

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 436 624**

⑮ Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2000 E 10186068 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2385124**

⑭ Título: **Péptidos o análogos de péptidos para modulación de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL**

⑩ Prioridad:

14.05.1999 US 134114 P 14.05.1999 US 134117 P
14.05.1999 US 134118 P 21.10.1999 US 160860 P
29.10.1999 US 162498 P 13.12.1999 US 170453 P
14.01.2000 US 176195 P 14.02.2000 US 182296 P
11.04.2000 US 547276 P 11.04.2000 US 196460 P
11.04.2000 US 196528 P 11.04.2000 US 196527 P
11.04.2000 US 196267 P

⑬ Titular/es:

ARBOR VITA CORPORATION (100.0%)
6611 Dumbarton Circle
Fremont, CA 94555-3603, US

⑭ Inventor/es:

LU, PETER

⑭ Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.01.2014

ES 2 436 624 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos o análogos de péptidos para modulación de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL

1. CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a péptidos y análogos de péptidos, y métodos para utilización de tales 5 composiciones para regular las actividades de células del sistema hematopoyético. En un aspecto, la invención proporciona métodos de modulación del metabolismo (v.g., la activación) de las células hematopoyéticas (v.g., células T y células B) por antagonismo de una interacción entre una proteína que contiene un dominio PDZ y una proteína que se fija a un dominio PDZ. En un aspecto, aquélla se refiere a péptidos de fusión que contienen una 10 secuencia de aminoácidos correspondiente al término carboxilo de un receptor de superficie expresado por una célula hematopoyética y una secuencia transportadora transmembranal; tales péptidos de fusión son útiles en la regulación de las células hematopoyéticas por inhibición de la activación celular.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los dominios PDZ de las proteínas se nombran según tres proteínas prototípicas: PSD95 (proteína del disco grande 15 de *Drosophila* y proteína Zonula Occludin 1 (Gomperts et al., 1996, *Cell* 84: 659-662). Las proteínas que contienen el dominio PDZ están implicadas en la formación de sinapsis por organización de receptores de neurotransmisores transmembranales por interacciones intracelulares. Los dominios PDZ contienen la secuencia de firma GLGF. En el sistema nervioso, las proteínas típicas que contienen dominios PDZ contienen tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio guanilato-quinasa. Ejemplos de proteínas intracelulares que contienen dominios PDZ incluyen LIN-2, LIN-7 y LIN-10 en la pre-sinapsis, y PSD95 en la post-sinapsis.

20 Se ha demostrado que los dominios PDZ se fijan a los términos carboxilo de las proteínas transmembranales en las células neuronales. Songyang et al. consignaron que las proteínas capaces de fijar dominios PDZ contienen una secuencia motivo en el terminal carboxilo de E-S/T-X-V/I (Songyang et al., 1997, *Science* 275: 73). Estudios de cristalografía de rayos X han revelado los puntos de contacto entre la secuencia motivo y los dominios PDZ (Doyle et al., 1996, *Cell* 88: 1067-1076). Si bien la interacción entre los dominios PDZ y los canales iónicos en las neuronas se 25 han estudiado extensamente, tales interacciones han sido objeto de estudios limitados en otros sistemas biológicos, especialmente en el sistema hematopoyético.

El sistema hematopoyético está compuesto de diferentes tipos de células que realizan distintas funciones. Muchas 30 de sus diversas funciones requieren el movimiento coordinado de receptores de superficie celular que incluyen canales iónicos, moléculas superficiales de adhesión para coordinar la interacción célula-célula, y receptores de citoquinas. A pesar de sus diversas actividades funcionales, se cree que todas las células hematopoyéticas se desarrollan a partir de una célula madre hematopoyética multipotente de la médula ósea. Se ha demostrado que dicha célula madre expresa un marcador de superficie denominado CD34. Durante la diferenciación, la célula madre da lugar a células progenitoras en cada uno de varios linajes específicos de células hematopoyéticas. Las células progenitoras sufren luego una serie de cambios morfológicos y funcionales para producir células hematopoyéticas 35 asignadas funcionalmente maduras.

Entre las funciones desempeñadas por las células hematopoyéticas, ciertos tipos de células están implicados sólo 40 en la inmunidad. Por ejemplo, los linfocitos, que incluyen células T, células B y células agresoras naturales (NK), son efectores en las respuestas inmunitarias. Monocitos y granulocitos (es decir, neutrófilos, basófilos y eosinófilos) juegan un papel en formas de defensa inespecíficas. A los linfocitos, monocitos y granulocitos se hace referencia colectivamente como células blancas de la sangre o leucocitos. Por otra parte, otras células hematopoyéticas realizan funciones que no están relacionadas con el sistema inmunitario. Por ejemplo, los eritrocitos están implicados en el transporte de gases, y las células de la serie trombocítica están implicadas en la coagulación de la sangre.

45 Las células T y las células B reconocen antígenos y generan una respuesta inmune. Las células T reconocen los antígenos por receptores heterodímeros de la superficie denominados el receptor de células T (TCR). El TCR está asociado por una serie de polipéptidos a los que se hace referencia colectivamente como complejo CD3. Las células B reconocen los antígenos por inmunoglobulinas de la superficie (Ig), que son también moléculas secretoras. Adicionalmente, se han identificado un gran número de receptores co-estimulantes de la superficie en las células T y las células B, que aumentan la activación celular durante la activación inducida por el antígeno.

50 Además del complejo receptor antígeno de las células T/CD3 (TCR/CD3), otras moléculas expresadas por las células T que median una señal de activación incluyen, pero sin carácter limitante, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD18, CD27, CD28, CD43, CD45, CD152 (CTLA-4), CD154, MHC clase I, MHC clase II, CDw137 (4-1BB), CDw150, y análogos (Barclay et al., *The Leucocyte Antigen Facts Book*, 1997, segunda edición, Academic Press; *Leucocyte Typing*, 1984, Bernard et al. (eds.), Springer-Verlag; *Leukocyte Typing II*, 1986, Reinherz et al. (eds.), Springer-Verlag; *Leukocyte Typing III*, 1987, McMichael (ed.), Oxford University Press; *Leukocyte Typing IV*, 1989, Knapp et al. (eds.), Oxford University Press; *CD Antigens*, 1996, VI Internat. Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens. <http://www.nc-bi.nlm.nih.gov/prow>). A los antígenos de la superficie celular que operan junto con TCR/CD3 se hace referencia en la técnica a menudo como co-

receptores.

Se han generado anticuerpos específicos contra la totalidad de los antígenos de superficie de las células T arriba mencionados. Otras moléculas que se fijan a los receptores de superficie de las células T arriba mencionados incluyen derivados de anticuerpos fijadores de antígeno tales como dominios variables, péptidos, superantígenos, y

5 sus ligandos naturales tales como CD58 (LFA-3) para CD2, HIV gp120 para CD4, CD27L para CD27, CD80 o CD86 para CD28 o CD152, ICAM1, ICAM2 e ICAM3 para CD11a/CD18, 4-1BBL para CDw137.

Moléculas de activación expresadas por las células B incluyen, pero sin carácter limitante, Ig de superficie, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD40, CD45, CD80, CD86 e ICAM1. Análogamente, ligandos naturales de estas moléculas y anticuerpos dirigidos a ellos así como derivados de anticuerpos pueden utilizarse para administrar 10 una señal de activación a las células B.

Sin embargo, antes de la presente invención, no se sabía que la transducción de señales después de la estimulación de cualquier receptor de leucocitos estaba mediada por interacciones de receptores con proteínas que contenían dominios PDZ. Por tanto, ni siquiera se contemplaba en la técnica que una interferencia de interacciones receptor de superficie de los leucocitos/dominio PDZ pudiera regular la activación de los leucocitos.

15 El documento WO 98/23781 A1 da a conocer péptidos que modulan la fijación de una proteína PDZ que comprende una secuencia D-X-V de fijación del dominio PDZ C-terminal.

3. SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención da a conocer un péptido de fusión o análogo peptídico del mismo para modulación de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL que comprende:

20 (i) una secuencia de aminoácidos transmembranales transportadores capaz de facilitar la entrada de un péptido enlazado a ella en una célula a través de la membrana plasmática,

(ii) una secuencia peptídica polienlazadora flexible opcional, y

(iii) una secuencia peptídica del terminal carboxilo que comprende un motivo de fijación de dominio PDZ en el terminal C, comprendiendo la secuencia del motivo de fijación del dominio PDZ

25 X*-S/T-D/E-V/I/L, en donde X* es cualquier aminoácido no aromático.

Realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones del apéndice.

Se describe también en esta memoria un método de modulación de una función biológica de una célula, v.g., una célula endotelial o célula hematopoyética (tal como un leucocito, v.g. célula T o célula B), por introducción en la célula de un antagonista que inhibe la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL en la célula, o un agonista que

30 mejora la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL en la célula. En diversas realizaciones, la proteína PL es una proteína de adhesión, una proteína adaptadora, o una proteína intracelular. En algunas realizaciones, la misma es CD6, CD49E, CD49F, CD138, Clasp-1, Clasp-4, VCAM1, Clasp-2, CD95, DNAM-1, CD83, CD44, CD4, CD97, CD3n, DOCK2, CD34, FcεRIb, o FasLigand. En una realización, la proteína PL se caracteriza por un motivo de aminoácido carboxi-terminal que es X-S-X-A, X-A-D/E-V, X-V/I/L-X*-V, o X-S/T-X-F (donde X es cualquier 35 aminoácido y X* es cualquier aminoácido no aromático). En realizaciones, la proteína PL es expresada por linfocitos T o linfocitos B. En algunas realizaciones de este método, la proteína PDZ es CASK, MPP1, DLG1, PSD95, NeDLG, SYN1a, TAX43, LDP, LIM, LIMK, AF6, PTN-4, prl16, 41.8, RGS12, DVL1, TAX 40, TIAM1, MINT1, K303, TAX2, o KIAA561.

40 En algunos aspectos, la célula es un leucocito y la función biológica es activación celular, proliferación celular, mantenimiento de la estructura celular, actividad metabólica celular, o producción de citoquinas. En algunas realizaciones, el método incluye adicionalmente detección de un cambio en la activación de los leucocitos.

45 En aspectos preferidos, el antagonista es un agente que inhibe la fijación de un péptido PL a un polipéptido del dominio PDZ en un ensayo "A", en un ensayo "G", o a la vez en un ensayo A y un ensayo G. El antagonista puede ser un polipéptido, tal como un polipéptido que tiene en el término carboxi al menos dos residuos que son iguales que los dos residuos carboxi-terminales de una proteína PL, de tal modo que una proteína PL se expresa en una célula hematopoyética o célula endotelial que es una proteína de adhesión, una proteína adaptadora, o una proteína intracelular. En un aspecto adicional, al menos los cuatro residuos carboxi-terminales del polipéptido son iguales que los cuatro residuos carboxi-terminales de la proteína PL. En un aspecto adicional, la proteína PL tiene un motivo de aminoácido carboxi-terminal seleccionado de X-S-X-A, X-A-D/E-V, X-V/I/L, -X*-V, o X-S/T-X-F, donde X es cualquier 50 aminoácido y X* es cualquier aminoácido no aromático. En un aspecto adicional, la proteína PL es CD6, CD49E, CD49F, CD138, Clasp-1, Clasp-4, VCAM1, Clasp-2, CD95, DNAM-1, CD83, CD44, CD97, CD3n, DOCK2, CD34, FcεRIb, o FasLigand.

En un aspecto afín, el antagonista es un peptidomimético de un péptido de secuencia inhibidora de PL. En otro aspecto afín, el antagonista es un polipéptido de fusión que tiene una secuencia PL y secuencia de aminoácidos

transmembranales transportadores (tales como HIV tat, Drosophila antenapedia, virus del herpes simple VP22 o anti-DNA CDR 2 y 3).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de determinación de si un compuesto de ensayo es un inhibidor de la fijación entre una proteína PDZ y una proteína PL por contacto de un polipéptido de dominio PDZ que

5 tiene una secuencia de la proteína PDZ, y un péptido PL en condiciones en las cuales los mismos forman un complejo, en presencia y en ausencia de un compuesto de ensayo, y detección de la formación del complejo en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, donde menos formación del complejo en presencia del compuesto de ensayo que en ausencia del compuesto indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la fijación proteína PDZ-proteína PL. El péptido PL tiene una secuencia que incluye la secuencia C-terminal de una proteína PL, tal
10 como CD6, CD49E, CD49F, CD138, Clasp-1, Clasp-4, VCAM1, Clasp-2, CD95, DNAM-1, CD83, CD44, CD97, CD3n, DOCK2, CD34, FceRIb, o FasLigand. En algunas realizaciones, el polipéptido del dominio PDZ es un polipéptido de fusión.

En un aspecto afín, la descripción proporciona un método de determinación de si un compuesto de ensayo es un agonista de la fijación entre una proteína PDZ y una proteína PL por contacto de un polipéptido del dominio PDZ, y

15 un péptido PL en condiciones en las cuales los mismos forman un complejo, en presencia y en ausencia de un compuesto de ensayo, y detección de la formación del complejo en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, en donde más formación del complejo en presencia del compuesto de ensayo que en ausencia del compuesto indica que el compuesto de ensayo es un agonista de la fijación proteína PDZ-proteína PL.

20 La descripción proporciona adicionalmente un inhibidor de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL. En un aspecto, el inhibidor se caracteriza porque el mismo reduce la fijación de un péptido seleccionado del grupo constituido por un péptido PL seleccionado del grupo constituido por CD6, CD49E, CD49F, CD138, Clasp-1, Clasp-4, VCAM1, Clasp-2, CD95, DNAM-1, CD83, CD44, CD97, CD3n, DOCK2, CD34, FceRIb, y FasLigand y un polipéptido de dominio PDZ. En diversos aspectos, el inhibidor es un péptido que comprende una secuencia que es de 3 a aproximadamente 20 residuos de una secuencia C-terminal de una proteína PL seleccionada de CD6, 25 CD49E, CD49F, CD138, Clasp-1, Clasp-4, CAM1, Clasp-2, CD95, DNAM-1, CD83, CD44, CD97, CD3n, DOCK2, CD34, FceRIb, y FasLigand; un péptido que tiene un motivo X-S-X-A, X-A-D/E-V, X-V/I/L-X*-V, o X-S/T-X-F, (donde X es cualquier aminoácido y X* es cualquier aminoácido no aromático); un peptidomimético; o una molécula orgánica pequeña. La descripción proporciona también una composición farmacéutica que contiene el inhibidor.

30 La descripción proporciona también un método para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por activación de los leucocitos por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de una interacción PL-PDZ. En algunos aspectos, la enfermedad se caracteriza por una respuesta inmune inflamatoria o humoral o es una enfermedad autoinmune. La descripción proporciona adicionalmente un método de reducción de la inflamación de un individuo, por administración de un agente que inhibe la fijación de una proteína PDZ y una proteína PDL, donde la proteína PL es una proteína de adhesión, una proteína adaptadora, o una proteína intracelular.

35 La descripción proporciona también el uso de un inhibidor de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL para inhibir la activación de los leucocitos o para tratar una enfermedad mediada por células hematopoyéticas, tal como una enfermedad que se caracteriza por una respuesta inmune inflamatoria o humoral. La descripción proporciona también el uso de un inhibidor de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad medida por células hematopoyéticas.

40 La descripción proporciona también un método de modulación de una función biológica de una célula hematopoyética, que comprende introducir en la célula un antagonista que inhibe la fijación en una proteína PDZ y una proteína PL en la célula como se deduce de la Tabla 2, por ejemplo, donde la proteína PL es DNAM-1 y la proteína PDZ es MPP1, MPP2, DLG1, NeDLG, PSD95, LIM, AF6, 41.8 o RGS12, la proteína PL es LPAP y la proteína PDZ es DLG1 o MINT1, o la proteína PL es DNAM-1 y la proteína PDZ es PSD95 o MPP2.

45 La presente descripción se refiere también a péptidos y análogos de péptidos que se fijan a dominios PDZ en las células hematopoyéticas. En particular, aquélla se refiere a péptidos y análogos de péptidos de fusión que contienen una secuencia carboxi-terminal del receptor de superficie de las células hematopoyéticas y una secuencia transportadora transmembranal que facilita la entrada de los péptidos en una célula diana. La descripción se refiere también a métodos de utilización de tales composiciones en la inhibición de la activación de los leucocitos tal como se mide por la producción de citoquinas, proliferación celular, apoptosis y citotoxicidad.

Es un aspecto de la descripción la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos o análogos de péptidos de fusión arriba mencionados como composiciones farmacéuticas a un individuo a fin de inhibir eventos indeseables mediados por leucocitos.

55 Es también un aspecto de la descripción administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los péptidos o análogos de péptidos de fusión arriba mencionados como composiciones farmacéuticas a un individuo a fin de tratar un trastorno autoinmune o para prevenir el rechazo de trasplantes de un trasplante de órgano sólido.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGURAS 1A-1D muestran los resultados de ensayos ilustrativos en los cuales se determinó la fijación de péptidos biotinilados que tenían una secuencia del término carboxilo ("término C") de diversas proteínas leucocitarias a dominios PDZ (es decir, proteínas de fusión GST-dominio PDZ) utilizando el ensayo "G" descrito más adelante. Los dominios PDZ son: PSD95 (Fig. 1A); NeDLG (Fig. 1B); DLG1 (Fig. 1C), y 41.8 (Fig. 1D). Estas y otras proteínas de fusión de dominios PDZ se describen más adelante (v.g., TABLA 2). En la FIGURA, los péptidos 1-31 se refieren al péptido PL biotinilado utilizado en el ensayo, y se identifican en la clave, más adelante). Las "Identificaciones (IDs) de los péptidos" se definen en la TABLA 3. Clave:

#	Proteína de ensayo	Péptidos ID
1	Clasp-2	AA2L
2	FceRIb	AA25L
3	CDW128B	AA29.2
4	KV1.3	AA33L
5	Neurexina	AA38L
6	DOCK2	AA40L
7	CC CKR-1R	AA41L
8	CC CKR-2	AA42L
9	CC CKR-4	AA44L
10	BLR-1	AA45L
11	CD49E	AA11L
12	CD97	AA14L
13	VCAM1	AA17L
14	CD138	AA18L
15	DNAM-1	AA22L

16	CDW128A	AA29.1L
17	CC CKR-3	AA43L
18	Clasp-1	AA1L-R
19	CD46 (Forma 1)	AA10L
20	CD95	AA13L
21	CDW125	AA28L
22	CD83	AA47L
23	CD62E	AA48L
24	CD3n	AA4L
25	Clasp-4	AA3L-V
26	CD44	AA9L
27	CD166	AA20L
28	CD62E	AA48L
29	CD5	AA49L
30	CD148	AA55L
31	DOCK2	AA40L

- Las FIGURAS 2A y 2B muestran la Determinación de la Afinidad Aparente para las interacciones PDZ-ligando. Concentraciones variables de CLASP-2 biotinilados (Fig. 2A; TABLA 4) o Fas (Fig. 2B; TABLA 4) se hicieron reaccionar con el polipéptido GST inmovilizado (fijado a la placa) o proteínas de fusión GST-PDZ (GST-DLG1, GST-NeDLG, y GST-PSC95). La fijación de GST solo (< 0,2 unidades OD) se sustrajo de la fijación a las proteínas de fusión para obtener la señal para cada concentración de péptido. Esta señal se normalizó luego dividiendo la señal para cada concentración de péptido por la señal máxima observada para cada par péptido-PDZ (es decir, la señal obtenida a 30 μ M del péptido CLASP2 o el péptido Fas 100 μ M; 0,4-1,0 unidades OD para CLASP2 y 1,2-2,0 unidades OD para Fas). Las señales normalizadas se representaron luego gráficamente y se ajustaron a una curva de fijación de saturación para CLASP2 y 1,2-2,0 unidades OD para Fas. Las señales normalizadas se representaron luego gráficamente y se ajustaron a una curva de fijación de saturación, produciendo una afinidad aparente de 21 μ M para la interacción DLG1-CLASP2, 7,5 μ M para la interacción NeDLG-CLASP2, 45 μ M para la interacción PSD95-CLASP2, 54 μ M para la interacción DLG1-Fas, 54 μ M para la interacción NeDLG-Fas, y 85 μ M para la interacción PSD95-Fas. Los datos son valores medios de puntos de datos duplicados, con errores estándar entre los puntos de datos duplicados < 20%.
- Las FIGURAS 3A - 3F exhiben la inhibición de las interacciones peptídicas PDZ-PL. Una concentración fija de péptido C-terminal biotinilado que tenía una secuencia basada en la secuencia C-terminal de una proteína receptora de la superficie celular (Clasp2, CD46, Fas y KV1.3; véase TABLA 4) se fijó a polipéptido GST inmovilizado o la proteína de fusión de GST indicada en la parte superior izquierda de cada marco, en presencia o ausencia de los péptidos competidores indicados en la leyenda de cada marco y se determinó el nivel de inhibición. Fig. 3A-BLG1; Fig. 3B-TSP95; Fig. 3C NeDLG; Fig. 3D-DLG1; Fig. 3E, PSD95; Fig. 3F-41.8. En Fig. 3A-B los péptidos competidores están presentes a 100 μ M; en Figs. 3C-F el competidor está presente a la concentración indicada.
- Las FIGURAS 4A y 4B muestran los resultados de la introducción de un péptido de fusión Tat-CD3 sobre la activación de las células T. La activación de las células T específicas de antígeno se midió por la producción de citoquinas. Los péptidos de fusión que contenían tat y un término carboxilo de la molécula de la superficie de las células T inhibían la producción de interferón y (IFN) por una línea de células T en respuesta a la estimulación de la proteína básica mielina (MBP). El nivel de inhibición se determinó sustrayendo primeramente la fijación del péptido marcado para GST solo de la fijación a la proteína de fusión y dividiendo por la señal en ausencia del péptido competidor.

