagaagct gcatatcaa ctgcggcaga tcagcgtct 540
 ataaccgcca ggaatcacat tcagctcctg aaactgcacc tggaagaggt gcaccagctc 600
 tcggccaaag cagaaaccaa gctggcagaa gcacagatag aagagctccg tcagaaaaca 660
 15 caccaggaag gggaggagcg ggctgagtcg gaccaggagg cctagctgcg tgaggattga 720

<210> 8

<211> 720

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia sintética

25

<400> 8

atggaggtc tgacgagttg gctgtcgagc agcctaactt cattcatcag gtacacacag 60
 30 tgattgtctg ttcctgttgt ggctaactat aacaagcggg gattctcaca attgataaga 120
 ccaagccaca aaactgtgac gaatgccttt ggagtaaccc tgtgaccggg tcctatacca 180
 cagaaatcag agcctcattc cctacgtagt gaagcattac tgaggagagc agtgtctttg 240
 gtaacagaac gcacctctac cttagtctct cagaccacat atgcgttggt tgaaggattt 300
 35 actgtatata gtaaggctgt ttataccttt agttctcttt tgcgacaata tacaagttta 360
 gttgggaaat tgaattcaga ggtggaagat gaagtgtggg aggtgatcat tggagccaga 420
 ggtgagttga gttcaaaaca ccaagtgtag ttgaagctgg atacgacttg gatgactgca 480
 gttgcacttt cagagatgcc agcagaagca gcatatcaa ctggcgacaga tcagcactct 540
 40 ataaccacaa ggaatcacat tcagctgcag aaactgcagg tggaagagca gcaccagctc 600
 tcccggaaac aagaaaccaa gctcacagaa gcacagatag aagagccacg tcagaaaaca 660
 cacaaggaag gggaggagcg ggctgagtta gagcaggagg tatacctgcg tgaggattga 720

45

50

55

60

65