Tablas

	Tabla 1	Clasificación de Aminoácidos
	Tabla 2	Pares Proteína-Ligando
	Tabla 3	Dominios PDZ
5	Tabla 3A	Nota acerca de la Tabla 3
	Tabla 4	Péptidos PL
	Tabla 5A&B	Motivos PL ilustrativos

5. DEFINICIONES

- 10 5.1 Una "proteína de fusión" o "polipéptido de fusión" como se utiliza en esta memoria hace referencia a una proteína compuesta, es decir, una sola secuencia de aminoácidos contiguos, constituida por dos (o más) polipéptidos heterólogos distintos que no están normalmente fusionados uno a otro en una sola secuencia de aminoácidos. Así, una proteína de fusión puede incluir una sola secuencia de aminoácidos que contiene dos secuencias de aminoácidos totalmente distintas o dos secuencias de polipéptidos similares o idénticas, con tal que estas secuencias no se encuentren normalmente juntas en la misma configuración en una sola secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza. Las proteínas de fusión pueden prepararse generalmente utilizando métodos de ácido nucleico recombinante, es decir como resultado de la transcripción y traducción de un producto de fusión de genes recombinantes, fusión que comprende un segmento que codifica un polipéptido de la invención y un segmento que codifica una proteína heteróloga, o por métodos de síntesis química bien conocidos en la técnica.
- 20 5.2 Un "constructo de proteínas de fusión" como se utiliza en esta memoria, es un polinucleótido que codifica una proteína de fusión.
- 25 5.3 Como se utiliza en esta memoria, el término "dominio PDZ" se refiere a la secuencia de proteína (es decir, el dominio modular de proteína) de aproximadamente 90 aminoácidos, caracterizado por homología a la proteína sináptica cerebral PSD-95, la proteína Discs-Large de la unión septada de *Drosophila* (DLG) y la proteína de la unión epitelial fuerte ZO1 (ZO1). Los dominios PDZ se conocen también como repeticiones de homología Discs-Large ("DHRs"), y repeticiones GLGF. Los dominios PDZ parecen por regla general mantener una secuencia de consenso central (Doyle, D.A., 1996, *Cell* 85: 1067-1076).
- 30 Los dominios PDZ se encuentran en diversas proteínas asociadas a la membrana que incluyen miembros de la familia MAGUK de homólogos de guanilato-quinasa, varias proteínas fosfatases y quinasas, la sintasa de óxido nítrico neuronal, varias proteínas asociadas a distrofina, conocidas colectivamente como sintrofinas.
- 35 5.4 Como se utiliza en esta memoria, el término "proteína PDZ" se refiere a una proteína existente naturalmente que contiene un dominio PDZ, v.g., una proteína humana. Proteínas PDZ ilustrativas incluyen CASK, MPP1, DLG1, PSD95, NeDLG, TAX33, SYN1a, TAX43, LDP, LIM, LIMK1, LIMK2, MPP2, NOS1, AF6, PTN-4, prl16, 41.8kD, KIAA0559, RGS12, KIAA0316, DVL1, TAX40, TIAM1, MINT1, KIAA0303, CBP, MINT3, TAX2, KIAA0561. Proteínas PDZ ilustrativas se enumeran en TABLA 2 y TABLA 3.
- 40 5.5 Como se utiliza en esta memoria, el término "polipéptido de dominio PDZ" hace referencia a un polipéptido que contiene un dominio PDZ, tal como una proteína de fusión que incluye una secuencia de dominio PDZ, una proteína PDZ existente naturalmente, o un péptido de dominio PDZ aislado.
- 45 5.6 Como se utiliza en esta memoria, el término "proteína PL" o "proteína ligando PDZ" se refiere a una proteína existente naturalmente que forma un complejo molecular con un dominio PDZ, o a una proteína cuyo término carboxi, cuando se expresa por separado de la proteína de longitud total (v.g., como un fragmento peptídico de 4-25 residuos, v.g., 16 residuos), forma un complejo molecular de este tipo. El complejo molecular puede observarse in vitro utilizando el "ensayo A" o el "ensayo G" descritos más adelante, o in vivo. Las proteínas PL ilustrativas que se muestran en la TABLA 2 se ha demostrado que se fijan a proteínas PDZ específicas. Esta definición no pretende incluir anticuerpos anti-PDZ y análogos.
- 50 5.7 Como se utiliza en esta memoria, una "secuencia PL" se refiere a la secuencia de aminoácidos del término C de una proteína PL (v.g. los residuos C-terminales 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 20 ó 25) ("secuencia PL C-terminal") o a una secuencia interna que se sabe que se fija a un dominio PDZ ("secuencia PL interna").

5.8 Como se utiliza en esta memoria, un "péptido PL" es un péptido que tiene una secuencia de, o basada en, la secuencia del término C de una proteína PL. Péptidos PL ilustrativos (biotinilados) se enumeran en la TABLA 4.

5.9 Como se utiliza en esta memoria, una "proteína de fusión PL" es una proteína de fusión que tiene una secuencia PL como un dominio, típicamente como el dominio C-terminal de la proteína de fusión. Una proteína de fusión PL ilustrativa es una fusión de secuencias tat-PL.

5.10 Como se utiliza en esta memoria, el término "secuencia peptídica inhibidora de PL" hace referencia a un péptido PL o a una secuencia de aminoácidos que (en la forma de un péptido o proteína de fusión PL) inhibe la interacción entre un péptido de dominio PDZ y un péptido PL (v.g., en un ensayo A o un ensayo G).

10 5.11 Como se utiliza en esta memoria, una "secuencia codificante de dominio PDZ" significa un segmento de un polinucleótido que codifica un dominio PDZ. En diversas realizaciones, el polinucleótido es DNA, RNA, monocatenario o bicatenario.

15 5.12 Como se utiliza en esta memoria, los términos "antagonista" e "inhibidor", cuando se utilizan en el contexto de la modulación de una interacción de fijación (tal como la fijación de una secuencia de dominio PDZ a una secuencia PL) se utilizan intercambiablemente y se refieren a un agente que reduce la fijación de la, v.g. secuencia PL (v.g., péptido PL) y la, v.g., secuencia del dominio PDZ (v.g., proteína PDZ, péptido de dominio PDZ).

5.13 Como se utiliza en esta memoria, los términos "agonista" y "intensificador", cuando se utilizan en el contexto de modulación de una interacción de fijación (tal como la fijación de una secuencia de dominio PDZ a una secuencia PL), se utilizan intercambiablemente y se refieren a un agente que aumenta la fijación de la, v.g., secuencia PL (v.g., péptido PL), y la, v.g., secuencia de dominio PDZ (v.g., proteína PDZ, péptido de dominio PDZ).

20 5.14 Como se utiliza en esta memoria, los términos "mimético peptídico", "peptidomimético", y "análogo peptídico" se utilizan intercambiablemente y se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de un péptido inhibidor de PL o péptido de fijación de PL de la invención. El mimético puede estar compuesto enteramente por análogos de aminoácidos sintéticos, no naturales, o bien es una molécula químérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético puede incorporar también cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales con tal que tales sustituciones no alteren sustancialmente la estructura del mimético y/o la actividad inhibidora o actividad de fijación. Como en el caso de los polipéptidos de la invención que son variantes conservadoras, la experimentación de rutina determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no se alteren sustancialmente. Así pues, una composición mimética está dentro del alcance de la invención si la misma es capaz de fijarse a un dominio PDZ y/o inhibir una interacción PL-PDZ.

30 Las composiciones miméticas de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que son típicamente de 3 grupos estructurales: a) grupos de enlace de residuos distintos de los enlaces de unión de amidas naturales ("enlace peptídico"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos existentes naturalmente; o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, que inducen o estabilizan una estructura secundaria, v.g. una vuelta beta, vuelta gamma, hoja beta, conformación de hélice alfa, y análogos.

40 Un polipéptido puede caracterizarse como un mimético cuando la totalidad o algunos de sus residuos están unidos por medios químicos distintos de enlaces peptídicos naturales. Residuos peptidomiméticos individuales pueden estar unidos por enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, v.g., aldehído glutárico, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidas bifuncionales, N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC). Grupos enlazadores que pueden ser una alternativa al enlace amídico tradicional ("enlace peptídico") incluyen, v.g., cetometileno (v.g., -C(=O)-CH₂-for-C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida, o éster (véase, v.g., Spatola (1983) en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, A Peptide Backbone Modifications, Marcel Dekker, NY).

45 Un polipéptido puede caracterizarse también como un mimético por contener la totalidad o algunos residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos existentes naturalmente. Los residuos no naturales se describen detalladamente en la literatura científica y de patentes; unas cuantas composiciones no naturales ilustrativas útiles como miméticos de residuos de aminoácidos naturales y líneas orientativas se describen a continuación.

50 Miméticos de aminoácidos aromáticos pueden generarse reemplazando por, v.g., D-o L-naftilanina; D-o L-fenilglicina; D-o L-2-tienilanina; D-o L-1, 2, 3 ó 4-pirenilanina; D-o L-3-tienilanina; D-o L-(2-piridinil)-alanina; D-o L-(3-piridinil)-alanina; D-o L-(2-pirazinil)-alanina; D-o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluorofenilanina; D-o L-p-bifenil-fenilalanina; K-o L-p-metoxibifenilfenilanina; D-o L-2-indol (alquil) alaninas; y D-o L-alquilaminas, donde alquil puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, iso-pentilo, sustituido o insustituido o un aminoácido no acídico.

55 Anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, v.g., los anillos tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo, y anillos aromáticos piridílicos.

Miméticos de aminoácidos de carácter ácido pueden generarse por sustitución por, v.g., aminoácidos distintos de carboxilato mientras mantienen una carga negativa; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. Grupos carboxilo laterales (v.g., aspartilo o glutamilo) pueden modificarse también selectivamente por reacción con carbodiimidas ($R = -N-C-N-R=$) tales como, v.g., 1-ciclohexil-3(2-morfolinil-(4-etil)carbodimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetilpentil)-carbodimida.

5 Aspartilo o glutamilo pueden convertirse también en residuos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

Miméticos de aminoácidos básicos pueden generarse por sustitución con, v.g., (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina, citrulina, o ácido (guanidino)-acético, o ácido (guanidino)-alquil-acético, donde alquilo se ha definido arriba. Un derivado nitrilo (v.g., que contiene el resto CN-en lugar de COOH) puede sustituirse en lugar de asparagina o glutamina. Los residuos asparaginilo y glutaminilo pueden desaminarse para dar los residuos aspartilo o glutamilo correspondientes.

10 Pueden generarse miméticos de residuos arginina por reacción de arginilo con, v.g., uno o más reactivos convencionales, que incluyen, v.g., fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, o ninhidrina, preferiblemente en condiciones alcalinas.

15 Los miméticos de residuos tirosina pueden generarse por reacción de tirosilo con v.g., compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano, N-acetilimidazol y tetranitrometano pueden utilizarse para formar especies de O-acetil-tirosilo y 3-nitroderivados, respectivamente.

20 Pueden generarse miméticos de residuos cisteína por reacción de residuos cisteinilo con, v.g., alfa-haloacetatos tales como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y aminas correspondientes; para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Pueden generarse también miméticos de residuos cisteína por reacción de residuos cisteinilo con v.g., bromotrifluoroacetona, ácido alfabromo-beta-(5-imidazoil)-propiónico; fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil-disulfuro; metil-2-piridil-disulfuro; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol; o, cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol.

25 Pueden generarse miméticos de lisina (y pueden alterarse algunos residuos amino-terminales) por reacción de lisinilo con, v.g., anhídrido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. Lisina y otros miméticos de residuos que contienen alfa-amino pueden generarse también por reacción con imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pantanodiona, y reacciones con gioxilato catalizadas por transamidas.

30 Pueden generarse Miméticos de metionina por reacción con, v.g., metionina-sulfóxido. Miméticos de prolina incluyen, v.g., ácido pipecólico, ácido tiazolidina-carboxílico, 3-o 4-hidroxiprolina, deshidroprolina, 3-o 4-metilprolina, o 3,3-dimetilprolina. Pueden generarse miméticos de residuos histidina por reacción de histidilo con v.g., procarbonato de dietilo o bromuro de parabromofenacilo.

35 Otros miméticos incluyen, v.g., los generados por hidroxilación de prolina y lisina; fosforilación de los grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo; metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; acetilación de la amina N-terminal; metilación de residuos amina de la cadena principal o sustitución con N-metil-aminoácidos; o amidación de grupos carboxilo C-terminales.

40 Un componente de un polipéptido natural (v.g., un polipéptido PL o polipéptido PDZ) puede reemplazarse también por un aminoácido (o residuo peptidomimético) de la quiralidad opuesta. Así, cualquier aminoácido que exista naturalmente en la configuración L (a la que puede hacerse referencia también como R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede reemplazarse con el aminoácido del mismo tipo estructural químico o un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, al que se hace referencia generalmente como el D-aminoácido, pero que puede designarse también como la forma R o S.

45 Los miméticos de la descripción pueden incluir también composiciones que contienen un residuo mimético estructural, particularmente un residuo que induce o mimetiza estructuras secundarias, tales como una vuelta beta, hoja beta, estructuras de hélice alfa, vueltas gamma, y análogas. Por ejemplo, la sustitución de residuos de aminoácidos naturales con D-aminoácidos; N-alfa-metil-aminoácidos; C-alfa-metil-aminoácidos; o deshidroaminoácidos comprendidos dentro de un péptido pueden inducir o estabilizar vueltas beta, vueltas gamma, hojas beta o conformaciones de hélice alfa. Estructuras miméticas de vuelta beta han sido descritas, v.g., por Nagai (1985) *Tet. Lett.* 26:647-650; Feigl (1986) *J. Amer. Chem. Soc.* 108:181-182; Kahn (1988) *J. Amer. Chem. Soc.* 110:1638-1639; Kemp (1988) *Tet. Lett.* 29:5057-5060; Kahn (1988) *J. Molec. Recognition* 1:75-79. Estructuras miméticas de hoja beta han sido descritas, v.g., por Smith (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 10672-10674. Por ejemplo, una vuelta beta de tipo VI inducida por un sustitutivo de cis-amida, tetrazol 1,5-disustituido, ha sido descrita por Beusen (1995) *Biopolymers* 36: 181-200. La incorporación de residuos de omega-aminoácidos aquirales para generar unidades polimetileno como sustitución de enlaces amida ha sido descrita por Banerjee (1996) *Biopolymers* 39: 769-777. Estructuras secundarias de polipéptidos pueden analizarse por, v.g., por espectroscopía 1H NMR de campo alto o espectroscopía NMR 2D, véase, v.g., Higgins (1997) *J. Pept. Res.* 50: 421-435. Véase también Hruby (1997) *Biopolymers* 43: 219-266, Balaji, et al., Patente U.S. Núm. 5.612.895.

- 5.15 Como se utiliza en esta memoria, "variantes peptídicas" y "sustituciones de aminoácidos conservadores" se refieren a péptidos que difieren de un péptido de referencia (v.g., un péptido que tiene la secuencia del término carboxi de una proteína PL especificada) por sustitución de un residuo de aminoácido que tiene propiedades similares (basadas en tamaño, polaridad, hidrofobicidad, y análogos). Así, en la medida en que los compuestos que
- 5 están abarcados dentro del alcance de la invención se definen parcialmente en términos de residuos de aminoácidos de clases designadas, los aminoácidos pueden clasificarse generalmente en tres clases principales: aminoácidos hidrófilos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos afines a cisteína, dependiendo fundamentalmente de las
- 10 características de la cadena lateral del aminoácido. Estas clases principales pueden dividirse ulteriormente en subclases. Los aminoácidos hidrófilos incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas, básicas o polares, y los aminoácidos hidrófobos incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas o apolares. Los aminoácidos apolares pueden subdividirse ulteriormente para incluir, entre otros, aminoácidos alifáticos. Las definiciones de las clases de aminoácidos como se utilizan en esta memoria son como sigue:
- "Aminoácido Hidrófobo" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que está desprovista de
- 15 carga al pH fisiológico y que es repelida por las soluciones acuosas. Ejemplos de aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen Ile, Leu y Val. Ejemplos de aminoácidos hidrófobos no codificados genéticamente incluyen t-BuA.
- "Aminoácido Aromático" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que contiene al
- 20 menos un anillo que tiene un sistema de electrones π conjugados (grupo aromático). El grupo aromático puede estar sustituido ulteriormente con grupos tales como grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxilo, sulfanilo, nitró y amino, y otros. Ejemplos de aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen Phe, Tyr y Trp. Aminoácidos aromáticos no codificados genéticamente y que se encuentran comúnmente incluyen fenilglicina, 2-naftilalanina, β -2-tenilalanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, 4-cloro-fenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina y 4-fluorofenilalanina.
- "Aminoácido Apolar" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que está
- 25 generalmente desprovista de carga al pH fisiológico y que es apolar. Ejemplos de aminoácidos apolares codificados genéticamente incluyen Gly, Pro y Met. Ejemplos de aminoácidos apolares no codificados incluyen Cha.
- "Aminoácido Alifático" se refiere a un aminoácido apolar que tiene una cadena lateral hidrocarbonada
- 30 saturada o insaturada, lineal, ramificada o cíclica. Ejemplos de aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen Ala, Leu, Val e Ile. Ejemplos de aminoácidos alifáticos no codificados incluyen Nle.
- "Aminoácido Hidrófilo" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que es atraída por las
- 35 soluciones acuosas. Ejemplos de aminoácidos hidrófilos codificados genéticamente incluyen Ser y Lys. Ejemplos de aminoácidos hidrófilos no codificados incluyen Cit y hCys.
- "Aminoácido Acídico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor pK de la cadena lateral menor
- 40 que 7. Los aminoácidos de carácter ácido tienen típicamente cadenas laterales cargadas negativamente al pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Ejemplos de aminoácidos de carácter ácido codificados genéticamente incluyen Asp y Glu.
- "Aminoácido Básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor pK de la cadena lateral mayor que
- 45 7. Los aminoácidos básicos tienen típicamente cadenas laterales cargadas positivamente al pH fisiológico debido a la asociación con ion hidronio. Ejemplos de aminoácidos de carácter básico codificados genéticamente incluyen Arg, Lys e His. Ejemplos de aminoácidos básicos no codificados genéticamente incluyen los aminoácidos no cíclicos ornitina, ácido 2,3-diaminopropionico, ácido 2,4-diaminobutírico y homoarginina.
- "Aminoácido Polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que no está cargada al
- 50 pH fisiológico, pero que tiene un enlace en el cual el par de electrones compartidos en común por dos átomos es retenido más estrechamente por uno de los átomos. Ejemplos de aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen Asx y Glx. Ejemplos de aminoácidos polares no codificados genéticamente incluyen citrulina, N-acetil-lisina y metionina-sulfóxido.
- "Aminoácido Semejante a Cisteína" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral capaz de formar un enlace covalente con una cadena lateral de otro residuo de aminoácido, tal como un enlace disulfuro.
- 55 Típicamente, los aminoácidos afines a cisteína tienen generalmente una cadena lateral que contiene al menos un grupo tiol (SH). Ejemplos de aminoácidos afines a cisteína codificados genéticamente incluyen Cys. Ejemplos de aminoácidos semejantes a cisteína o codificados genéticamente incluyen homocisteína y penicilamina.
- Como será apreciado por los expertos en la técnica, la clasificación anterior no es absoluta, exhibiendo varios aminoácidos más de una propiedad característica, y pueden incluirse por tanto en más de una categoría. Por ejemplo, la tirosina tiene a la vez un anillo aromático y un grupo hidroxilo polar. Así pues, la tirosina tiene propiedades duales y puede incluirse en ambas categorías, aromática y polar. Análogamente, además de poder

formarse enlaces disulfuro, la cisteína tiene también carácter apolar. Así pues, si bien no se clasifica estrictamente como aminoácido hidrófobo o apolar, en muchos casos la cisteína puede utilizarse para conferir hidrofobicidad a un péptido.

Ciertos aminoácidos encontrados comúnmente que no son codificados genéticamente de los cuales pueden estar constituidos los péptidos y análogos de péptidos de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, β -alanina (b-Ala) y otros omega-aminoácidos tales como ácido 3-aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etcétera; ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava), Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Me-Ile); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); 2-naftilanina (2-Nal); 4-clorofenilanina (Phe (4-Cl)); 2-fluorofenilanina (Phe (2-F)); 3-fluorofenilanina (Phe (3-F)); 4-fluorofenilanina (Phe (4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1, 2, 3, 4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); β -2-tienilanina (Thi); metionina sulfóxido (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2, 3-diaminobutírico (Dab); ácido 2, 3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilanina (Phe (pNH₂)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys) y homoserina (hSer). Estos aminoácidos caen también convenientemente en las categorías arriba definidas.

Las clasificaciones de los aminoácidos arriba descritos codificados genéticamente y no codificados se resumen a continuación en la **TABLA 1**. Debe entenderse que la **TABLA 1** se da únicamente para propósitos ilustrativos y no pretende ser una lista exhaustiva de residuos de aminoácido que pueden comprender los péptidos y análogos de péptidos descritos en esta memoria. Otros residuos de aminoácido que son útiles para producir los péptidos y análogos de péptidos descritos en esta pueden encontrarse, v.g., en Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry y Molecular Biology, CRC Press, Inc., y las referencias citadas en dicho lugar. Los aminoácidos no mencionados específicamente en esta memoria pueden clasificarse convenientemente en las categorías arriba descritas sobre la base de su comportamiento conocido y/o sus propiedades características químicas y/o físicas en comparación con aminoácidos identificados específicamente.

25

TABLA 1

Clasificación	Codificado Genéticamente	No Codificado Genéticamente
Hidrófobo		
Aromático	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe(4-Cl), Phe(2-F), Phe(3-F), Phe(4-F), Piridil Ala, Benzotienil Ala
Apolar	M, G, P	
Alifático	A, V, L, I	t-BuA, t-BuG, Me-Ile, Nle, MeVal, Cha, bAla, MeGly, Aib
Hidrófilo		
Acídico	D, E	
Básico	H, K, R	Dpr, Om, hArg, Phe(p-NH ₂), DBU, A ₂ BU
Polar	Q, N, S, T, Y	Cit, AcLys, MSO, hSer
Semejante a cisteína	C	Pen, hCys, p-metil Cys

5.16 Como se utiliza en esta memoria, un "marcador detectable" tiene significado ordinario en la técnica y se refiere a un átomo (v.g. radionucleido), molécula (v.g., fluoresceína), o complejo, que se utiliza o puede utilizarse para detectar (v.g. debido a una propiedad física o química), indicar la presencia de una molécula o permitir la fijación de otra molécula a la que está unido covalentemente o asociado de otro modo. El término "marcador" se refiere también a moléculas enlazadas covalentemente o asociadas de otro modo (v.g., una biomolécula tal como una enzima), que actúan sobre un sustrato para producir un átomo, molécula o complejo detectable. Marcadores detectables adecuados para uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcadores útiles en la presente invención incluyen biotina para tinción con conjugado de estreptavidina marcado, bolitas magnéticas

(v.g., Dynabeads TM), tintes fluorescentes (v.g. fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente intensificada, y análogos), radiomarcadores (v.g., 3H, 125I, 35S, 14C, o 32P), enzimas (v.g., hidrolasas, particularmente fosfatases tales como fosfatasa alcalina, esterasas y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidases tales como peroxidasa de rábano picante, y otras utilizadas 5 comúnmente en ELISAS), sustratos, cofactores, inhibidores, grupos quimioluminiscentes, agente cromógenos, y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (v.g., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las Patentes U.S. Núms. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149, y 4.366.241. Medios para detectar tales 10 marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, los radiomarcadores y marcadores quimioluminiscentes pueden detectarse utilizando film fotográfico o contadores de centelleo; los marcadores fluorescentes pueden detectarse utilizando un fotodetector para detectar la luz emitida (v.g., como la clasificación de células activadas por fluorescencia). Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente proporcionando la enzima 15 con un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan por simple visualización del marcador coloreado. Así, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunooquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. El marcador puede estar acoplado directa o indirectamente al componente deseado 20 del ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Los marcadores no radioactivos se fijan a menudo por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (v.g., biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando se fija luego a una molécula anti-ligando (v.g. estreptavidina) que es o bien detectable inherentemente o se 25 une covalentemente a un sistema generador de señal tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente. Pueden utilizarse cierto número de ligandos y anti-ligandos. Donde un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina, y cortisol, el mismo puede utilizarse en asociación con los anti-ligandos marcados, existentes naturalmente. Alternativamente, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede 30 utilizarse en combinación con un anticuerpo. Las moléculas pueden conjugarse también directamente a generadores de señal, v.g., por conjugación con una enzima o fluoróforo. Medios de detección de marcadores son bien conocidos para los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, donde el marcador es un marcador radiactivo, los medios para detección incluyen un contador de centelleo, un film fotográfico como en la autorradiografía, o 35 formación de imágenes de almacenamiento por luminiscencia. Donde el marcador es un marcador fluorescente, el mismo puede detectarse por excitación del fluorocromo con la longitud de onda luminosa acoplada y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, por medio de film fotográfico, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de acoplamiento de carga (CCDs) o fotomultiplicadores y análogos. Análogamente, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la 40 enzima y detectando el producto de reacción resultante. Asimismo, los marcadores colorimétricos simples pueden detectarse por observación del color asociado con el marcador. Se apreciará que cuando se utilizan en un ensayo pares de fluoróforos, a menudo se prefiere que los mismos tengan patrones de emisión (longitudes de onda 45 distintos de tal modo que los mismos puedan diferenciarse fácilmente.

5.17 Como se utiliza en esta memoria, el término "sustancialmente idéntico" en el contexto de la comparación de secuencias de aminoácidos, significa que las secuencias tienen al menos aproximadamente 70%, al menos 40 aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90% de identidad de residuos de aminoácidos cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima. Un algoritmo que es adecuado para determinar la identidad de secuencia y semejanza de secuencias porcentual es el algoritmo FASTA, que se describe en Pearson, W.R. & Lipman, D.J., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444. Véase también W. R. Pearson, 1996, Methods Enzymol. 266: 227-258. Parámetros preferidos utilizados en una alineación FASTA de secuencias de DNA para calcular la identidad porcentual están optimizados, BL50 Matrix 15:-5, k-tuple = 2; penalidad de unión = 40, optimización = 28, penalidad de laguna -12, penalidad de longitud de laguna = -2; y anchura: 16.

5.18 Como se utiliza en esta memoria, "células hematopoyéticas" incluyen leucocitos, que comprenden linfocitos (células T, células B y células NK), monocitos, y granulocitos (es decir, neutrófilos, basófilos y eosinófilos), macrófagos, células dendríticas, megacariocitos, reticulocitos, eritrocitos, y células madre CD34+.

6. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

50 Los autores de la presente invención han descubierto que las interacciones entre las proteínas PDZ y las proteínas PL juegan un papel importante y extenso en la función biológica de las células hematopoyéticas y otras células implicadas en la respuesta inmune. Aunque las interacciones PDZ-PL se conocían en el sistema nervioso (es decir 55 en las neuronas), su importancia universal en la función de las células hematopoyéticas, especialmente en la función de las células T y las células B, y su papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune no ha sido reconocida hasta ahora. En particular, los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que moléculas de adhesión celular que median la interacción célula-célula en el sistema hematopoyético son proteínas de fijación de PDZ (proteínas PL) y se fijan a las proteínas PDZ. Los inventores han identificado numerosas interacciones entre las proteínas PDZ y las proteínas PL presentes en las células del sistema inmunitario, y la invención proporciona reactivos y métodos que afectan a la función biológica en el sistema inmunitario por inhibición 60 de estas interacciones. Como se utiliza en esta memoria, el término "función biológica" en el contexto de una célula, hace referencia a una actividad biológica detectable llevada a cabo normalmente por una célula, v.g., un cambio fenotípico tal como proliferación, activación celular (v.g., activación de las células T, activación de las células B, formación de conjugados de células T-B), liberación de citoquinas, desgranulación, fosforilación de la tirosina, flujo

de iones (v.g., calcio), actividad metabólica, apoptosis, cambios en la expresión génica, mantenimiento de la estructura de la célula, migración de la célula, adherencia a un sustrato, transducción de señales, interacciones célula-célula, y otras descritas en esta memoria o conocidas en la técnica.

- 5 En un aspecto, la presente invención se refiere a péptidos o análogos de péptidos como se definen en las reivindicaciones. Los miméticos, composiciones farmacéuticas, y métodos de uso de tales composiciones para regular las actividades biológicas de las células hematopoyéticas, v.g., células T y células B, u otras células (v.g., células endoteliales) que son necesarias para la función inmune se describen también en esta memoria. La descripción se refiere adicionalmente a métodos de utilización de las composiciones para modular la activación y función inmune de las células hematopoyéticas, así como ensayos para tales inhibidores.
- 10 La TABLA 2 resume un análisis extenso de interacciones proteínicas en las células T y las células B. Las proteínas PDZ, la gran mayoría de las cuales no se conocía con anterioridad que se expresaran en las células del sistema inmunitario, se enumeran en la fila superior de la TABLA 2. La primera columna de la tabla enumera proteínas PL. Las posiciones en la matriz designadas con la letra "A" o "G" indican que una interacción entre la proteína PDZ y la PL ha sido detectada en nuevos ensayos de fijación (descritos en detalle en, v.g., la Sección 6.2, más adelante).
- 15 Una celdilla en blanco indica que no se ha detectado interacción alguna utilizando los ensayos de la invención. Un asterisco (*) denota una interacción PL-PDZ consignada previamente en la literatura científica.

TABLA 2
SUMARIO DE INTERACCIONES PDZ-LIGANDO/PDZ

UNIDADO PDZ	CÓDIGO	SEQ	CASK	MPP1	DLG1	PSD95	NeDLG	TAX33	SYN1a	TAX 43	LDP	LIM	LIMK1	LIMK2	MPP2
CD6	AA6L	TSAA													
CD49E (alfa-4)	AA11L	TSDA													
CD49F (forma alfa-4)	AA12L	TSDA													
CD166 (CD6L)	AA20L	XTEA													
CD148	AA55L	KTIA													
CC CKR-2	AA42L	KEGA													
CD138 (syndecan)	AA18L	EYEA	*												
CD148 (DEP-1)	AA19L	GYIA													
CD98 (2F4)	AA15L	PYAA													G
CLASP-1	AA11L	SREV			G	A	G								
CLASP-4	AA31-V	YAEV			A	A	A				A				
NMDA	AA34.2L	ESDV		A	A/G	A/G	A/G		G	A		A			G
VCAM1	AA17L	K3KV		A	A		A				A				
CLASP-2	AA21L	SSVV			A/G	A/G	A/G								
CD95 (Abs-1/Fas)	AA13L	QSLV			A/G	A/G	A/G								
KV1.3	AA33L	FTIV			A/G*	A/G*	A/G					A			
DNAM-1	AA22L	KTRV		A	A	A/G	A				A				G
CD63	AA47L	TELV			A	A	A								
CD44 (forma larga)	AA9L	KIGV		G											
Neuregln	AA38L	EYVV	G*	A*	A/G	A/G	G		A	A		A			
CD97 (CD55L)	AA14L	ESGI			A										
Glycophorin C	AA37L	EYFI	*	G	G	G									A
CDW128A (IL8RA)	AA29.1L	SSNL			A		A								
CD3n	AA41L	SSQL			A	A									
LPAP	AA30L	VTAL			A										
CD46 (forma 1)	AA10L	FTSL			A/G	A/G	G								
CDW128B (IL8RB)	AA29.2L	STTL			A/G	A	A/G								
DOC102	AA40L	STDL			A	A/G	G								
CD34	AA7L	DTEL			A	A	G								
CD5	AA49L	AQRL													
CC CKR-4	AA44L	EDAL													
FasLignd	AA231-M	LYKL													
CD62E	AA48L	SYIL													
CC CKR-1R	AA41L	SAGF													
CDW125 (IL5R)	AA28L	DSVF													
BLR-1	AA45L	LTTF													
CC CKR-3	AA43L	STVF													
			CASK	MPP1	DLG1	PSD95	NeDLG	TAX33	SYN1a	TAX 43	LDP	LIM	LIMK1	LIMK2	MPP2

* Interacciones descritas en la literatura científica

TABLA 2 (continuación)
SUMARIO DE INTERACCIONES PDZ-LIGANDO/PDZ

NOS1	AF6	PTN-4	prlL16	41.8	K559	RGS12	K316	DVL1	TAX 40	TIAM1	MINT1	K303	CBP	MINT3	TAX 2	K561	LIGANDO PDZ
					A												CD6
					A/G												CD45E (alfa-4)
					A/G												CD45F (forma alfa)
																	CD166 (CD6L)
																	CD148
																	CC CKR-2
					A/G					A							CD138 (syndecan)
																	CD148 (DEP-1)
																	CD98 (2F4)
																	CLASP-1
				A	A					A							CLASP-4
				A/G	A/G	A/G	A	A	A/G					A	G	NMDA	
						A			A	A							VCAM1
						A											CLASP-2
						A/G											CD95 (Apo-1/Fas)
							A	A	A			G					KV1.3
				A	A	A											DNAM-1
																	CD63
							G					G					CD44 (forma larga)
				A	A	A	A	A	A	A	A/G						Neurexina
							A										CD97 (CD56L)
				A								A					Glicoforina C
																	CDW126A (IL8RA)
							A/G					A/G					CD3n
												G					UPAP
																	CD46 (forma 1)
				A	*												CDW128B (IL8RB)
															G		DOCK2
																	CD34
																	CD5
																	CC CKR-4
												A					FcεRb
															G		FasLigand
																	CD62E
																	CC CKR-1R
				G			G										CDW125 (IL5R)
												G					BLR-1
																	CC CKR-3
NOS1	AF6	PTN-4	prlL16	41.8	K559	RSG12	K316	DVL1	TAX 40	TIAM1	MINT1	K303	CBP	MINT3	TX 2	K561	

*Interacciones descritas en la literatura científica

- Como se expone en detalle en esta memoria, las proteínas PDZ enumeradas en la TABLA 2 son proteínas existentes naturalmente que contienen un dominio PDZ. La presente invención está dirigida particularmente a la detección y modulación de interacciones entre proteínas PDZ y proteína PL en células hematopoyéticas. Proteínas PL ilustrativas se enumeran en la TABLA 2. Notablemente, como se expone más adelante, muchas de estas proteínas PL no han sido reconocidas previamente como tales en ningún sistema celular. Se conocen una diversidad de clases de proteínas PL, y las proteínas PL descritas en esta memoria pueden caracterizarse como (1) "proteínas PL de adhesión" (2) "proteínas PL de canales iónicos" (3) "proteínas PL adaptadoras" (4) "proteínas PL intracelulares" y (5) "proteínas PL receptoras de citoquinas".
- Como se utiliza en esta memoria, una proteína de adhesión es una proteína de la superficie celular implicada en interacciones célula-célula por contacto directo con moléculas de la superficie celular (v.g., proteínas transmembranales o proteínas de la superficie) en una célula diferente. Así, cuando una célula que expresa una proteína PL de adhesión entra en contacto con otra célula apropiada, la proteína PL de adhesión se localiza en la interfaz de las dos células y entra en contacto directamente con una molécula de la superficie celular de la segunda célula. Una interfaz célula-célula es una región en la que las membranas plasmáticas de dos células diferentes están en posición cercana (generalmente < 10 nm, a menudo aproximadamente 1 nm). Típicamente, el contacto molecular directo significa interacción de moléculas a distancias en las que son importantes las fuerzas de Van der Waals, por regla general menores que aproximadamente 1 nm. Proteínas PL de adhesión ilustrativas incluyen CD6; CD49E (alfa-4); CD49F (una forma, alfa6); CD138 (syndecan); CLASP-1; CLASP-4; VCAM1; CLASP-2; DNAM-1; CD83; CD44 (forma larga); CD97; (CD55L); CD3n; DOCK2; CD34; y FceRlb. Así, en una realización, las proteínas PL de la invención son proteínas PL de adhesión. En una realización, la invención proporciona métodos y reactivos, como se detallan en esta memoria, para inhibir las interacciones entre proteínas PL de adhesión y proteínas PDZ a fin de modular una respuesta inmune. En una realización, la inhibición o modulación ocurre en una célula hematopoyética. En una realización afín, la inhibición o modulación ocurre en una célula endotelial. En una realización afín, la inhibición o modulación ocurre en una célula epitelial, queratinocitos, hepatocitos y miocitos cardiacos.
- Como se utiliza en esta memoria, una proteína de canales iónicos significa una proteína transmembranal que cataliza por sí misma el paso de un ion a solución acuosa en un lado de una membrana de la bicapa lipídica a solución acuosa en el otro lado (v.g., por formación de un pequeño poro en la membrana). Una proteína PL de canales iónicos ilustrativa es Kv1.3. Así, en una realización, las proteínas PL de la invención son proteínas PL de canales iónicos. En una realización, la invención proporciona métodos y reactivos, como se detallan en esta memoria, para inhibición de interacciones entre proteínas PL de canales iónicos y proteínas PDZ para modular una respuesta inmune. En una realización, la inhibición o modulación ocurre en una célula hematopoyética. En una realización afín, la invención o modulación ocurre en una célula endotelial.
- Como se utiliza en esta memoria, una proteína intercelular (es decir, citosólica) tiene el significado normal en la técnica y se refiere a una proteína que no está fijada a la membrana, v.g., no tiene dominio transmembranal alguno. Así, en una realización, las proteínas PL de la invención son proteínas PL intercelulares. Proteínas PL intercelulares ilustrativas incluyen Glicoforina C y LPAP. En una realización, la invención proporciona métodos y reactivos, como se detallan en esta memoria, para inhibición de las interacciones entre las proteínas PL citoplásmicas y las proteínas PDZ para modular una respuesta inmune. En una realización, la inhibición o modulación ocurre en una célula hematopoyética. En una realización afín, la inhibición o modulación ocurre en una célula endotelial.
- Como se utiliza en esta memoria, un receptor de citoquinas tiene el significado normal en la técnica y se refiere a una proteína de membrana con un dominio extracelular que fija específicamente una citoquina. Proteínas PL receptoras de citoquinas ilustrativas incluyen CDW125 (IL5R), CDW128A (IL8RA), y BRL-1. Así, en una realización, las proteínas PL de la invención son proteínas PL citoquinas. En una realización, la invención proporciona métodos y reactivos, como se detallan en esta memoria, para inhibir las interacciones entre las proteínas citoquina PL y las proteínas PDZ que modulan una respuesta inmune. En una realización, la inhibición o modulación ocurre en una célula hematopoyética. En una realización afín, la inhibición o modulación ocurre en una célula endotelial.
- Como se utiliza en esta memoria, una proteína adaptadora significa una molécula (v.g., proteína) que contribuye a la formación de un complejo multimolecular por fijación de dos o más biomoléculas distintas. La fijación de las dos o más moléculas distintas por la molécula/proteína adaptadora implica generalmente un contacto molecular directo entre la proteína adaptadora y cada una de las dos o más moléculas distintas. Una proteína adaptadora PL ilustrativa es LPAP. Así, en una realización, las proteínas PL de la invención son proteínas PL adaptadoras. En una realización, la invención proporciona métodos y reactivos, como se detallan en esta memoria, para inhibir las interacciones entre proteínas PL adaptadoras y proteínas PDZ para modular una respuesta inmune. En una realización, la inhibición o modulación ocurre en una célula hematopoyética. En una realización afín, la inhibición o modulación ocurre en una célula endotelial.
- En diversas realizaciones, las proteínas PL de la invención se caracterizan por secuencias de aminoácidos o motivos de aminoácidos C-terminales (es decir, del dominio PL) específicos, como se describe en otro lugar en esta descripción.

En diversas realizaciones de la invención, las proteínas PL de la invención se fijan a una proteína PDZ expresada en linfocitos T, linfocitos B, o a la vez en linfocitos T y linfocitos B. En una realización, la proteína PL se fija a una proteína PDZ expresada en células endoteliales. En diversas realizaciones, la proteína PL y/o la proteína PDZ a la que se fija aquélla no se expresan en el sistema nervioso (v.g., las neuronas).

5 En diversas realizaciones de la invención, la proteína PL de la invención se fija sólo a una proteína PDZ enumeradas en la TABLA 2. En otra realización, la proteína PL se fija a 1 a 3, 3 a 5, o más de 5 proteínas PDZ diferentes enumeradas en la TABLA 2.

En diversas realizaciones de la invención, la proteína PL se expresa o se regula en sentido creciente después de activación celular (v.g. en linfocitos B activados, linfocitos T), o después de entrada en mitosis (v.g., regulación 10 creciente en poblaciones de células que proliferan rápidamente).

En diversas realizaciones de la invención, la proteína PL es (i) una proteína que media la activación o migración de una célula inmune (v.g., célula hematopoyética), (ii) una proteína que no media apoptosis en un tipo de célula, (iii) una proteína que es distinta de un receptor acoplado a proteína G de siete hélices transmembranales, (iv) una proteína que es proteína G acoplada a un receptor de siete hélices transmembranales pero no un receptor de citoquinas, o (v) una proteína que no es una proteína G acoplada a un receptor de siete hélices transmembranales y es un receptor de citoquinas.

6.1 Detección de Proteínas que Contienen Dominio PDZ Expresadas en Células Hematopoyéticas

Como se ha indicado arriba, los autores de la presente invención descubrieron sorprendentemente que numerosas proteínas PDZ se expresan en células del sistema inmunitario, y juegan un papel biológico fundamental en la 20 modulación de la respuesta inmune. Se ha descrito previamente que proteínas PDZ DLG1 y TIAM-1 se encuentran en las células T. Los autores de la presente invención descubrieron, utilizando una búsqueda BLAST de la base de datos humana EST y los experimentos descritos más adelante, que varias proteínas PDZ adicionales están presentes en las células hematopoyéticas, con inclusión de MPP1, P-DLG, VELI-1, PSD95, sintenina en células T y CASK, DLG1, DLG2, ZIP KINASE, sintrofína 2, P-dlg, PSD95, y sintenina en las células B.

25 Para determinar el alcance pleno de la implicación de las proteínas PDZ en la función hematopoyética, los inventores emprendieron una investigación sistemática de las proteínas PDZ en las células T y B. Una lista exhaustiva de proteínas que contienen dominio PDZ se recuperó de la base de datos del Sanger Centre (Pfam) buscando la palabra clave, PDZ. Las secuencias de cDNA correspondientes se recuperaron de GenBank utilizando la base de datos "entrez" del NCBI (en lo sucesivo, "secuencias de cDNA de proteínas PDZ GenBank"). La porción 30 de DNA que codificaba dominios PDZ se identificó por alineación de cDNA y la secuencia de proteínas utilizando CLUSTALW. Basándose en la información de la alineación DNA/proteína, se diseñaron cebadores que abarcaban los dominios PDZ. La expresión de ciertas proteínas que contenían PDZ en células inmunes se detectó por amplificación de la región en cadena de polimerasa ("PCR") de cDNAs obtenidos por transcripción inversa ("RT") de RNA derivado de células inmunes (es decir, "RT-PCR"). PCR, RT-PCR y otros métodos para análisis y manipulación 35 de ácidos nucleicos son bien conocidos y se describen generalmente en Sambrook et al., (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ND ED., VOLS. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, en adelante "Sambrook"; y Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York (1997), tal como ha sido suplementado hasta enero 1999 (en lo sucesivo "Ausubel").

40 En los experimentos resumidos en la TABLA 2, se ensayoaron células T (línea de células Jurkat E6) y células B (línea de células MV 4-11) respecto a la expresión de genes que contenían el dominio específico PDZ por RT-PCR. Se preparó RNA utilizando el kit de preparación de RNA "trizol" (GIBCO-BRL; Cat. #15596-018) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Resumidamente, se cosecharon 1-5 x 10⁷ linfoblastos por centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a 20°C. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón PBS y se añadió 1 ml del reactivo 45 TRIZOL por cada 5 x 10⁶ células. La resuspensión de células se mezcló y después de 5 minutos de incubación a la temperatura ambiente (RT), se añadió cloroformo a 0,2 mg por ml de TRIZOL. La resuspensión se sacudió enérgicamente y se incubó durante 3 minutos más a RT. Las muestras se centrifugaron luego a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA con 2-propanol. El precipitado se recogió por centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C, se lavó con etanol al 55%, se recogió finalmente por otra centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C, se secó al aire y se resuspendió en un volumen apropiado de agua tratada con DEPC.

50 La concentración y pureza del RNA se determinaron por la medida de absorción de la luz a 270/280 nm por el ácido nucleico. Para la síntesis del cDNA se utilizó el kit de cDNA de transcriptasa inversa SUPERSCRIPT II (GIBCO-BRL; Cat. #18064-014). El aporte de RNA por 200 µl de la muestra de reacción de cDNA era 10 µg. Antes de la síntesis del cDNA, se trató el RNA con 1 unidad/µl de DNasa en 110 µl de agua a 37°C durante 20 minutos. La DNasa I se desactivó luego por incubación durante 10 minutos a 70°C. El cebador aleatorio se utilizó para cebado del cDNA; se añadieron 10 µl de cebador hexámero aleatorio (100 ng/µl), se calentaron las muestras a 70°C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo. Subsiguientemente, se añadieron 40 µl de tampón de la "primera cadena" SUPERSCRIPT II, 20 µl de DDT 0,1 M, 10 µl de una mezcla 10 mM de desoxinucleotido-trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) y 10 µl de transcriptasa inversa SUPERSCRIPT II y se llevó a cabo la síntesis del cDNA durante 45 minutos a 42°C. Las

reacciones se pararon por incubación durante 5 minutos a 95°C y se utilizaron típicamente 2-4 µl de tales muestras de cDNA para la PCR.

Se utilizó para la PCR una porción del cDNA (típicamente, 1/5 de una reacción de 20 µl). La PCR se condujo utilizando cebadores diseñados para amplificar específicamente regiones que contenían dominio PDZ de proteínas PDZ de interés. Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos para amplificar uno o más dominios codificantes de PDZ. Las secuencias de DNA que codificaban los diversos dominios PDZ de interés se identificaron por inspección (es decir, traducción conceptual de las secuencias de cDNA de la proteína PDZ obtenidas de GenBank, seguida por alineación con la secuencia de aminoácidos del dominio PDZ). La **TABLA 3** muestra los cebadores PCR, los dominios codificados por PDZ amplificados, y el número de acceso a GenBank de las proteínas que contenían dominio PDZ. Para facilitar la clonación subsiguiente de los dominios PDZ, los cebadores de la PCR incluían secuencias de endonucleasas de restricción en sus extremos a fin de permitir la ligación con el vector de clonación pGEX-3X (Pharmacia, GenBank XXI 13852) en marco con glutatión-S-transferasa (GST).

La **TABLA 3** enumera las proteínas detectadas en los ensayos mencionados anteriormente. Los resultados demostraron que las proteínas PDZ están ampliamente utilizadas en las células T y B tanto de una manera específica del linaje como de manera independiente del linaje. INADL 2/3 (dominio PDZ), KIAA0316, y p27 de la subunidad 26S se detectaron en células T pero no en células B. mCASK, KIAA0559, PTN-4 y X11beta se detectaron en células B, pero no en células T. AF6, proteína asociada a BAI1, proteína unida a Citohexina, DLG1, DLG5 (pdlg), DVL1, DVL3, GTPasa, 41,8 kd hipot., KIAA147, KIAA0300, KIAA0303, KIAA0380, KIAA0440, KIAA0545, KIAA0561, LIMK1, LIMK2, prot. del dominio LIM, proteína LIM, MINT1, MINT3, MPP1, MPP2, NE-DLG, NOS1, serina-proteasa nueva, PTN-3, prIL 16, PSD95, RGS12, serina-proteasa, SYNTENIN, SYNTR 1 alfa, TAX1, TAX2, TAX33, TAX40, Tax43 (SYN, Beta1), TIAM wwp3, y prot. X11 se detectaron tanto en células T como en células B.

TABLA 3 DOMINIOS PDZ

Clave:
 Se proporcionan los nombres de genes y los productos génicos correspondientes. En algunos casos, secuencias de cDNA que representan el mismo gen tienen varias entradas en las bases de datos bajo diferentes números de acceso y nombres. Los números de acceso representados corresponden al nombre de gen utilizado en esta descripción, y la numeración de nucleótidos y aminoácidos estará correlacionada con dichas entradas en GenBank. Las secuencias de aminoácidos representadas corresponden a las porciones de DNA clonadas de genes que contienen el dominio PDZ. Las secuencias de aminoácidos codificados por DNA que flanquean el sitio de clonación del vector de clonación pGEX-3X) se muestran en cursiva.

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOACÍDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
CASK	CASK	Y17138	AA495-584; dominio PDZ 1 (de 1) <i>HVTRVRLWQFQKNTDEPMGITLK MNELNHCIVARIMHGGMIHRQGT LHVGDEIREINGISVANQTVEQL QKMLREMRSITFKIVPSYRTQS LNSS</i>	Bam HI / Eco RI	6CAF 5' - TCGGATCCAT GTGACCAAG TTCGG -3', N1471-1494	7CAR 5' - TCGGAATTCA ACTGAGTGC TA -3', N1761-1738
MPP1	proteína de membrana de los eritrocitos de 55 Kd	M64925	AA101-186; dominio PDZ 1 (de 1) <i>RKVRLIQEFEKVTEEPFMGITLKL EKQSCTVAPRILHGGMIHRQGSLH VGDEILEINGTNVTNHSVDQLQK AMKRETKGMIISLRVIPNQREFIVT D</i>	Bam HI / Bam HI	62MPF 5' - GGGATCCGGA AAGTGC ACTAC -3', N296-320	63MPR 5' - ACGGATCCGCT GGTGGGAATT ACTT -3', N568-543

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
DLG1	homólogo humano de la proteína discs-large de <i>Drosophila</i>	U13897	AA275-477; dominios PDZ 1-2 (de 3)	Bam HI / Eco RI	1DF	2DR

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
PSD95	proteína humana de densidad postsináptica 95	U83192	AA387-724;	dominios PDZ 1-3 (de 3)	Bam HI / Eco RI	8PSF

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOACÍDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
NeDLG	proteína presináptica sao102 (neuroendocrina- <i>α</i> -d Ig)	U49089	AA205-1171; dominios PDZ 1-2 (de 3) QYEEIVLERGNGLGFSIAGGID NPHVPPDDPGIFITKIIIPGAAAM DGRLEVNDCVLRVNEDEVSEVVH SPRAVEALKEAGPVMRLLVVRQQP PPETIMEVNLLKGPKGLGESIAG GIGNQHIPGDNSIYTAKIEGGA AQKDGRILQIGDRILLAVNNTNLQD VRHEEAVASLKNTSDMVYLKVAK PGSPPR	Bam HI / Eco RI 5' - CAGGATCAA TATGAGGAA TCGTACTTG- 3', N608-635	71NEDF 5' - TTGAATTGAG GCTGCCTGGCT TGGC-3', N1186-1161	72NEDR
TAX33	proteína de interacción Tax 33	AF028826	AA73-162; dominio PDZ 1 (de 1) HSHPRVVELPKTDEGLGFNVMGG KEQNSPIYISRIIIPGGVAERHGG LKRGDQLLSVNGVSVEGEHHEKA VELLKAAKDSVVKLTVVRYTPKVLE FIVTN	Bam HI / Eco RI 5' - GTGGGATCCA CTCCCACCT CGAGTAG-3', N208-234	92TAF 5' - CATGAATTCCA GAACCTTTGGG TGTATCGC-3', N497-468	93TAR 5' - CATGAATTCCA GAACCTTTGGG TGTATCGC-3', N497-468
SYN 1 α	alpha 1-syntrphin	U40571	AA96-189 dominio PDZ 1 (de 1) QRRRVTVRKADAGGLGISIKGGR ENKMPILISKIFKGLAADOTEAL EVGDAILSVNGEDLISSATHDEAV QVLKKTGKEVWVKYMKDVSPLY EKNSS	Bam HI / Eco RI 5' - TACGGATCCA GCGGCCCG CGTGAC-3', N279-301	124SYF 5' - TACGGATCCA GCGGCCCG CGTGAC-3', N576-551	125SYR 5' - GTAGAATTCTT GAAATACGGTG AGAC-3', N576-551

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
TAX43	proteína humana de interacción tax 43	AF028828	AA15-85 dominio PDZ 1 (de 1)	Bam HI / Eco RI	97TAF	98TAR
			QKRGVKVLKQELGGLGISIKGGK ENKMPILISKIFKGKAAADQTQAL YVGDAILSVNGADLRDATHDEAV QALQFIVTN		5' - TCTGGATCCA GAAGCGTGGC GTGAAGG-3' N37-63	5' - CGGAATTCAAC GCCCTGCACCGC CTC-3' N267-231
LDP	proteína de dominio clip-36	U90878	AA46-88 dominio PDZ 1 (de 1)	Bam HI / Eco RI	146LIF	147LIR
			RGMTTQQIDLQGPGPWGFRLVGG KDFEQPLAISRVTPGSKAALASS		5' - CCAGGATCCG CGGAATGACC ACCCAGC-3' N129-155	5' - CATGAAATTCGC TAGAGCCGCC TGCTT-3' N276-239
LIM	Proteína LIM humana	AF061258	AA29-112; dominio PDZ 1 (de 1)	Bam HI / Eco RI	182LF	183LR
			LSNYSVSLVGPAPWIGFRLQGGKD FNMPLTISSLKDGGKAAQANVRI GDVVLISIDGINAQGMTHLEAQNK IKGCTGSLNMTLQRASC		5' - TTAGGGATCCCT GAGCAAGTAC AGTGTGTAC -3' N86-115	5' - CTTGAATTCAAC CAGATGCTCTT TGCAGAGTC- 3' N350-320
LIMK1	quinasa 1 de dominio LIM humana	NM_002314	AA194-291; dominio PDZ 1 (de 1)	SMA I	52LIFP	53LIRP

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
			TVTLVSI PASSHKGKRGILSVSIDP PHGPPGCGTEHSHTTVRVQGVDPG CMSPDVKNSIHVGDRILEINGTP IRNVPLDEIDLLIQTTSRLLQLT IEHDPGIHRD	5' – CTGGCCGGGA CGTCACCT GGTGTCC-3' N570-597	5' – TCGCCCGGGTC ATGCTCGAGGG TC-3' N874-851	
LIMK2	quinasa 2 de dominio LIM humana	D45906	AA185-275; dominio PDZ 1 (de 1) FYSVTLISMPATTEGRRGFSVSV ESACSNAYATTVQVKEVNRMHISP NNRNAIHPGDRILEINGTPVRTL RVEEVEDAISQTSQTSQTLLEHE FIVTN	Bam HI/Eco RI	185LF 5' – AGCGGATCCC CTACTCTGTC ACGCTCATTC- 3', N545-573	186LR 5' – GACGAATTCAAT GTTCATCAAC AGCTGAAG-3' N834-805
MPP2	miembro 2 de la subfamilia maguk p55 (DLG2)	X822895	AA185-273; dominio PDZ 1 (de 1) QPVPPDAVRMVGIRKTAGEHLGV TFRVEGGELVIARILHGGMVAQQ GLLHVGDIIKEVNGQPVGSDDPRA LQELLRNASGSVILKILPNYQVF IVTD	Bam HI/Eco RI	142MF 5' – TCAGGGATCCA GCCTGTACCT CCCGATGC- 3', N542-569	143MR 5' – ATGGAATTCCCT GGTAGTTGGGC AGGATC-3' N828-801

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
NOS1	óxido nítrico sintasa neuronal humana	U17327	AA239-988; dominio PDZ 1 (de 1) IQPNVISVRLFKRKVGGIGFLVK ERVSKPPVIIISDLIRGAAEQSG LIQAGDIILAVNNGRPLVDSLSDS ALEVLRLGIASETHVVLILRGPEF IVTD	Bam HI / Eco RI	155NOF 5' - AGCGGATCCA GCCCAATGTC ATTTC-3', N711-733	156NOR 5' - GAAGAATTCA GGCCCTTCAGA ATG-3' N994-970
AF6	proteína af-6	U02478	AA985-1077; dominio PDZ 1 (de 1) LRKEPEIITVTLKKQNGMGLSIV AAKGAGQDKLGIYVKSVVKGAA DWDGRLAAGDQLLSVGDGRSLVGL SQERAELMTRTSSVVTLLEVAKQ GEFIVTD	Bam HI / Eco RI	66AFF 5' - TCGGATCCTG AGGAAAGAAC CTGAA-3', N2946-2970	67AFR 5' - TAGAATTCA CTGCTTTGCTA CTTC-3', N3239-3214
PTN4	proteíntirosina-fosfatasa m ^{eg} 1	M68941	AA774-862; dominio PDZ 1 (de 1) LIRMKPDENGREFGVKGGYDQK MPVIVSRVAPGTPADLCPRLNE GDQVVLINGRDIAEHTHDQVVLF IKASCERHSGELMLVRPNAEFT IVTD	Bam HI / Eco RI	248PTR 5' - ATCGGATCCT AATCAGAAATG AACCTG-3', N2312-2338	248PTR 5' - ATCGAATTCA CATTAGGTCGA ACTAG-3', N2595-2569

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
prIL16	precursor putativo de la interleuquina 16	S81601	AA170-383; dominio PDZ1-2 (de 2) HVTILHKEEGAGLIGFESLAGGADL ENKVITVHRVFPNGLASQEGTIQ KGNEVLSINGKSLKGTTTHHDALA ILRQAREPROAVIVTRKLTPPEAM PDLSSTDASAASAAASDVSVES TAEATVCTVTLKMSAGLGFSL GGKGSLHGDKPLTINRIEKGAAS EQSETVQPGDEILQLGGTAMQGL TRFEAWNIIKALPDGPVTIVIRR KSLQSKEFIVTD	Bam HI / Eco RI	75PRF	76PRR
41.8 kD	proteína de 41,8 kD hipotética	AF007156	AA4-85; dominio PDZ 1 (de 1) RDSGAMLGLKVVGGKMTESGRLC AFITKVKKGSЛАDTVGHLRPGDE VLEWNGRLLQGATFEEVYNILLE SKPEPQVELVVSRANSSS	Bam HI / Eco RI	145HF 5' - GTGGGATCCG AGATTAGGA GCAATGC -3' N4-30	146HR 5' - CTGGAATTTCGC CTTGAAGACTAC AAGTTTC -3' N267-240
K559	KIAA0559	AB011131	AA766-870; PDZ1 (de 1) HYIFPHARIKITRDSKDHTVSGN GLGIRIVGGKEIPGHSGEIGAYI AKILPGGSAEQTGKLMEGMQVLE WNGIPLTSKTYEEVQSIISQQSG EAEICVRLDLNMLNSSS	Bam HI / Eco RI	130KIF 5' - AAAGGATCCA CTACATCTT CCTCACG -3' N2290-2312	131KIR 5' - TCACAATTGGA TAGCATATTGA GGTCCAG -3' N2623-2595

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
RGS12	regulador humano de la proteína de señalización G12	AF035152	AA35-103; dominio PDZ 1 (de 1) PPPRVRSVEVARGRAGYGFILSG QAPCVLSCVMRGSPADFVGLRAG DQILAVNEINVKKASHEDVVKLI GNSS	Bam HI / Eco RI	64RGF 5' – TGGGATCCG CCCCAAGGG TGGGGAG-3' N93-119	65RGR 5' – AGGAATTCCCA ATTAATTTCAC TAC-3' N316-291
K316	KIAA0316	AB002314	AA197-284; dominio PDZ 1 (de 1) PPAPRKVEMRRDPVILGFGFVAGS EKPVVVRSVTPGGPSEGKLIPIGD QIVMINDEPVSAAPRERVIDLVR SCKESILLTVIQPYPPSPKIRNSS	Bam HI / Eco RI	158KIF 5' – AAAGGATCCC TCCGGCTCCT CGAAAG-3' N586-611	159KIR 5' – TTAGAATTCTG ATTGGGAGAA GGGTAAG-3' N866-839

DVL1	homólogo humano de la proteína de polaridad del segmento desordenado	AF006011	AA248-340; dominio PDZ 1 (de 1)	RI	Bam HI / Eco	Primera PCR: 55DVISF	Primera PCR: 56DVISR
			QSTVLNIVTVTLNMERHHFLGIS IVGQSNDRGDGGIYIGSIMKGGAA VAAADGRIEPGDMILLQVNDVNEEN MSNNDDAVRVLREIVSQTGPISLT VAKCWEFIVTD		5' - TCATCCAGAC TCATCCGAA G- 3'	5' - GCTCATGTCAC TCTTCACCG- 3'	

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
TAX40	proteína humana de interacción tax 40	AF028827	AA35-137; dominio PDZ 1 (de 1) LLPETHRVRVRLHKHGSDRPLGFY TRDGMHSVVRVAPQGLERVPGIFIS RIVRGGLAESTGLLAWSDEILEV NGIEVAGKTLQDQVTDMMVANSHN LIVTVK PANQANSS	Bam HI / Eco RI	136TF 5' - ACGGGATCCT ACTGCCGAG ACCCACC -3' N97-123	137TR 5' - ACGGAATTCCG CTGGTTGGCGG GCTTGAC -3' N421-393
TIAM1	proteína 1 inductora de invasión y metástasis del linfoma T	NM_ 003253	AA1001-1088; PDZ 1 (de 1) HSIHEKSDTAADTYGFSLSSVE EDGIRRLYVNSVKETGLASKRKL KAGDEILEINNRAADALNSSMLK DFLSQPSLGLLVRVTYPELEEFIV TD	Bam HI / Eco RI	39TF 5' - TCGGATCCAC AGCATCCACA TTGAG -3' N2995-3019	40TR 5' - TCGGAATTCCCT CCAGCTCGGGG T -3' N3275-3253
MINT1	proteína humana X11	L04953	AA717-894; dominios PDZ 1-2 (de 2) SENCKDVFIEKQKGELGVVIVE SGWGSILPTVIIANMMHGGPAEK SGKLNIGDQIMSINGTSLVGLPL STCQSIIKGLENQSRVKLNIVRC PPVTTVLLIRRPDLRYQLGFSWQN GIIICSLMRRGGIAERGGVVRVGHRI IEINGQSVVATPHEKIVHILSNA VGEIHMRTMPAAMYRLNNS	Eco RI / Eco RI	34MIF	20MR

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
K3.03	KIAA0303	Ab002301	AA652-742; dominio PDZ 1 (de 1)	Bam HI / Eco RI	152KIF	153KIR
			PHQPIVIIHSSGKNYGFTIRAIRV YVGDSDIYTWHIIWVNVEEGSPA CQAGLIKAGDLIITHINGEPVHGLV HTEVIELLLKSGNKVSIITTPFE FIVTD		5' – CTGGGATCCC ACATCAGCCC ATTGTGA-3' N1948-1976	5' – TGTGAATTCAA ATGGGGTAGTA GTGATTG-3' N2237-2209
CBP	Proteína HE de fijación de citohesina	AF68836	AA85-176; dominio PDZ 1 (de 1) QRKLVIVKEQDNETFGFEIQSYR PQNQNACSEMFILICKIQEDSP AHCAGLQAGDVLANINGVSTEGF TYKQVVVDLIRSSGNLITIETLING NSS	Bam HI / Eco RI	235CYF 5' – CCTGGATCCA AGAAAGCTT GTTACTGTG-3' N246-274	236CYR 5' – TCAGAATTCCA TTAAGAGTCTC TATC-3' N535-510
MINT3	MINT3 humana	AF029110	AA11-52; dominio PDZ 1 (de 1)	Bam HI / Eco RI	188MF 5' – ACTGGATCCC CGTCACCAAC GCCATCATC-3' N23-51	189MR 5' – CTCGAATTCCG TGCTCAGGGCC GCCCTA-3' N165-138

(continuación)

SÍMBOLO DEL GEN	PROTEÍNA	ACC.#	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS*	SITIOS DE CLONACIÓN	CEBADOR DIRECTO	CEBADOR INVERSO
TAX2	Proteína de interacción tax humana 2	AF028824	AA54-140; dominio PDZ 1 (de 1) RKEVEVEKSEDALGILTIDNGAG YAFIKRIKEGSVIDHHLISVGD MIEAINGQSLLGCRHYEVARILK ELPRGRRTFTKLTEPRKEFIVTD	Bam HI / Eco RI	197 TF	198 TR 5' - TGTGGAATTCC TTGCCAGGGCTC CGTGAGC-3' N429-401
K561	KIAA0561	AB011133	AA948-1038; dominio PDZ 1 (de 1) PPSLSTALARSTASACGRSASIW VIATSTLCLTTSSGVWRTEAPP RACGLGTSSPTSTGSQCWGMCTW TSWSCCZRAATRYPCGPQFWRIH RD	Bam HI / Eco RI	N154-182	161KIF 5' - CCTGGATCCC CCCATCGTTA TCCACAGC- 3', N2836-2863

*Nota concerniente a la TABLA 3

En varios casos, el análisis de la secuencia de los clones PDZ revelaba diferencias respecto a la secuencia de DNA y/o proteínas respecto a la publicada en las bases de datos, resumidas en la TABLA 3A.

TABLA 3A

GEN	ENTRADA EN GENBANK ***	CONSTRUCTO REAL
AF6	N 3060: C	N 3060: T *
DLG1	N 1021: A, = AA 340: Gln	N 1021: G, = AA 340: Arg
Dominio Lim	N 202: G N 203: C, = AA 68: Arg	N202:C* N 203: G, = AA 68: Gly
LIMK1	N 855: C, = AA 285: Leu	N 855: A, = AA 285: Ile
MINT1	N 2386: G, = AA 796: Glu**	N 2386: A, = AA 796: Lys**
NE-DLG	N 713: T N 766: G, = AA 255: Gly N 803: G, = AA 267: Glu N 861: G, = AA 287: Val	N 713: C* N 766: A, = AA 255: Glu N 803: C, = AA 267: Asp N 861: A, = AA 287: Met
TIAM1	N 3224: A	N 3224: G*

(*) = Mutación silenciosa, no afecta a la secuencia de AA;
 (**) = MINT1 es el mismo que X11a. La entrada de la base de datos para X11a muestra la misma secuencia que el constructo actual de los autores de la invención con relación a N2386 de la entrada MINT1 en GenBank.
 (***) = Las anotaciones de nucleótidos ("N") y aminoácidos ("AA") corresponden a la numeración tal como se encuentra en los archivos de GenBank.

5 6.2 Ensayos Para Detección de Interacciones Entre los Polipéptidos del Dominio PDZ y Proteínas Ligando PDZ Candidato (Proteínas PL)

Se desarrollaron dos ensayos complementarios, denominados "A" y "G", para detectar la fijación entre un polipéptido de dominio PDZ y el ligando PDZ candidato. En cada uno de los dos ensayos diferentes, se detecta fijación entre un péptido que tiene una secuencia correspondiente al término C de una proteína que se prevé se fijará a uno o más dominios PDZ (es decir un péptido PL candidato) y un polipéptido de dominio PDZ (típicamente una proteína de fusión que contiene un dominio PDZ). En el ensayo "A", el péptido PL candidato se inmoviliza y se detecta la fijación de un polipéptido de dominio PDZ soluble al péptido inmovilizado (el ensayo "A" se denomina así por el hecho de que en una realización se utiliza una superficie de avidina para inmovilizar el péptido). En el ensayo "G", se inmoviliza el polipéptido del dominio PDZ y se detecta la fijación de un péptido PL soluble (el ensayo "G" se denomina así por el hecho de que en una realización se utiliza una superficie de fijación de GST para inmovilizar el polipéptido del dominio PDZ). Realizaciones preferidas de estos ensayos se describen en detalle más adelante. Sin embargo, se apreciará por los técnicos con experiencia ordinaria que estos ensayos pueden modificarse de numerosas maneras al mismo tiempo que siguen siendo útiles para los propósitos de la presente invención.

6.2.1 Producción de Proteínas de Fusión que Contienen Dominios PDZ

20 Se prepararon proteínas de fusión GST-dominio PDZ para uso en los ensayos de la invención. Los productos PCR que contenían dominios codificantes de PDZ (como se describe en § 6.1, arriba) se subclonaron en un vector de expresión que permitía la expresión de proteínas de fusión que contenían un dominio PDZ y un dominio heterólogico (es decir, una secuencia de glutatión-S-transferasa, "GST"). Los productos PCR (es decir, fragmentos de DNA) que representaban DNA codificante del dominio PDZ se extrajeron de geles de agarosa utilizando el sistema de extracción de gel "Sephaglas" (Pharmacia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Como se ha indicado arriba, se diseñaron cebadores PCR para incluir sitios de endonucleasas de restricción a fin de facilitar la ligación de los fragmentos PCR a un vector de fusión de gen GST (PGEX-3X; Pharmacia, número de acceso a GenBank Núm. XXU13852) en marco con la secuencia codificante de glutatión-S-transferasa. Este vector contiene un promotor lacZ inducible por IPTG. El vector pGEX-3X se linealizó utilizando BamHI y EcoRI o, en algunos casos, EcoRI o Sma1, como se muestra en la TABLA 3, y se desfosforiló. Para la mayoría de las operaciones de clonación, se realizó una doble digestión con BamHI y EcoRI, de tal modo que los extremos de los fragmentos PCR a clonar eran BamHI y EcoRI. En algunos casos, las combinaciones de endonucleasas de restricción utilizadas eran Bgl II y EcoRI, BamHI y MfeI o RcoRI sólo, SmaI sólo, o BamHI sólo (véase TABLA 3). Cuando se clonó más de un dominio PDZ, la porción de DNA clonada representa los dominios PDZ y la porción de

cDNA localizada entre dominios individuales. Las localizaciones precisas de los fragmentos clonados utilizados en los ensayos se indican en la TABLA 3. Las secuencias enlazadoras de DNA entre la porción GST y la porción de DNA que contiene el dominio PDZ varían ligeramente, dependiendo de cuáles de los sitios de clonación y métodos arriba descritos se utilizaron. Como consecuencia, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión GST-PDZ

5 varía en la región enlazadora entre GST y el dominio PDZ. Las secuencias de enlazadores proteínicos correspondientes a sitios/enfoques de clonación diferentes se muestran a continuación. Las secuencias enlazadoras (DNA vector codificado) se muestran en negrita, y las secuencias derivadas del gen que contiene el dominio PDZ se muestran en cursiva.

1) **GST-BamHI/ BamHI-Inserción de dominio PDZ**

10 **Gly--Ile-Inserción de dominio PDZ**

2) **GST-BamHI/BgIII-Inserción de dominio PDZ**

Gly-Ile-Inserción de dominio PDZ

3) **GST-EcoRI/ EcoI-Inserción de dominio PDZ**

Gly-Ile-Pro-Gly--Asn-Inserción de dominio PDZ

15 4) **GST--SmaI/SmaI-Inserción de dominio PDZ**

Gly-Ile-Pro-Inserción de dominio PDZ

El fragmento PCR codificante de PDZ y el vector linealizado pGEX-3X se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 10 µl de tampón de ligación estándar. La ligación se realizó durante 4-10 horas a 37°C utilizando 20 DNA-ligasa T4. Se comprenderá que algunos de los constructos resultantes incluyen secuencias enlazadoras muy cortas y que, cuando se clonaban dominios PDZ múltiples, los constructos incluían algo de DNA localizado entre los dominios PDZ individuales.

25 Los productos de ligación se transformaron en cepas bacterianas de E. coli DH5α o BL-21. Las colonias se cribaron respecto a la presencia e identidad del DNA que contenía el dominio PDZ clonado, así como respecto a la fusión correcta con la porción del DNA codificante de glutatión-S-transferasa por PCR y por análisis de secuencia. Los clones positivos se ensayoaron en un ensayo de pequeña escala respecto a la expresión de la proteína de fusión del dominio GST-PDZ y, en caso de expresarse, estos clones se dejaron crecer subsiguientemente para preparaciones en gran escala de la proteína de fusión GST-PDZ.

30 La proteína de fusión GST-dominio PDZ se sobreexpresaba después de la adición de IPTG al medio de cultivo y se purificó. El procedimiento detallado de la expresión y purificación de la proteína de fusión en pequeña escala y en gran escala se describen en "GST Gene Fusion System" (2^a edición, revisión 2; publicado por Pharmacia). Resumidamente, un pequeño cultivo (3-5 ml) que contenía una cepa bacteriana (DH5α, BL21 o JM9) con el constructo de la proteína de fusión se dejó crecer durante una noche en medio LB a 37°C con la selección de 35 antibióticos apropiada (100 µg/ml ampicilina; conocido también como LB-amp). El cultivo nocturno se vertió en una aplicación reciente de LB-amp (típicamente 250-500 ml) y se dejó crecer hasta que la densidad óptica (DO) del cultivo estaba comprendida entre 0,5 y 0,9 (aproximadamente 2,5 horas). Se añadió IPTG (isopropil-(β-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1,0 mM para inducir la producción de proteína de fusión GST, y el cultivo se dejó crecer durante 1,5-2,5 horas más. Se recogieron las bacterias por centrifugación (4500 g) y se resuspendieron en Tampón A-(Tris 50 mM, pH 8,0, dextrosa 50 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 200 µM). Se añadió un volumen igual de Tampón A+ (Tampón A-, 4 mg/ml de lisozima) y se incubó en hielo durante 3 40 minutos para lisar las bacterias. Se añadió un volumen igual de Tampón B (Tris 10 mM, pH 8,0, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween-20, 0,5% NP40 (conocido también como IGEPAL CA-630), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 200 µM) y se incubó durante 20 minutos más. El lisado de células bacterianas se centrifugó (x 20000 g), y se añadió sobrenadante a glutatión-sefarosa 4B (Pharmacia, Cat. Núm. 17-0765-01) previamente hinchada (rehidratada) en 45 solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS). El lodo sobrenadante-sefarosa se vertió en una columna y se lavó con al menos 20 volúmenes de lecho de 1 X PBS. La proteína de fusión GST se eluyó del glutatión-sefarosa por aplicación de partes alícuotas de 0,5-1,0 ml de glutatión 5 mM y se recogió como fracciones separadas. Las concentraciones de las fracciones se determinaron utilizando BioRadProtein Assay (Cat. Núm. 500-0006) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Aquellas fracciones que contenían la concentración máxima de la proteína de fusión se agruparon y se dializaron contra 1X PBS/35% glicerol. Las proteínas de fusión se ensayaron 50 en cuanto a tamaño y calidad por electroforesis en gel de SDS (PAGE) como se describe en "Sambrook." Se guardaron partes alícuotas de la proteína de fusión a -80°C y a -20°C.

6.2.2 Identificación de las Proteínas PL Candidato y Síntesis de Péptidos.

55 En algunas células no hematopoyéticas (v.g., neuronas, células epiteliales), se sabe que ciertos dominios PDZ están unidos por los residuos C-terminales de proteínas de fijación de PDZ. Para identificar proteínas PL que funcionan en las células hematopoyéticas y endoteliales, se identificaron proteínas receptoras de la superficie celular y se sintetizaron péptidos que tenían la secuencia correspondiente al término C de cada proteína. La TABLA 4 enumera

estas proteínas, y proporciona secuencias C-terminales correspondientes y números de acceso a GenBank. "Clasp1" se describe en WO 00/20434 (publicado el 13 de abril de 2000). "CLASP2" y "CLASP4" se describen en solicitudes también en tramitación USSN 09/547276 (expediente de agente Núm. 20054-000200) y 60/196527 (expediente de agente Núm. 20054-000400), presentados ambos el 11 de abril 2000.

- 5 Péptidos sintéticos de secuencia definida (v.g., correspondiente a los términos carboxilo de las proteínas indicadas) pueden sintetizarse por cualquier método estándar basado en resina (véase, v.g., la Patente U.S. Núm. 4.108.846; véase también Caruthers et al., 1980, Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 215-223; Horn et al., 1980, Nucleic Acids Res. Symp. Ser., 225-232; Roberge, et al., 1995, Science 269:202). Los péptidos utilizados en los ensayos descritos en esta memoria se prepararon por el Fmoc (véase, v.g., Guy y Fields, 1997, Met. Enz. 289: 67-83; Wellings y Atherton, 1997, Met. Enz. 289: 44-67. En algunos casos (v.g., para uso en los ensayos A y G de la invención), los péptidos se marcaron con biotina en el término amino por reacción con un exceso de 4 veces de éster metílico de biotina en dimetilsulfóxido con una cantidad catalítica de base. Los péptidos se escindieron de la resina utilizando un ácido que contenía haluro (v.g. ácido trifluoroacético) en presencia de antioxidantes apropiados (v.g. etanoditilo) y exceso de disolvente liofilizado.
- 10 15 Despues de la liofilización, los péptidos pueden redissolverse y purificarse por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC). Un sistema disolvente de HPLC apropiado implica una columna semi-preparativa Vydac C-18 que opera a 5 ml por minuto con cantidades crecientes de acetonitrilo más ácido trifluoroacético al 0,1% en un disolvente base de agua más ácido trifluoroacético al 0,1%. Despues de la purificación por HPLC, las identidades de los péptidos se confirman por espectrometría de masas MALDI en modo catión. Como se ha indicado, péptidos biotinilados ilustrativos se proporcionan en la TABLA 4.
- 20 25 30 35

6.2.3 Detección de las Interacciones PDZ-PL

Basándose en la determinación de que las células del sistema inmunitario contienen a la vez muchas proteínas PDZ y análogamente muchas proteínas PL candidato, parecía claro para los inventores que la caracterización de las interacciones específicas PDZ-PL entre estas proteínas requeriría ensayos fiables y rápidos para tales interacciones.

- 25 Una diversidad de formatos de ensayo conocidos en la técnica pueden utilizarse para seleccionar ligandos que son específicamente reactivos como una proteína particular. Por ejemplo, pueden utilizarse inmunoensayos ELISA en fase sólida, inmunoprecipitación, Biacore, y ensayos de transferencia Western para identificar péptidos que se fijan específicamente a polipéptidos del dominio PDZ. Como se ha expuesto anteriormente, se desarrollaron dos ensayos complementarios diferentes para detectar las interacciones PDZ-PL. En cada uno, se inmoviliza una pareja de fijación de un par PDZ-PL, y se determina la capacidad del segundo miembro de la pareja de fijación para fijarse. Estos ensayos, que se describen más adelante, pueden utilizarse fácilmente para cribar centenares hasta millares de interacciones potenciales PDZ-ligando en unas cuantas horas. Así pues, estos ensayos pueden utilizarse para identificar interacciones PDZ-PL más nuevas todavía en células hematopoyéticas. Adicionalmente, los mismos pueden utilizarse para identificar antagonistas de las interacciones PDZ-PL (véase más adelante).

35 6.2.3.1 Detección en "Un ensayo" de la Fijación PDZ-Ligando Utilizando Péptido PL Inmovilizado

En un aspecto, la invención proporciona un ensayo en el cual los péptidos PL candidato biotinilados se inmovilizan sobre una superficie recubierta de avidina. Se mide luego la fijación de la proteína de fusión del dominio PDZ a esta superficie. En una realización preferida, la proteína de fusión del dominio PDZ se mide luego la fijación de una proteína de dominio de fusión PDZ a esta superficie. En una realización preferida, la proteína de fusión del dominio PDZ es una proteína de fusión GST/PDZ y el ensayo se lleva a cabo como sigue:

- 40 45 50 55
- (1) Se fija avidina a una superficie, v.g. una superficie de fijación de proteína. En una realización, se fija avidina a una placa de 96 pocillos de poliestireno (v.g., Nunc Polisorb (Cat. #475094) por adición de 100 µl por pocillo de 20 µg/ml de avidina (Pierce) en solución salina tamponada con fosfato sin calcio y magnesio, pH 7,4 ("PBS", GibcoBRL) a 4°C durante 12 horas. La placa se trata luego para bloquear las interacciones inespecíficas por adición de 200 µl por pocillo de PBS que contiene 2 g por 100 ml de seroalbúmina bovina exenta de proteasa ("PBS/BSA") durante 2 horas a 4°C. La placa se lava luego 3 veces con PBS por adición repetida de 200 µl por pocillo de PBS a cada pocillo de la placa seguido por vuelco del contenido de la placa en un recipiente de desechos y golpeo suave de la placa sobre una superficie seca.
- (2) Se inmovilizan péptidos PL biotinilados (o péptidos PL candidato, v.g. véase TABLA 4) en la superficie de los pocillos de la placa por adición de 50 µl por pocillo de péptido 0,4 µM en PBS/BSA durante 30 minutos a 4°C. Usualmente, cada péptido diferente se añade a al menos 8 pocillos diferentes a fin de que puedan hacerse medidas múltiples (v.g. duplicados así como medidas que utilizan diferentes (dominios de fusión 3ST/PDZ y un control negativo de GST solo), y se preparan también pocillos de control negativos adicionales en los cuales no se ha inmovilizado ningún péptido. Despues de la inmovilización del péptido PL en la superficie, la placa se lava 3 veces con PBS.
- (3) La proteína de fusión GST/dominio PDZ (preparada como se ha descrito arriba) se deja reaccionar con la superficie por adición de 50 µl por pocillo de una solución que contiene 5 µg/ml de proteína de fusión GST/dominio PDZ en PBS/BSA durante 2 horas a 4°C. Como control negativo, se añade GST solo (es decir no

una proteína de fusión) a pocillos específicos, generalmente al menos dos pocillos (es decir medidas duplicadas) para cada péptido inmovilizado. Despues de la reacción de 2 horas, las placas se lavan 3 veces con PBS para eliminar la proteína de fusión no fijada.

- 5 (4) La fijación de la proteína de fusión GST/dominio PDZ a la superficie avidina-péptido biotinilado puede detectarse utilizando una diversidad de métodos, y detectores conocidos en la técnica. En una realización, se añaden 50 μ l por pocillo de un anticuerpo anti-GST en PBS/BSA (v.g. 2,5 μ g/ml de anticuerpo polyclonal de cabra anti-GST, Pierce) y se dejan reaccionar durante 20 minutos a 4°C. La placa se lava 3 veces con PBS y se añade un segundo anticuerpo marcado detectablemente. En una realización, se añaden a la placa 50 μ l por pocillo de 2,5 μ g/ml de anticuerpo polyclonal de conejo anti-inmunoglobulina de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) y se dejan reaccionar durante 20 minutos a 4°C. La placa se lava 5 veces con Tris 50 mM de pH 8,0 que contiene 0,2% de Tween 20, y se revela por adición de 100 μ l por pocillo de solución sustrato de HRP (TMB, Dako) durante 20 minutos a la temperatura ambiente (RT). La reacción de la HRP y su sustrato se termina por la adición de 100 μ l por pocillo de ácido sulfúrico 1 M y se lee la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo de la placa a 450 nm.
- 10 (5) Fijación específica de un péptido PL y un dominio PDZ. Se detecta el polipéptido por comparación de la señal del pocillo o pocillos en los cuales el péptido PL y el polipéptido del dominio PDZ están combinados con la(s) señal(es) de ruido de fondo. La señal de ruido de fondo es la señal encontrada en los controles negativos. Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal de ruido de fondo, más generalmente más de 5 veces el ruido de fondo, y de modo muy general 10 o más veces la señal de ruido de fondo. Adicionalmente, una reacción estadísticamente significativa implicará medidas múltiples de la reacción en las cuales la señal y el ruido de fondo diferirán al menos en dos errores estándar, más típicamente 4 errores estándar, y muy típicamente 6 o más errores estándar. Correspondientemente, un ensayo estadístico (v.g. un ensayo T) de comparación de medidas repetidas de la señal con medidas repetidas de ruido de fondo dará como resultado un valor $p < 0,05$, más típicamente un valor $p < 0,01$, y muy típicamente un valor $p < 0,001$ o inferior.
- 15
- 20
- 25

Como se ha indicado arriba, en una realización del ensayo "A", la señal de fijación de una proteína de fusión de GST/ dominio PDZ a una superficie de avidina no expuesta al (es decir no cubierta con) el péptido PL es un control negativo adecuado (al que se hace referencia a veces como "B"). La señal procedente de la fijación del polipéptido GST solo (es decir no una proteína de fusión) a una superficie recubierta con avidina que ha estado expuesta (es decir cubierta con) el péptido PL es un segundo control negativo adecuado (al que se hace referencia a veces como "B2"). Debido a que todas las medidas se realizan en múltiplos (es decir al menos por **duplicado**) la media aritmética (o, equivalentemente, el valor medio) de varias medidas se utiliza para determinar la fijación, utilizándose el error estándar de la media en la determinación del error probable en la medida de la fijación. El error estándar de la media de N medidas es igual a la raíz cuadrada de lo siguiente: la suma de los cuadrados de la diferencia entre cada medida y la media, dividida por el producto de (N) y ($N-1$). Así, en una realización, la fijación específica de la proteína PDZ al péptido PL fijado a la placa se determina por comparación de la señal media ("S media") y el error estándar de la señal ("SE") para una combinación PL-PDZ particular con la media B1 y/o la media B2. En la **TABLA 2**, se detectó que la fijación era específica (denotado por una "A" en la matriz) cuando (1) la media S era al menos dos veces la media B1 y al menos dos veces la media B2, y (2) la media S era al menos 6 errores estándar (seis SE) mayor que la media B1 y que la media B2. Adicionalmente, en los experimentos resumidos en la **TABLA 2**, se utilizó un criterio adicional para asegurar que ninguna de las interacciones definidas como específicas surgían de una tendencia combinada tanto de la proteína de fusión PDZ particular como del péptido PL ensayoados para dar cada uno un ruido de fondo mayor que el usual. Este criterio era que (3) la media S era al menos 20 veces el producto de la media B1 y la media B2. El factor 20 veces refleja que al menos uno de B1 y B2 es por regla general menor que 0,1 unidades D.O., y por consiguiente 20 veces el producto de la media B1 y la media B2 es por regla general menor que dos veces la media B1 y dos veces la media B2, lo que hace que el criterio (3) sea menos severo que el criterio (1). Sólo en un pequeño número de casos en los que la media B1 y la media B2 son ambas mayores que 0,1 unidades D.O. (es decir tanto la proteína de fusión PDZ particular como el péptido PL ensayoados tienden a dar un ruido de fondo mayor que el usual) el criterio (3) es más severo que el criterio (1).

CÓDIGO	NOMBRE DE PROTEÍNA	ACCESO A GENBANK	SECUENCIA
AA1L	Clasp-1		ISKATPALPTVSISSSAEV
AA2L	Clasp-2		ISGTPSTMVHGMTSSSVV
AA3L	Clasp-4		CAISGTSSDRGYGSPRYAEV
AA4L	CD3n	M33158	SVFSIPTLWSPWPPSSSQL
AASL-M*	CD4	M12807	SEKKTSQSPHRFQKTCSP1
AA6L	CD6	X60992	SPQPDSTDNDDYDDISAA
AA7L	CD34	M81104	QATSRNGHSARQHVVADTEL
AA9L	CD44	M69215	QFmtADETRNLQNVDMKIGV
AA10L	CD46 (Forma 1)	M58050	KKGTYLTDETHREVKFTSL
AA11L	CD49E (4)	X06256	PYGTAMEKAQLKPPATSDA
AA12L	CD49F	X53586	HKAEIHAQPSDKERLTSDA
AA13L	CD95	M67454	KDITSDSESNFRNEIQSLV
AA14L	CD97	X84700	TSGTGNQTRALRASESGI
AA15L	CD98	J02939	ERLKLEPHEGLLRFPYAA
AA16L	CD105	X72012	STNHSIGSTQSTPCSTSSMA
AA17L	VCAM1	M73255	ARKANMKGSYSLVEAQKSKV
AA18L	CD138	J05392	PKQANGGAYQKPTKQEEFYA
AA19L	CD148	D37781	ENLAPVTTFGKTNGYIA
AA20L	CD166	L38608	DLGNMEENKKLEENNHKTEA
AA22L	DNAM-1	U56102	TREDIYVNYPTFSRRPKTRV
AA23L-M*	FasL	U11821	SSKSKSSEESQTFFGLYKL
AA25L	FceRIb	D10583	YSATYSELEDPGEMSPPIDL
AA28L	CDW125 (IL5R)	X62156	EVICYIEKPGVETLEDSVF
AA29.1L	CDW128A (ILBRA)	M68932	ARHRVTSYTSSNVNSSNL
AA29.2L	CDW128B (IL8RB)	M73969	KDSRPSFVGSSSGHTSTTL
AA30L	LPAP	X81422	AWDDSSARAAGGQGLHVTAL
AA33L	KV1.3	AAC31761	TTNNNPNSAVNIKKIFTDV
AA34.2L	NMDA	NP000824	LNSCSNRRVYKKMPSIESDV
AA37L	Glicoforina C	AAA52574	QGDPAQLDAGDSSRKEYFI
AA38L	Neurexina	AB011150	SSAKSSNKNKKNDKEYYV
AA39L	Syndecan-2	A33880	GERKPSSAAYQKAPTKEFY
AA40L	DOCK2	BAA13200	LASKSAEEGKQIPDSLSTDL
AA41L	CC CKR-1R	L09230	LERVSSTSPSTGEHELSAGF
AA42L	CC CKR-2	U03882	GKGKSIGRAPEASLQDKEGA

AA43L	CC CKR-3	HSU28694	LERTSSVSPSTAEPELSIV
AA44L	CC CKR-4	X85740	DTPSSSYTQSTMHDHLHDAL
AA45L	BLR-1	S56162	PSWRRSSLSESENATSLTTF
AA47L	CD83	Z11697	VTSPNKHLGLVTPHKTELV
AA48L	CD62E	M30640	SSSQSLESDGSYQKPSYIL
AA49L	CD5	X04391	SMQPDNSSDSDYDLHGAQRL
AA55L	CD148	D37781	TIYENLAPVTTFGKTIA

6.2.3.2 "Ensayo G" - Detección de la Fijación del Ligando PDZ Utilizando Polipéptido de Fusión del Dominio PDZ Inmovilizado

En un aspecto, la invención proporciona un ensayo en el cual una proteína de fusión GST/PDZ está inmovilizada en la superficie (ensayo "G"). Se mide luego la fijación del péptido PL marcado (como se enumera en la **TABLA 4**) a esta superficie. En una realización preferida, el ensayo se lleva a cabo como sigue:

- 10 (1) Se fija un polipéptido del dominio PDZ a una superficie, v.g. una superficie de fijación de proteína. En una realización preferida, se fija una proteína de fusión GST/PDZ que contiene uno o más dominios PDZ a una placa de poliestireno con 96 pocillos. La proteína de fusión GST/PDZ puede fijarse a la placa por cualquiera de una diversidad de métodos estándar conocidos para un experto en la técnica, aunque debe tenerse cierto cuidado a fin de que el proceso de fijación de la proteína de fusión a la placa no altere las propiedades de fijación de ligando del dominio PDZ. En una realización, la proteína de fusión GST/PDZ se fija por un anticuerpo anti-GST que está recubierto sobre la placa de 96 pocillos. La fijación adecuada a la placa puede conseguirse cuando:

15 a. Se añaden 100 μ l por pocillo de 5 μ g/ml de anticuerpo políclonal anti-GST de cabra Pierce) en PBS a una placa de poliestireno de 96 pocillos (v.g., Nunc. Polisorb) a 4°C durante 12 horas.

b. La placa se bloquea por adición de 200 μ l por pocillo de PBS/BSA durante 2 horas a 4°C.

c. La placa se lava 3 veces con PBS.

20 d. Se añaden a la placa 50 μ l por pocillo de una proteína de fusión GST/PDZ de 5 μ g/ml o, como control negativo, polipéptido GST solo (es decir no una proteína de fusión) en PBS/BSA durante 2 horas a 4°C.

e. Se lava de nuevo la placa 3 veces con PBS.

25 (2) Péptidos PL biotinilados (o péptidos PL candidato, v.g. como se muestra en la **TABLA 4**) se dejan reaccionar con la superficie por adición de 50 μ l por pocillo de solución 20 μ M del péptido biotinilado en PBS/BSA durante 10 minutos a 4°C, seguido por una incubación adicional durante 20 minutos a 25°C. La placa se lava 3 veces con PBS enfriado en hielo.

30 (3) La fijación del péptido biotinilado a la superficie de la proteína de fusión GST/PDZ puede detectarse utilizando una diversidad de métodos y detectores conocidos por un experto en la técnica. En una realización, se añaden 100 μ l por pocillo de conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) de 0,5 μ g/ml disuelto en BSA/PBS y se dejan reaccionar durante 20 minutos a 4°C. La placa se lava luego 5 veces con Tris 50 mM de pH 8,0 que contiene 0,2% de Tween 20, y se revela por adición de 100 μ l por pocillo de solución sustrato de HRP (TMB, Dako) durante 20 minutos a la temperatura ambiente (RT). La reacción de la HRP y su sustrato se termina por adición de 100 μ l por pocillo de ácido sulfúrico 1 M, y la densidad óptica (D.O.) de cada pocillo de la placa se lee a 450 μ M.

35 (4) La fijación específica de un péptido PL y un polipéptido de dominio PDZ se determina por comparación de la señal del o de los pocillos en el o los cuales están combinados el péptido PL y el polipéptido del dominio PDZ con la o las señales de ruido de fondo. La señal de ruido de fondo es la señal encontrada en el o los controles negativos. Típicamente, una reacción específica o selectiva será igual a al menos dos veces la señal de ruido de fondo, más típicamente más de 5 veces el ruido de fondo, y muy típicamente 10 o más veces la señal de ruido de fondo. Adicionalmente, una reacción estadísticamente significativa implicará

5 medidas múltiples de la reacción, difiriendo la señal y el ruido de fondo en al menos dos errores estándar, más típicamente cuatro o más errores estándar, y muy típicamente seis o más errores estándar. Correspondientemente, un ensayo estadístico (v.g. un ensayo T) de comparación de medidas repetidas de la señal con medidas repetidas del ruido de fondo dará como resultado un valor $p < 0,05$, más típicamente un valor $p < 0,01$, y muy típicamente un valor $p < 0,001$ o menos. Como se ha indicado, en una realización del ensayo "G", la señal de fijación de un péptido PL dado a un polipéptido GST inmovilizado (fijado a la superficie) solo es un control negativo adecuado (al que se hace referencia a veces como "B1"). Dado que todas las medidas se realizan en múltiples (es decir al menos por duplicado) la media aritmética (o, equivalentemente, el valor medio) de varias medidas se utiliza en la determinación de la fijación, y se utiliza el error estándar de la media en la determinación del error probable en la medida de la fijación. El error estándar de la media de N medidas es igual a la raíz cuadrada de lo siguiente: la suma de los cuadrados de la diferencia entre cada medida y el valor medio, dividida por el producto de (N) y $(N)-1$. Así pues, en una realización, la fijación específica de la proteína PDZ al péptido fijado a la placa se determina por comparación de la señal media ("S media") y el error estándar de la señal ("SE") para una combinación PL-PDZ particular con la media B1. En experimentos resumidos en la **TABLA 2**, se determinó que la fijación era específica (lo que se denota por una "G" en la matriz) cuando (1) la media S era al menos dos veces la media de B1 y (2) la media S era al menos seis errores estándar (seis SE) mayor que la media B1. Los resultados de ensayos "G" ilustrativos se muestran en las **FIGURAS 1A-1D**.

6.2.4 Variaciones del Ensayo

- 20 Como se ha expuesto anteriormente, se apreciará que muchos de los pasos en los ensayos arriba descritos pueden modificarse; por ejemplo, pueden utilizarse diversos sustratos para fijar las proteínas PL y que contienen PDZ; pueden utilizarse tipos diferentes de proteínas de fusión que contienen PDZ; pueden emplearse diferentes marcadores para detectar las interacciones PDZ/PL, y pueden utilizarse vías de detección diferentes.
- 25 Los ensayos de detección PDZ-PL pueden emplear una diversidad de superficies para fijar las proteínas que contienen PL y PDZ. Por ejemplo, una superficie puede ser una "placa de ensayo" que está formada por un material (v.g. poliestireno) que optimiza la adherencia de la proteína PL o la proteína que contiene PDZ a ella. Generalmente, los pocillos individuales de la placa de ensayo tendrán una ratio elevada de superficie a volumen y por tanto una forma adecuada es un pocillo de fondo plano (donde las proteínas de los ensayos son adherentes). Otras superficies incluyen, pero sin carácter limitante, perlas de poliestireno o vidrio, portaobjetos de poliestireno o vidrio, y análogas.
- 30 Por ejemplo, la placa de ensayo puede ser una placa de "microtitulación". El término placa de "microtitulación", cuando se utiliza en esta memoria, hace referencia a una placa de ensayos con pocillos múltiples, v.g. que tiene entre aproximadamente 30 y 200 pocillos individuales, usualmente 96 pocillos. Alternativamente, pueden utilizarse redes de alta densidad. A menudo, los pocillos individuales de la placa de microtitulación contendrán un volumen máximo de aproximadamente 250 μ l. Convenientemente, la placa de ensayo es una placa de poliestireno de 96 pocillos (tal como la vendida por Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, L.J.), que permite automatización y cribado de alta capacidad. Otras superficies incluyen placas ELISA de microtitulación de poliestireno tales como la vendida por Nunc Maxisorp, Inter Med., Dinamarca. A menudo, se añadirán a cada pocillo de la placa de ensayo aproximadamente 50 μ l a 300 μ l, más preferiblemente 100 μ l a 200 μ l, de una muestra acuosa que comprende tampones suspendidos en ella.
- 35 40 Los marcadores detectables pueden ser cualquier compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente con una molécula (tal como la arriba descrita). El marcador puede ser detectable en sí mismo (v.g., marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. El marcador preferido es un marcador enzimático que cataliza un cambio de color de un reactivo coloreado no radiactivo.
- 45 50 Algunas veces, el marcador está conjugado indirectamente con el anticuerpo. Una persona con experiencia es conocedora de diversas técnicas para conjugación indirecta. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las categorías de marcadores arriba mencionadas puede conjugarse con avidina, o viceversa (véase también el ensayo "A" y "G" arriba). La biotina se fija selectivamente a avidina y por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Véase, Ausubel, *supra*, para una revisión de técnicas que implican conjugación biotina-avidina y ensayos similares. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (v.g. digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcadores arriba mencionados se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (v.g., anticuerpo anti-digoxina). De este modo, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

55 Variaciones del ensayo pueden incluir diferentes pasos de lavado. Por "lavado" se entiende exponer la fase sólida a una solución acuosa (usualmente un tampón o medio de cultivo de células) de tal manera que el material no fijado (v.g. células no adherentes, agente de captura no adherente, ligando no fijado, receptor, constructo de receptor, lisado de células, o anticuerpo HRP) se separa de la misma. Para reducir el ruido de fondo, es conveniente incluir un detergente (v.g., Triton X) en la solución de lavado. Usualmente, la solución acuosa de lavado se decanta de los pocillos de la placa de ensayo después del lavado. Convenientemente, el lavado puede realizarse utilizando un

dispositivo de lavado automático. A veces pueden ser necesarios varios pasos de lavado (v.g., entre aproximadamente 1 y 10 pasos de lavado).

Pueden utilizarse también diversos tampones en los ensayos de detección PD-PL. Por ejemplo, pueden utilizarse diversos tampones bloqueadores para reducir el ruido de fondo del ensayo. El término "tampón bloqueador" se refiere a una solución acuosa, de pH tamponado que contiene al menos un compuesto bloqueador que es capaz de fijarse a las superficies expuestas del sustrato que no están recubiertas con una proteína PL o que contiene PDZ. El compuesto bloqueador es normalmente una proteína tal como seroalbúmina bovina (BSA), gelatina, caseína o leche en polvo y no reacciona de manera cruzada con ninguno de los reactivos del ensayo. El tampón bloqueador se proporciona generalmente a un pH entre aproximadamente 7 y 7,5, y agentes tampón adecuados incluyen fosfato y TRIS.

Pueden utilizarse también diversas combinaciones enzima-sustrato en la detección de las interacciones PDZ-PL. Ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- (i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrogenoperoxidasa como sustrato, en donde la hidrogenoperoxidasa oxida un precursor de tinte (v.g. ortofenileno-diamina [OPD] o 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina [TMB] hidrocloruro) (como se ha descrito arriba);
- (ii) Fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromógeno.
- (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromógeno (v.g., p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferyl- β -D-galactosidasa.

Numerosas otras combinaciones enzima-sustrato están disponibles para los expertos en la técnica. Para una revisión general de éstas, véanse las Patentes U.S. Núms. 4.275.149 y 980.

Adicionalmente, se apreciará que, aunque por conveniencia la presente exposición se refiere principalmente a antagonistas de las interacciones PDZ-PL, pueden identificarse agonistas de las interacciones PDZ-PL utilizando los métodos descritos en esta memoria o variaciones fácilmente evidentes de los mismos.

6.2.5 Resultados de los Ensayos de Interacción PDZ-PL

La **TABLA 2**, *supra*, muestra los resultados de ensayos en los cuales se detectó fijación específica utilizando los ensayos "A" y "G" descritos en esta memoria. La fila superior de la tabla especifica la fuente del dominio PDZ utilizado en las proteínas de fusión GST-PDZ (véase **TABLA 3**). La primera columna enumera las proteínas de la superficie celular de las cuales se derivaron secuencias de péptidos C-terminales y la segunda columna ("código") identifica el péptido utilizado en el ensayo (véase **TABLA 4**). La tercera columna, "Seq" proporciona la secuencia de los cuatro (4) residuos C-terminales de la proteína y el péptido de la superficie celular. En la matriz, "A" indica fijación específica como se detecta en el ensayo "A". "G" indica fijación específica como se muestra en el ensayo "G". Un blanco indica que no se detectó fijación específica alguna utilizando los ensayos "A" o "G". Un asterisco (*) indica que una interacción apareada entre la proteína PDZ y la proteína de la superficie celular (o subdominios de cualquiera de ellas) ha sido descrita por otros.

6.2.5.1 Nuevos Motivos PL

Como se ha indicado arriba, la **TABLA 2** muestra los resultados de ensayos (a los que se hace referencia como "MATRIZ PRISM") para detectar la fijación entre proteínas PDZ y péptidos PL candidato. Ciertos números de interacciones PDZ-PL específicas se identifican por la MATRIZ y de estos resultados se deducen aminoácidos clave y posiciones importantes en la fijación de PDZ ("motivos PL"). La MATRIZ no sólo es útil para catalogar exhaustivamente combinaciones de fijación PDZ-PL, sino que el ensayo puede ayudar adicionalmente en el descubrimiento y la caracterización rápidos de nuevas proteínas PL y motivos PL para ayudar al diseño racional de fármacos y la síntesis de inhibidores de la interacción PL-PDZ.

Otros investigadores han consignado ciertos motivos PL importantes en la fijación de PDZ, v.g., los motivos C-terminales S/T-X-V/I/L (para DLG1) e Y/F-Y/F-Y/L/F para MPP1 (véase Doyle et al., 1996, Cell 85, 1067; Songyang et al., 1997, Science 275, 73). Sin embargo, los motivos consignados no son suficientemente específicos (es decir, un gran número de proteínas cumplen estos criterios pero no son necesariamente ligandos PDZ reales) y abarcan solo un pequeño número de proteínas PDZ (aproximadamente 10). La MATRIZ PRISM puede utilizarse para determinar la especificidad de ligando y deducir motivos de fijación de ligando para cualquier proteína PDZ, dado que puede determinar con precisión secuencias de aminoácidos que dan o no como resultado la fijación específica de PDZ. Adicionalmente, el ensayo ha revelado la importancia de nuevos motivos de fijación de dominio PDZ (es decir motivos PL): secuencia C-terminal de CD6, ISAA; secuencia C-terminal de CD49E, TSDA; secuencia C-terminal de CD49F, TSDA; secuencia C-terminal de Clap-1, SAEV; secuencia C-terminal de CLASP-4, YAEV; secuencia C-terminal de CD44, KIGV; secuencia C-terminal de IL5R, DSVF; secuencia C-terminal de BLR-1, LTTF. La identificación de estas nuevas secuencias PL hace posible la definición de nuevos motivos PL (véase **TABLA 5A**, más adelante).

La especificidad con la que se definen estos nuevos motivos está mejorada por el hecho de que la MATRIZ consigna a la vez resultados positivos (es decir combinaciones PDZ-PL que dan como resultado interacciones de fijación

específicas) y resultados negativos (es decir combinaciones PDZ-PLO que no dan como resultado fijación específica). Por ejemplo, la secuencia C-terminal de CD6, SAA y la secuencia C-terminal de CD49E, SDA se fijan al polipéptido de dominio PDZ 41.8, mientras que la secuencia C-terminal afín de CD166, TEA y la secuencia C-terminal de CD148, YIA no lo hacen. Esto identifica el nuevo motivo PL (Motivo 1, más adelante) de polipéptidos que terminan en alanina con serina en la posición -2 y excluye polipéptidos con treonina y tirosina en la posición -2. Este motivo es por tanto más específico que la mayoría de los motivos identificados con anterioridad. Otros nuevos motivos se describen en la **TABLA 5A**.

TABLA 5A

Posición:	-3	-2	-1	C-terminal
Motivo 1	X	S	X	A
Motivo 2	X	A	D/E	V
Motivo 3	X	V/I/L	X*	V
Motivo 4	X	S/T	X	F

X* es cualquier aminoácido no aromático (cualquier residuo distinto de T, F o W)

10 6.2.5.2 Agrupaciones de Fijación

La **TABLA 2** está dispuesta de tal manera que tanto las proteínas de fusión PDZ/GST como los ligandos del péptido PL están ordenados con moléculas estructuralmente similares próximas unas a otras. En la preparación de la **TABLA 2** y la realización de los experimentos utilizados para crear esta tabla, los dominios PDZ de cada una de las proteínas de fusión GST-PDZ se clasificaron en cuanto a semejanza de secuencia de aminoácidos utilizando el paquete de software de alineación de secuencias múltiples CLUSTAL. Las proteínas con mayor semejanza de secuencia están más próximas unas a otra en la matriz. Los ligandos del péptido PL se ordenaron también sobre la base de semejanza de aminoácidos, pero asignándose peso a los residuos que se consideran importantes en la fijación de PDZ (Doyle et al., 1996, Cell 85, 1067). En particular, los péptidos se ordenaron primeramente sobre la base del residuo más próximo al terminal C (posición cero) en el orden de aminoácidos siguiente: G, A, C, S, T, N, Q, D, E, H, K, R, V, I, L, M, P, F, Y, W. Entre los péptidos con términos C idénticos, se aplicó luego el mismo esquema de clasificación al residuo más importante siguiente para la fijación del péptido, la posición -2, seguida por la posición -1 y la posición -3. (En un enfoque alternativo, las funciones GST-PDZ pueden disponerse también de modo que den un peso adicional a residuos que se sabe son importantes para fijación de ligandos cuando se alinean las proteínas).

25 Las regiones de la matriz de la **TABLA 2** que están densamente llenas con interacciones de fijación importantes indican que una estructura de ligando particular tiende a fijarse a una familia particular de dominios PDZ. Los resultados indican que los dominios PDZ con estructuras similares fijan ligandos con estructuras similares, como se indica por la presencia en la matriz de algunas agrupaciones de muchas interacciones de fijación importantes y otras áreas de pocas interacciones de fijación importantes. Estos resultados revelan cierto número de relaciones estructurales entre diferentes proteínas PDZ y sus ligandos. La compresión de estas interrelaciones estructurales puede utilizarse para escanear bases de datos respecto a ligandos probables de proteínas PDZ específicas, facilitando el diseño de inhibidores de tales nuevas interacciones y la predicción del perfil de efectos secundarios de tales inhibidores.

30 El ejemplo más notable de una agrupación ocurre en las columnas 1-5 de la matriz (dominios PDZ de CASK, MPP1, DLG1, PSD95, y NeDLG). En los ensayos realizados por los autores de la invención, CASK se fijaba significativamente sólo a uno de los ligandos ensayados, neurexina (esta interacción había sido identificada previamente en células neuronales). MPP1, el pariente más próximo a CASK en el sistema de ordenación utilizado, fijaba un conjunto de 5 ligandos diferentes, con inclusión de neurexina. La totalidad de los ligandos MPP1 identificados son estructuralmente similares en que los mismos terminan en valina (V) y tienen un aminoácido cargado (E o K) en la posición -3 desde el término C ((motivo C-terminal:E/K-X-V-X-V).

35 De los cinco ligandos de MPP1 identificados, cuatro de ellos se fijan también a DLG1, la proteína siguiente más similar a CASK y MPP1. DLG es estrechamente afín a otras dos proteínas, PSD95 y NeDLG. Cada una de estas tres proteínas fija ligandos que terminan en el motivo S/T/Y-X-V/I/L, como se ha descrito previamente (Songyang et al., 1997, Science 275, 73). Es interesante, que si el residuo del ligando terminal es valina, otros residuos no identificados previamente en la posición -2 son compatibles con la fijación, dando como resultado las secuencias C-terminales AEV y ELV eventos de fijación importantes. Si bien esto refleja una flexibilidad no reconocida anteriormente en la fijación de ligandos PDZ, la especificidad de las interacciones detectadas en los ensayos

realizados por los autores de la invención se refleja en las grandes áreas en la parte superior y la inferior de las columnas 1-5 que no contienen evento de fijación significativo alguno. Estas áreas reflejan que ninguno de los ligandos potencias que termina en residuos distintos de V/I/L se fijaba significativamente a CASK, MPP1, DLG1, PSD95, o NeDLG.

- 5 (Con respecto a MPP1, es digno de mención que glicoforina C, un ligando conocido de MPP1, Marfatia et al., 1997, J. Biol. Chem. 272, 24691, no se fijaba significativamente a MPP1 en los ensayos realizados por los autores de la presente invención, pero termina en isoleucina, un aminoácido muy similar a valina, y tiene de hecho un residuo cargado en la posición -3 del término C.)

10 Otras agrupaciones más pequeñas en la matriz proporcionan también información valiosa acerca de la especificidad de ligando de ciertos dominios PDZ. Por ejemplo, cinco ligandos se fijan significativamente en ambos ensayos "G" y "A" a la proteína de 41,8 kD, una proteína que contiene dominio PDZ no estudiada previamente.

15 Todos estos ligandos terminan en A, V, I, o L, y cuatro de los cinco tienen serina (S) en la posición -2, definiendo el motivo de ligando C-terminal S-X-A/V/I/L para este dominio PDZ. Análogamente, dos de tres ligandos que se fijan específicamente a KIAA0561 se ajustan también al motivo C-terminal X*-S/T-D/E-V/I/L donde X* es cualquier aminoácido no aromático. Resulta interesante que uno de estos ligandos se fija también al pariente más próximo a KIAA0561's, TAX2. Análogamente, los dos ligandos que se fijan a PRIL16 tienen ambos un aminoácido cargado en la posición -3, un aminoácido hidrófobo en la posición -2 y valina en la posición terminal. Un ejemplo final interesante de definición de la especificidad del ligando de un dominio PDZ implica PTN-4. Aunque los dos ligandos que se fijan específicamente a PTN-4 no son estrechamente afines en sus 2 residuos C-terminales, ambos se ajustan al motivo C-terminal D/E-S-X-V/I/L/F/Y. Estos motivos que caracterizan la especificidad de ligando de proteínas PDZ particulares se resumen en la **TABLA 5B**. Tales motivos permiten investigaciones de bases de datos para nuevos ligandos (proteínas PL) que se fijan a estas proteínas PDZ particulares. El conocimiento de las proteínas PL que se fijan a estas proteínas PDZ permite el diseño de inhibidores de estas interacciones, utilizando los métodos descritos en esta memoria más adelante. Adicionalmente, el conocimiento del conjunto de las proteínas PL que se fijan a una proteína PDZ particular puede utilizarse para predecir la utilidad y los efectos secundarios de compuestos que están direccionalizados a esta proteína PDZ.

TABLA 5B

PDZ	-3	-2	-1	0
41,8 kD	X	X	X	A/V/I/L
KIAA 0561	X*	S/T	D/E	V/I/L
TAX 2	X	S	D/E	V
PRIL 16	D/E/K/R	V/I/L/F/Y	X	V
PTN4	D/E	S	X	V/I/L/F/Y

X* es cualquier aminoácido no aromático

6.3 Medida de la Afinidad de Fijación del Ligando PDZ

30 Los ensayos "A" y "G" de la invención pueden utilizarse para determinar la "afinidad aparente" de fijación de un péptido ligando PDZ a un polipéptido de dominio PDZ. La afinidad aparente se determina basándose en la concentración de una molécula requerida para saturar la fijación de una segunda molécula (v.g., la fijación de un ligando a un receptor). Dos enfoques particularmente útiles para cuantificación de la afinidad aparente para la fijación del ligando PDZ se proporcionan a continuación.

35 (1) Una proteína de fusión GST/PDZ, así como GST solo como control negativo, se fijan a una superficie (v.g. una placa de 96 pocillos) y la superficie se bloquea y se lava como se ha descrito arriba para el ensayo "G".

40 (2) 50 µl por pocillo de una solución de péptido PL biotinilado (v.g. como se muestra en la **TABLA 4**) se añaden a la superficie en concentraciones crecientes en PBS/BSA (v.g. a 0,1 µM, 0,33 µM, 1 µM, 3,3 µM, 10 µM, 33 µM, y 100 µM). En una realización, el péptido PL se deja reaccionar con la proteína de fusión GST/PDZ fijada (así como el control negativo de GST solo) durante 10 minutos a 4°C seguido por 20 minutos a 25°C. La placa se lava 3 veces con PBS enfriado en hielo para eliminar el péptido marcado no fijado.

(3) La fijación del péptido PL al polipéptido del dominio PDZ inmovilizado se detecta como se describe arriba para el ensayo "G".

5 (4) Para cada concentración de péptido, la señal de fijación neta se determina por sustracción de la fijación del péptido a GST solo de la fijación del péptido a la proteína de fusión GST/PDZ. La señal de fijación neta se representa luego gráficamente en función de la concentración de ligando y se ajusta el gráfico (v.g. por utilización del algoritmo de ajuste de curvas del paquete de software Kaleidagraph) a la ecuación siguiente, donde "Señal_[ligando]" es la señal de fijación neta a la concentración del péptido PL "[ligando]", "Kd" es la afinidad aparente del evento de fijación, y "Fijación de Saturación" es una constante determinada por el algoritmo de ajuste de curvas para optimizar el ajuste a los datos experimentales:

$$\text{Señal}_{[\text{ligando}]} = \text{Fijación de Saturación} \times \frac{[\text{ligando}]}{[\text{ligando}] + \text{Kd}}$$

10 Para aplicación fiable de la ecuación anterior es necesario que la concentración máxima de ligando peptídico ensayoada con éxito experimentalmente sea mayor que, o al menos similar a, la Kd calculada (equivalentemente, la fijación máxima observada debería ser similar a la fijación de saturación calculada). En los casos en que la satisfacción de los criterios anteriores resulte difícil, puede utilizarse un enfoque alternativo (más adelante).

15 Los resultados obtenidos cuando se utiliza el enfoque 1 se muestran en las **FIGURAS 2A Y 2B**. La **FIGURA 2A** muestra concentraciones variables de CLASP-2 (**FIGURA 2A**) o Fas (**FIGURA 2B**) biotinilados. Los péptidos C-terminales reaccionaban con el polipéptido GST inmovilizado (fijado a placa) o las proteínas de fusión GST/PDZ (GST/DLG1, GST/NeDLG, y GST/PSD95) por duplicado. Las señales se normalizaron, se representaron gráficamente y se ajustaron a una curva de fijación de saturación, produciendo una afinidad aparente de 21 μM para la interacción DLG1-CLASP-2, 7,5 μM para la interacción NeDLG-CLASP-2, 45 μM para la interacción PSD95-CLASP-2, y 54 μM para la interacción DLG1-Fas, 54 μM para la interacción NeDLG-Fas, y 85 μM para la interacción PSD95-Fas.

20 Enfoque 2:

25 (1) Una concentración fijada de un polipéptido de dominio PDZ y concentraciones crecientes de péptido PL marcado (marcado con, por ejemplo, biotina o fluoresceína, véase la **TABLA 4** para secuencias de aminoácidos peptídicos representativas) se mezclan en solución y se dejan reaccionar. En una realización, las concentraciones preferidas de péptido son 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM. En diversas realizaciones, los tiempos de reacción apropiados pueden oscilar desde 10 minutos a 2 días a temperaturas comprendidas entre 4°C y 37°C. En algunas realizaciones, la reacción idéntica puede llevarse a cabo también utilizando una proteína que no contiene un dominio PDZ como control (v.g., si el polipéptido del dominio PDZ es una proteína de fusión, puede utilizarse la pareja de fusión).

30 (2) Los complejos PDZ-ligando pueden separarse del péptido marcado sin fijar utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los complejos pueden separarse utilizando cromatografía de exclusión de tamaños con alta resolución (HPSEC, filtración con gel) (Rabinowitz et al., 1998, *Immunity* 9: 699), cromatografía de afinidad (v.g. utilizando cuentas de glutatión-Sepharose, y absorción por afinidad (v.g., por fijación a una placa recubierta con anti-GST como se ha descrito arriba).

35 (3) El complejo PDZ-ligando se detecta basándose en la presencia del marcador en el ligando peptídico utilizando una diversidad de métodos y detectores conocidos por una persona con experiencia en la técnica. Por ejemplo, si el marcador es fluoresceína y la separación se consigue utilizando HPSEC, se puede utilizar un detector de fluorescencia en línea. La fijación se puede detectar también como se ha descrito anteriormente para el ensayo G.

40 (4) La señal de fijación PDZ-ligando se representa gráficamente en función de la concentración de ligando y la gráfica se ajusta (v.g., utilizando el algoritmo de ajuste de curvas del paquete de software Kaleidagraph) a la ecuación siguiente, donde "Señal_[ligando]" es la señal de fijación neta a la concentración del péptido PL "[ligando]", "Kd" es la afinidad aparente del evento de fijación, y "Fijación de Saturación" es una constante determinada por el algoritmo de ajuste de curvas para optimizar el ajuste a los datos experimentales:

$$45 \text{ Señal}_{[\text{ligando}]} = \text{Fijación de Saturación} \times \frac{[\text{ligando}]}{[\text{ligando}] + \text{Kd}}$$

50 La medida de la afinidad de un ligando peptídico marcado que se fija a un polipéptido n de dominio PDZ es útil debido a que el conocimiento de la afinidad (o afinidad aparente) de esta interacción permite el diseño de inhibidores de la concentración con potencia conocida (véase **EJEMPLO 2**). La potencia de los inhibidores en la inhibición debería ser similar a (es decir dentro de un orden de magnitud de) la afinidad aparente del ligando peptídico marcado que se fija al dominio PDZ.

6.4 Ensayos para Identificar Nuevos Restos de Fijación del Dominio PDZ y para Identificar Inhibidores de la Fijación Proteína PDZ-Proteína PL

55 Aunque se ha descrito arriba fundamentalmente en términos de identificación de las interacciones entre los polipéptidos del dominio PDZ y las proteínas PL, los ensayos arriba descritos y otros ensayos pueden utilizarse para identificar la fijación de otras moléculas (v.g. miméticos peptídicos, moléculas pequeñas y análogas) a las secuencias del dominio PDZ. Por ejemplo, utilizando los ensayos descritos en esta memoria, pueden cribarse

bibliotecas combinatorias y otras bibliotecas de compuestos. El cribado de bibliotecas puede ser realizado por cualquiera de una diversidad de métodos conocidos comúnmente. Véanse, v.g., las referencias siguientes, que dan a conocer el cribado de bibliotecas peptídicas: Parmley y Smith, 1989, *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:215-218; Scott y Smith, 1990, *Science* 249: 386-390; Fowlkes et al., 1992; *BioTechniques* 13:422-427; Oldenburg et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5393-5397; Yu et al., 1994, *Cell* 76:933-945; Staudt et al., 1988, *Science* 241:577-580;

5 Bock et al., 1992, *Nature* 355: 564-566; Tuerk et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6988-6992; Ellington et al., 1992, *Nature* 355:850-852; Patente U.S. Núm. 5,096,815, Patente U.S. Núm. 5,223,409, y Patente U.S. Núm. 5,198,346, todas ellas otorgadas a Ladner et al.; Rebar y Pabo, 1993, *Science* 263:671-673; y Publicación PCT Núm. WO 94/18318.

10 En un aspecto específico, el cribado puede realizarse por contacto de los miembros de la biblioteca con un polipéptido de dominio PDZ de células hematopoyéticas inmovilizado sobre un soporte sólido (v.g. como se describe arriba en el ensayo "G") y recogiendo aquellos miembros de la biblioteca que se fijan a la proteína. Ejemplos de tales métodos de cribado, denominados "técnicas de lavado en batea" se describen a modo de ejemplo en Parmley y Smith, 1988, *Gene* 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, *BioTechniques* 13:422-427; Publicación PCT Núm. WO 94/18318; y en las referencias citadas anteriormente en esta memoria.

15 En otro aspecto, puede utilizarse el sistema de dos híbridos para seleccionar proteínas interaccionantes en levadura (Fields y Song, 1989, *Nature* 340: 245-246; Chien et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9578-9582) para identificar moléculas que se fijan específicamente a una proteína que contiene dominio PDZ. Adicionalmente, las moléculas identificadas se ensayoan ulteriormente en cuanto a su aptitud para inhibir las interacciones de receptores 20 transmembranales con un dominio PDZ.

25 En un aspecto, se identifican los antagonistas de una interacción entre una proteína PDZ y una proteína PL. En una realización, se utiliza una modificación del ensayo "A" descrito arriba para identificar antagonistas. En una realización, se utiliza una modificación del ensayo "G" arriba descrito para identificar antagonistas.

30 En un aspecto, se utilizan ensayos de cribado para detectar moléculas que se fijan específicamente a dominios PDZ en células hematopoyéticas. Tales moléculas son útiles como agonistas o antagonistas de la función celular mediada por las proteínas PDZ (v.g., activación de células, v.g., activación de células T, transporte de vesículas, liberación de citoquinas, factores de crecimiento, cambios de transcripción, reordenamiento de la citoesqueletina, movimiento de células, quimiotaxis, y análogos). En un aspecto, tales ensayos se realizan para cribado con respecto a inhibidores de la activación de los leucocitos para desarrollo de fármacos. La descripción proporciona por tanto 35 ensayos para detectar moléculas que se fijan específicamente a proteínas que contienen dominio PDZ en células hematopoyéticas. Por ejemplo, se pueden utilizar células recombinantes que expresan ácidos nucleicos codificantes del dominio PDZ para producir dominios PDZ en estos ensayos y cribar respecto a moléculas que se fijan a los dominios. Las moléculas se ponen en contacto con el dominio PDZ (o fragmento del mismo) en condiciones conducentes a la fijación, y se identifican luego moléculas que se fijan específicamente a tales dominios. Métodos que pueden utilizarse para realizar lo anterior son conocidos comúnmente en la técnica.

40 A modo de ejemplo, diversas bibliotecas, tales como bibliotecas de péptidos aleatorios o combinatorios o bibliotecas no peptídicas pueden cribarse respecto a moléculas que se fijan específicamente a dominios PDZ en células hematopoyéticas. Se conocen en la técnica muchas bibliotecas que pueden utilizarse, v.g., bibliotecas sintetizadas por medios químicos, bibliotecas recombinantes (v.g. bibliotecas de presentación de fago), y bibliotecas basadas en traducción *in vitro*.

45 Ejemplos de bibliotecas sintetizadas químicamente se describen en Fodor et al., 1991, *Science* 251: 767-773; Houghten et al., 1991, *Nature* 354: 84-86; Lam et al., 1991, *Nature* 354: 82-84; Medynski, 1994, *Bio/Technology* 12: 709-710; Gallop et al., 1994, *J. Medicinal Chemistry* 37 (9) : 1233-1251; Ohlmeyer et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10922-10926; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422-11426; Houghten et al., 1992, *Biotechniques* 13: 412; Jayawickreme et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1614-1618; Salmon et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11708-11712; Publicación PCT Núm. WO 93/20242; y Brenner y Lerner, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5381-5383.

50 Ejemplos de bibliotecas de presentación de fago se describen en Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin et al., 1990, *Science*, 249:404-406; Christian, R.B., et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227:711-718); Lenstra, 1992, *J. Immunol. Meth.* 152:149-157; Kay et al., 1993, *Gene* 128:59-65; y Publicación PCT Núm. WO 94/18318 fechada en 18 agosto, 1994.

55 Bibliotecas basadas en traducción *in vitro* incluyen, pero sin carácter limitante, las descritas en la Publicación PCT Núm. WO 91/05058 fechada en 18 abril, 1991; y Mattheakis et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9022-9026.

60 A modo de ejemplos de bibliotecas no peptídicas, puede adaptarse para uso una biblioteca de benzodiacepinas (véase, v.g., Bunin et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4708-4712). Pueden utilizarse también bibliotecas de peptoides (Simon et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9367-9371). Otro ejemplo de una biblioteca que puede utilizarse, en la cual las funcionalidades amida en los péptidos se ha sometido a permetilación para generar una biblioteca combinatoria transformada químicamente, se describe por Osthres et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11138-11142).

Será apreciado por un técnico con experiencia ordinaria que, en un aspecto, los antagonistas se identifican por realización de los ensayos A o G en presencia y ausencia de un antagonista conocido o candidato. Cuando se observa una fijación reducida en presencia de un compuesto, dicho compuesto se identifica como antagonista. La fijación incrementada en presencia de un compuesto significa que el compuesto es un agonista.

- 5 Por ejemplo, en un ensayo un compuesto de ensayo puede identificarse como un inhibidor (antagonista) de la fijación entre una proteína PDZ y una proteína PL por contacto de un polipéptido del dominio PDZ y un péptido PL en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, en condiciones en las cuales aquéllas formarían un complejo (excepto por la presencia del compuesto de ensayo), y detección de la formación del complejo en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Se apreciará que una menor formación del complejo en presencia del compuesto de ensayo que en ausencia del compuesto indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor de la fijación proteína PDZ-proteína PL. En diversas realizaciones, el péptido PL comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia del terminal C de una proteína PL (v.g., CD6, CD49E, CD49F, CD138, Clasp-1, Clasp-4, VCAM1, Clasp-2, CD95, DNAM-1, CD83, CD44, CD4, CD97, Neurexina, CD3n, DOCK2, CD34, FceRlb, o FasLigand).
- 10 15 En un aspecto, el ensayo "G" se utiliza en presencia o ausencia de un inhibidor candidato. En una realización, el ensayo "A" se utiliza en presencia o ausencia de un inhibidor candidato.

En un aspecto (en el cual se utiliza un ensayo G), una o más proteínas de fusión GST que contienen dominio PDZ se fijan a la superficie de los pocillos de una placa de 96 pocillos como se describe arriba (con controles apropiados que incluyen proteína GSP no de fusión). Todas las proteínas de fusión se fijan en pocillos múltiples, de tal modo 20 que puedan realizarse controles apropiados y el análisis estadístico. Un compuesto de ensayo en BSA/PBS (típicamente a concentraciones múltiples diferentes) se añade a los pocillos. Inmediatamente después de ello, se añaden 30 μ l de un péptido marcado detectablemente (v.g., biotinilado) conocido por fijarse al dominio PDZ relevante (véase, v.g., la **TABLA 2**) a cada uno de los pocillos a una concentración final de, v.g. entre 25 aproximadamente 2 μ M y aproximadamente 40 μ M, típicamente 5 μ M, 15 μ M, o 25 μ M. Esta mixtura se deja reaccionar luego con la proteína de fusión PDZ fijada a la superficie durante 10 minutos a 4°C, seguido por 20 minutos a 25°C. La superficie se lava 3 veces para dejarla exenta de péptido sin fijar con PBS enfriado en hielo y se determina la cantidad de fijación de péptido en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. Usualmente, se mide el nivel de fijación para cada conjunto de pocillos réplica (v.g. duplicados) por sustracción del valor medio del ruido de fondo exclusivo de GST del valor medio de la medida bruta de fijación del péptido en estos pocillos.

30 En un aspecto alternativo, el ensayo A se lleva a cabo en presencia o ausencia de un candidato de ensayo para identificar inhibidores de las interacciones PL-PDZ.

En un aspecto, se determina un compuesto de ensayo que es un inhibidor específico de la fijación del dominio PDZ (P) y una secuencia PL (L) cuando, a una concentración del compuesto de ensayo inferior o igual a 1 μ M (v.g., menor que o igual a 500 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM o 1 nM) la fijación de P a L en presencia del compuesto 35 de ensayo es menor que aproximadamente 50% de la fijación en ausencia del compuesto de ensayo (en diversas realizaciones, menor que aproximadamente 25%, menor que aproximadamente 10%, o menor que aproximadamente 1%). Preferiblemente, la señal neta de fijación de P a L en presencia del compuesto de ensayo más seis (6) veces el error estándar de la señal en presencia del compuesto de ensayo es menor que la señal de fijación en ausencia del compuesto de ensayo.

40 En un aspecto, se llevan a cabo ensayos para un inhibidor utilizando un solo par proteína PDZ-proteína PL (v.g., una proteína de fusión del dominio PDZ y un péptido PL). En una realización afín, los ensayos se llevan a cabo utilizando una pluralidad de pares, tal como una pluralidad de pares diferentes enumerados en la **TABLA 2**. En algunos aspectos, es deseable identificar compuestos que, a una concentración dada, inhiben la fijación de un par PL-PDZ, pero no inhiben (o inhiben en menor grado) la fijación de un segundo par PL-PDZ especificado. Estos 45 antagonistas pueden identificarse por realización de una serie de ensayos utilizando un inhibidor candidato y diferentes pares PL-PDZ (v.g., como se muestra en la matriz de la **TABLA 2**) y comparando los resultados de los ensayos. Se contemplan la totalidad de dichas combinaciones por pares (v.g., el compuesto de ensayo inhibe la fijación de PL₁ a PDZ en mayor grado que el mismo inhibe la fijación de PL₁ a PDZ₂ o PL₂ a PDZ₂). Es importante, y se apreciará que, basándose en los datos proporcionados en la **TABLA 2** y descritos en esta memoria, (y datos 50 adicionales que pueden generarse utilizando los métodos descritos en esta memoria) pueden diseñarse fácilmente inhibidores con especificidades diferentes.

Los restos de fijación de PDZ y antagonistas de la fijación proteína PDZ-proteína PL de la invención se utilizan para modular actividades o funciones biológicas de las células (v.g., células hematopoyéticas, tales como células T y células B y análogas), células endoteliales, y otras células del sistema inmunitario, como se describen en esta 55 memoria, y para tratamiento de enfermedades y afecciones en humanos y animales no humanos (v.g., modelos experimentales). Las actividades biológicas ilustrativas se han enumerado anteriormente.

Cuando se administran a pacientes, los compuestos (v.g., inhibidores de la interacción PL-PDZ) son útiles para el tratamiento (mejora los síntomas de) una diversidad de enfermedades y afecciones, que incluyen enfermedades caracterizadas por respuestas inmunes inflamatorias y humorales, v.g., inflamación, alergia (v.g., anafilaxis

sistémica, respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos, alérgicas a picaduras de insecto; enfermedades inflamatorias inensayoinales, colitis ulcerosa, ileítis y enteritis; psoriasis y dermatosis inflamatorias, escleroderma; enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, colitis alérgica, enfermedades de hipersensibilidad pulmonar, y las vasculitis análogas, incompatibilidad de Rh, reacciones de transfusión, sensibilidades a los fármacos, PIH, 5 dermatitis atópica, eczema, rinitis; enfermedades autoinmunes, tales como artritis (reumatoide y psoriásica, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, diabetes dependiente de insulina, glomerulonefritis, escleroderma, MCTD, IDDM, tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, psoriasis y análogos, osteoartritis, poliartritis, rechazo de injertos (v.g., rechazo de aloinjertos, v.g., rechazo de aloinjerto renal, enfermedad de rechazo inverso, rechazo de trasplantes (de corazón, riñón, pulmón, hígado, inensayo delgado, córnea, páncreas, cadáver, 10 autólogo, médula ósea, y xenotrasplante)), ateroesclerosis, trastornos dependientes de angiogénesis, cánceres (v.g., melanomas y cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemias, linfomas, enfermedad metastásica), enfermedades infecciosas (v.g., infección viral, tal como HIV, sarampión, parainfluenza, fusión celular mediada por virus), isquemia (v.g., complicaciones post-infarto de miocardio, lesión de articulación, riñón, escleroderma).

Las proteínas PL y las proteínas PDZ enumeradas en la **TABLA 2** están bien caracterizadas, y una persona con 15 experiencia, ayudada por esta descripción (con inclusión del descubrimiento de las interacciones entre las proteínas PL y las proteínas PDZ descritas en esta memoria), reconocerá muchos usos para moduladores (v.g., intensificadores o inhibidores) de interacciones PDZ-PL tales como las descritas en la **TABLA 2**. Para ayudar más al lector, se proporciona más adelante una exposición de las características de proteínas PL seleccionadas (y su 20 función). Se reconocerá que esta descripción no es exhaustiva y que no pretende limitar la invención en modo alguno. Adicionalmente, nada en esta sección debe interpretarse como intención por los inventores de limitarse a un mecanismo de acción particular.

A. CD6

Como se ha indicado arriba, CD6 fija la proteína PDZ 41.8. CD6 se expresa en timocitos, células T, y leucemias linfocíticas crónicas de las células B. CD6 juega un papel en la coestimulación de las células T, y las células T CD6 25 negativas son menos autorreactivas que las células T CD6 positivas. Se predice que la inhibición de CD6 y de las interacciones CDE6/41,8 reducirá los síntomas de la enfermedad de rechazo inverso (GVHD) o la psoriasis. Así pues, en un aspecto de la descripción, GVD se reduce en un paciente que recibe células de médula ósea del donante por pretratamiento de las células con una cantidad eficaz de un antagonista. En combinación con la terapia inmunosupresora posterior al trasplante tal como FK606, Cellcept o ciclosporina, los inhibidores de la interacción 30 CD6-PDZ mejorarán la supervivencia global de los pacientes de trasplante (v.g., pacientes de leucemia).

B. CD49e (ALFA-4)

Como se muestra por los experimentos que se consignan en esta memoria, el extremo C-terminal de CD49e se fija a la proteína 41,8 kD que contiene el dominio PDZ. CD49e es una proteína transmembranal de la membrana de 110 kD de la familia alfa-integrinas (alfa-integrina 5). Apareada con la subunidad beta-1 de integrina, forma VLA-5. VLA-5 35 se expresa predominantemente en células de los linajes hematopoyético y linfoides que incluyen monocitos, basófilos, células T, y células B activadas. VLA-5 es el receptor para la molécula de adhesión expresada ubicuamente fibronectina. Una lesión tisular tal como infarto de miocardio libera fragmentos solubles de fibronectina. La fijación de estos fragmentos solubles a VLA-5 da como resultado quimiotaxis de células inmunes que incluyen monocitos a la fuente de fibronectina, así como modulación decreciente de la expresión de VLA-5 en estas células. 40 Tal regulación decreciente inducida por ligandos es una característica común y requerida de los receptores quimiotáxicos. Una vez que las células inmunes migran totalmente a la fuente de fibronectina, la adhesión a la superficie de fibronectina se intensifica por la interacción fibronectina-VLA-5. Sin pretender quedar ligados por un mecanismo particular, se cree que la interacción 41.8/CD49e es necesaria para la distribución apropiada en la membrana de CD49e y/o para el reciclamiento de CD49e de tal modo que cuando se altera aquélla, la migración y la 45 adherencia a las superficies que contienen fibronectina se alteran análogamente, dando como resultado una incapacidad de las células del sistema inmunitario para migrar eficazmente hacia una fuente de fibronectina y adherirse a las superficies que contienen fibronectina. Dicha alteración daría por consiguiente como resultado procesos inflamatorios reducidos deseables que incluyen inflamación reducida post-infarto de miocardio. Otras 50 enfermedades a tratar incluyen, pero sin carácter limitante, inflamación de articulaciones, psoriasis, alergia por contacto, enfermedad de Crohn, enfermedad inensayoinal inflamatoria, eczema, y dermatitis atópica.

C. CD49F (subunidad VLA-6 α)

Como se ha indicado arriba, CD59f se fija a la proteína PDZ 41.8. CD49f es conocida como una subunidad de integrina que se apareja con la subunidad de integrina β 1 (CD29), formando VLA-6, o con CD104 (subunidad de integrina β 4). La familia de supergenes de integrina está constituida por cierto número de heterodímeros $\alpha\beta$ de la superficie celular importantes para muchos procesos fisiológicos diferentes, que incluyen embriogénesis, trombosis, curación de las heridas, tumorigénesis y respuestas inmunes. Cada cadena β puede aparearse con diversas cadenas α . Tanto VLA-6 como CD49f/CD104 se expresan ampliamente en los epitelios en tejidos no linfoides. VLA-6 55 se expresa también en las plaquetas, monocitos, timocitos y linfocitos T, con una expresión incrementada en las células T de memoria activadas y en reposo.

La inhibición de interacciones entre VLA-6 y 41.8 tiene cierto número de funciones terapéuticas tales como la prevención y el tratamiento de cánceres metastásicos, y el tratamiento de la inmunidad por hiperactividad. Por ejemplo, VLA-6 está asociada con la invasión del carcinoma de próstata y juega un papel en la metástasis del cáncer de mama.

5 El bloqueo de la función de VLA-6 combinado con el tratamiento convencional para el cáncer de próstata sería un tratamiento más eficaz para prevención de la enfermedad metastásica (véase, Cress et al., 1995, Cancer Metastasis R). El bloqueo de CD49f por interacción con PDZ puede tratar también la incompatibilidad de Rh por debilitación de la respuesta de memoria o en el tratamiento de los queloides.

D. CD138 (Syndecan-1)

10 CD138 es un receptor de proteoglicanos transmembranal cuyo dominio extracelular funciona como dominio de fijación de ligando para diversos componentes de la matriz extracelular cuya porción intracelular funciona para alterar el citoesqueleto y transducir señales extracelulares. CD138 se fija también a FGF2 y puede ser un co-receptor para el receptor FGF (Yayon et al., 1991).

15 Como se ha demostrado anteriormente, CD138 interacciona con la proteína de 41,8 kD y con TIAM1. Se ha informado también que el término C de CD138 se fija a los dominios PDZ de sintenina y CASK humano (Cohen et al., 1998, J. Cell. Biol. 142:129-138; Grootjans et al., 1997, PNAS 94:13683-13688; Hsueh et al., 1998, J. Cell. Biol. 142:139-151). CD138 se expresa en células pre-B, células B inmaduras, células plasmáticas, células neurales, la superficie basolateral de las células epiteliales, las células mesenquimales embrionarias, las células vasculares de la musculatura lisa, células endoteliales y células neurales pero no células B circulantes maduras. Se cree que la interacción entre CD138 y los dominios PDZ de la proteína de 41,8 kD y las proteínas TIAM1 es necesaria para la 20 distribución apropiada de CD138 en la superficie celular. Se espera que la disruptión de la interacción por administración de una cantidad eficaz de un antagonista interfiera con la migración y adherencia de las células a la matriz extracelular, dando como resultado respuestas inmunes inflamatorias y humorales reducidas. La inhibición de CD138 puede utilizarse para tratar sin limitación enfermedades tales como deterioro inflamatorio posterior a infarto de miocardio, lesión de articulaciones, artritis reumatoide, vasculitis, reacción con los fármacos, escleroderma, SLE, 25 tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, diabetes juvenil dependiente de insulina, y psoriasis.

E. CD98

Como se ha demostrado arriba, CD98 interacciona con MPP2. CD98 se expresa a niveles altos en monocitos y a niveles bajos en células T, células B, esplenocitos, células NK, y granulocitos. CD98 juega papeles en adhesión, fusión y es un transportador de aminoácidos tipo L. CD98 está implicado también en la fusión de células mediada por 30 virus (v.g. paramixovirus: virus tipo 2 de la parainfluenza, virus de la enfermedad de Newcastle, y rubulavirus) y se espera que el antagonismo de la función de CD98 trate infecciones virales y limite la propagación del virus. Los inhibidores de CD98 pueden ser un agente antiviral para, pero sin carácter limitante, paramixovirus, parainfluenza, enfermedad de Newcastle y rúbula. Otros tratamientos incluyen el tratamiento de leucemias agudas.

F. CLASP-1

35 Como se ha demostrado arriba, CLASP-1 interacciona con DLG1, PSD95, y NeDLG. CLASP-1 es un miembro de una superfamilia de proteínas asociadas a las células inmunes con motivos similares (véase PCT/US99/22996 publicado como WO 00/20434). CLASP-1 funciona en el mantenimiento del sistema inmunitario. El transcripto de CLASP-1 está presente en órganos linfoides y tejido neural, y la proteína es expresada por los linfocitos T y B y macrófagos en la subregión MOMA-1 de la zona marginal del bazo, un área que se sabe es importante en la 40 interacción de las células T:B. La tinción con CLASP-1 de células T y B individuales exhibe una polaridad estructural pre-activación, que está organizada como una estructura de "bolas" o "cápsulas" en las células B, y formando una estructura de "anillo, "bola" o "cápsula" en las células T. La situación de estas estructuras es adyacente al centro organizador de los microtúbulos ("MTOC"). La tinción del anticuerpo CLASP-1 indica que CLASP-1 se encuentra en la interfaz de los conjugados de células T-B que están asignados plenamente a la diferenciación. Los anticuerpos 45 para el dominio extracelular de CLASP-1 bloquean también la formación de conjugados de células T-B y la activación de las células T.

Se espera que el antagonismo de la función de CLASP-1 interfiera con respuestas inmunes (v.g., activación de las células T y B), la transducción de señales, las interacciones célula-célula, y la organización de la membrana. Enfermedades a tratar por los agonistas/antagonistas de CLASP-1 incluyen, pero sin carácter limitante, artritis 50 reumatoide, diabetes juvenil, rechazo de órganos, enfermedad de rechazo inverso, escleroderma y esclerosis múltiple.

G. CLASP-4

Como se ha demostrado anteriormente, CLASP-4 interacciona con DLG1, PSD95, NeDLG, LDP, AF6, 41.8, y 55 MINT1. CLASP-4 es un miembro de una superfamilia de proteínas asociadas a células inmunes con motivos similares (véase la Solicitud de Patente U.S. 60/196527, también en tramitación, presentada el 11 de abril de 2000). La proteína CLASP-4 se expresa fundamentalmente en los linfocitos de sangre periférica. La inhibición de la interacción de CLASP-4 y los dominios PDZ interferirá con las respuestas inmunes (v.g., activación de las células T y B), transducción de señales, interacciones célula-célula, y organización de la membrana. Enfermedades a tratar

por los agonistas y antagonistas de CLASP-4 incluyen, pero sin carácter limitante, artritis reumatoide, diabetes juvenil, rechazo de órganos, enfermedad de rechazo inverso, escleroderma, esclerosis múltiple, leucemias agudas, crisis leucémica de blastos, inflamación posterior a infarto (cardíaco, etc.), y ateroesclerosis.

H. VCAM1

- 5 La molécula-1 de adhesión vascular celular (VCAM-1, CD106) es expresada predominantemente por el endotelio vascular (es decir, las células endoteliales) pero ha sido detectada en macrófagos, células dendríticas, células derivadas de la médula ósea, fibroblastos, células epiteliales corticales del timo), células musculares vasculares lisas, mioblastos y miotubos. VCAM-1 media la adhesión por interacción con un ligando de integrina, VLA-4, que es expresado por linfocitos, monocitos y eosinófilos. La interacción entre VCAM-1 y VLA-4 es importante para 10 activación, aplastamiento y extravasación de las células que expresan VLA-4 cuando el endotelio propiamente dicho ha sido activado debido a inflamación o lesión (Salomon et al., 1997, Blood 89: 2461-2471; St-Pierre et al., 1996, Eur. J. Immunol. 26:2050-2055; Bell et al., 1995, Int. Immunol. 7:1861-1871).

Como se ha expuesto anteriormente, la región C-terminal de VCAM-1 es un ligando para los dominios PDZ de MPP1, DLG1, NeDLG1, LDP, la proteína 41.8, TIAM1 y K303. Se cree que estas interacciones median la función de las interacciones de las células endoteliales con leucocitos que expresan integrinas. Cuando las interacciones PDZ-PL se alteran, la adherencia de los leucocitos al endotelio se alterará análogamente, dando como resultado, v.g., reducción de la inflamación. Así, la inhibición de la fijación de VCAM-1 a las proteínas PDZ es útil para reducir respuestas inflamatorias VCAM-1 anormales y patologías asociadas tales como (pero sin carácter limitante), rechazo de alojinertos renales, diabetes dependiente de insulina, artritis reumatoide, complicaciones posteriores a 20 infarto de miocardio y lupus eritematoso sistémico (Pasloske et al., 1994, Ann Rev Med 45:283; Ockenhouse et al., 1992, J. Exp. Med. 176:1183; Solezk et al., 1997, Kidney Int. 51:1476; Tedla, et al., 1999, Clin. Exp. Immunol. 117:92-99; Kusterer et al., 1999, Exp Clin Endocrinol Diabetes 107:S102-107; Bonomini et al., 1998, Nephron 79:399; Suassuna et al., 1994, Kidney Int. 46:443; Ferri et al., 1999, Hypertension 34:568).

I. CLASP-2

- 25 Como se ha demostrado arriba, CLASP-2 interacciona con PSD-95, NeDLG, y DLG1. CLASP-2 es un miembro de una superfamilia de proteínas asociadas a células inmunes con motivos similares (véase la Patente U.S. 09/547276, también en tramitación, presentada el 11 de abril de 2000; WO 00/10158 presentada el 11 de abril de 2000; WO 00/10156 presentada el 11 de abril de 2000). El transcripto de CLASP-2 está presente muy acusadamente en 30 placenta seguido por pulmón, riñón y corazón, y la proteína se expresa en células T y B, así como en células epiteliales de riñón.

La inhibición de la interacción de CLASP-2 y dominios PDZ interferirá con la función de CLASP-2 dando como resultado interferencia con la función de las células T y B (v.g., activación de las células T y B), transducción de señales, interacciones célula-célula, y organización de la membrana. Adicionalmente, dado que CLASP-2 está 35 presente en el corazón, el bloqueo de la función o expresión de CLASP-2 puede bloquear selectivamente respuestas inmunes en el corazón (por ejemplo, para detener selectivamente la respuesta inmune en el compartimiento cardiaco, v.g. después del rechazo de trasplante cardiaco o después de inflamación MI, sin poner en compromiso la inmunidad en ningún otro lugar). Otras enfermedades a tratar por agonistas/antagonistas de CLASP-1 incluyen, pero sin carácter limitante, artritis reumatoide, diabetes juvenil, rechazo de órganos, enfermedad de rechazo inverso, escleroderma, y esclerosis múltiple.

J. CD95 (Apo-1/Fas)

- CDE95 (Fas/Apo-1) y el ligando Fas (FasL) son un par receptor-ligando implicado en homeostasis de los linfocitos y la tolerancia periférica. La fijación de Fas por su ligando da como resultado la muerte apoptótica de células, un mecanismo principal importante para el aclaramiento seguro de células indeseables durante la resolución de la respuesta inflamatoria aguda. Como se demuestra arriba, CD95 se fija a los dominios PDZ DLG1, PSD-95, NeDLG, 45 y 41.8. Inhibición de la interacción de dominios CD95 y PDZ.

K. KV1.3 (Canal de Potasio Shaker Tipo Kv1.3)

Como se ha demostrado arriba, Kv1.3 se fija a DLG1, PSD-95, NeDLG, LIMK, 41.8, RGS12, DVL1, y MINT1. Kv1.3 es una proteína del canal relacionado con el sacudidor que está implicada en la modulación del potencial de membrana de los linfocitos T (Lewis y Cahalan, 1995, Ann. Rev. Immunol. 13: 623). La inhibición del canal Kv1.3 despolariza crónicamente la membrana de las células T, reduce la entrada de calcio por los canales de calcio de liberación activada por calcio en la membrana plasmática, e inhibe por consiguiente el camino de señalización de calcio esencial para la activación de los linfocitos. Hanada et al., consignaron que Kv1.3 está asociado con DLG1 y PSD95 en las células T de Jurkat (J. Biol. Chem. 1997, 272:26899). La administración de agonistas/antagonistas de la proteína Kv1.3-PDZ alterará la señalización de las células T y puede ser un fármaco terapéutico útil para tratar, pero sin carácter limitante, trasplante de órganos, enfermedad de rechazo inverso, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inmunosupresora inflamatoria, artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis múltiple, escleroderma, y enfermedad del tejido conectivo mixta.

L. DNAM-1

Como se ha demostrado arriba, DNAM-1 se fija a varias proteínas PDZ, que incluyen MPP2, DLG1, PSD95, NeDLG, LIM, AF6, 41.8 y RGS12. DNAM-1 está asociada constitutivamente con Fyn, pero requiere la presencia de pervanadato (un inhibidor de la tirosina-fosfatasa) (véase Shibuya, et al. 1999, *Immunity* 11: 615-623). Despues de

5 estimulación con anti-CD3 (o DNAM-1), DNAM-1 se fosforila en la serina 329 (Shibuya, et al. 1998, *J. Immun.* 561: 1671-1676) y se asocia con LFA-1. Adicionalmente, Fyn llega a asociarse con DNAM-1 con independencia de pervanadato. Fyn fosforila DNAM-1 en Y322, pero no requiere que Y322 continúe fijándose a DNAM-1.

Dado que DNAM-1 no tiene en sí misma un dominio de fijación SH3 sino que tiene solamente el sitio de fosforilación Src en Y322, debe estar presente una molécula adaptadora para puentear DNAM-1 y Fyn. DLG1 ha sido descrito en 10 la literatura como presente en las células T (Hanada, et al. 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 26899), pero no se fija a Fyn. PSD95 no tiene un sitio de fijación de SH3. Sin embargo, varias de las otras proteínas PDZ sí tienen dominios de fijación SH3 que incluyen, pero sin carácter limitante, NeDLG, RGS12, MPP2 y pueden realizar esta función. Esta 15 PDZ adaptadora enumerada arriba se fija a DNAM-1 por su dominio PDZ y simultáneamente se fija al dominio SH3 de Fyn por sus secuencias ricas en prolina precisamente N-terminales al dominio PDZ. El sitio Y139 es un sitio de fosforilación candidato para controlar la asociación de Fyn a DNAM-1 y el adaptador PDZ.

Basándose en este análisis, la inhibición de la asociación de PDZ con DNAM-1 utilizando los reactivos descritos en 20 esta memoria inhibirá la asociación de Fyn con DNAM-1 y la subsiguiente fosforilación de Y322 y activación de las células T citotóxicas. Enfermedades que pueden tratarse incluyen, pero sin carácter limitante enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, enfermedad inensayoinal inflamatoria, enfermedad de rechazo inverso, diabetes juvenil, y enfermedad de Hashimoto.

M. CD83 (HB15)

CD83 es una glicoproteína transmembranal, expresada predominantemente en células dendríticas (DCs) activadas, 25 células de Langerhans en la piel, con algo de expresión débil detectada en linfocitos periféricos activados, y células del retículo interdigital dentro de las zonas de células T de los órganos linfoideos (Zhou y Tedder 1995, *J. Immunol.* 154: 3821-3835; Zhou et al., 1992, *J. Immunol.* 149:735-742). CD83 se regula de nuevo en sentido creciente 30 después de activación de una DCs inmadura, y es el marcador discriminante principal y característico para las CDs maduras activadas (Czerniecki et al., 1997, *J. Immunol.* 159: 3823-3837). Las DCs funcionan como células presentadoras de antígeno (APSc). La regulación creciente y expresión de CD83 parece ser por tanto necesaria para que las DCs maduren y funcionen como APSCs.

Como se ha demostrado por experimentos descritos anteriormente, la CD83 se fija a los dominios PDZ de DLG1, 35 PSD95, y NeDLG. Estas interacciones entre CD83 y los dominios PDZ, y entre CD83 y DLG1, PSD95 y NeDLG se cree son importantes para la distribución y reciclamiento apropiados de CD83. La alteración de las proteínas CD83 y PDZ con agonistas y antagonistas puede utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, psoriasis, cánceres, alergias, enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, y lupus eritematoso sistémico.

N. CD44 (glicoproteína 1 fagocítica, receptor de retorno de los linfocitos, p85 y HCAM)

CD44 es una proteína transmembranal de un solo paso que tiene varias isoformas diferentes debidas a 40 remodelación alternativa. La misma tiene un patrón de expresión amplio que es detectado tanto en células de tipo hematopoyético como en células de tipo no hematopoyético, con inclusión de células epiteliales, endoteliales, mesenquimáticas y neuronales. CD44H es una isoforma principal que se expresa en células linfoideas, mieloideas y eritroides (revisado en Barclay et al., 1987, *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2^a edición, Academic Press). CD44 es un receptor para hialuronato (HA), que es un constituyente de la matriz extracelular (ECM). En el sistema inmunitario, CD44 funciona como una molécula de adhesión en la superficie de los leucocitos y eritrocitos que fija polímeros de HA en la ECM, y puede actuar también como receptor de señalización cuando HA se vuelve soluble 45 durante reacciones inflamatorias o deterioro tisular. Se ha demostrado que la región citoplásmica de CD44 se fija o está asociada con el citoesqueleto de actina por interacciones con espectrina y miembros de la familia ERM (ezrina, radixina, y meosina) (revisado en Lesley et al., 1993; Bajorath, 2000, *Proteins* 39: 103-111). Adicionalmente, CD44 está asociada con la tirosina quinasa no receptora p56Lck (Taher et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 2863-2867). Se ha demostrado que CD44 es una molécula co-estimulante con acoplamiento CD3/TCR para activar las células T (revisado en Aruffo, 1996, *J. Clin. Invest.* 98: 2191-2192).

Como se ha descrito arriba por experimentos consignados en esta memoria, el término C de CD44 es un ligando 50 para el dominio PDZ contenido en MPP1, pRIL-16 y MINT1. Se cree que las interacciones de CD44 con dominios PDZ, y entre CD44 con MPP1, pRIL-16 y MINT1 funcionan en el mantenimiento de la estructura de los leucocitos y en la señalización de los leucocitos. Así, cuando se altera una interacción CD44-PDZ, CD44 dejará de transducir señales intracelulares apropiadas, y mantendrá una distribución apropiada de CD44 en la superficie, lo que impedirá 55 adhesión de los leucocitos al endotelio durante la inflamación y el deterioro tisular. La administración de agonistas/antagonistas de esta interacción dará por tanto como resultado, pero sin carácter limitante, respuestas inflamatorias reducidas durante la isquemia tisular y la lisis celular (v.g. rabdomiosis), insuficiencias vasculares (v.g. necrosis por congelación), psoriasis, eczema, enfermedad de rechazo inverso, granuloma anular, y escleroderma.

O. CD97 (CD55)

Como se ha expuesto anteriormente, CD97 se fija a los dominios PDZ de DLG1 y 41.8. CD97 es una proteína transmembranal de 7 tramos con 79,7 kD expresada en granulocitos y monocitos y a niveles bajos en las células T y células B en reposo. Después de activación de las células T o B, los niveles de expresión de CD97 en las células T y

5 las células B aumentan rápidamente (Eichler et al., 1994, Scand. J. Immunol. 39, 111-115; Pickl et al., 1995, Leukocyte Typing V: 1151-1153). Cuando se expresa en células COS, CD97 confiere adhesión a linfocitos y a eritrocitos.

De acuerdo con la presente descripción, la interacción de CD97 con DLG1 y la proteína de 41,8 kD puede alterarse para interferir con la distribución membranal apropiada de CD97 y/o el reciclamiento de CD97. Tal modulación 10 afectará a la adherencia dependiente de CD97 de células con beneficio terapéutico. Sin carácter limitante, los agonistas y antagonistas de la interacción de proteínas CD97-PDZ pueden utilizarse para tratar artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y psoriasis.

P. Glicoforina C (GC)

Como se ha demostrado arriba, el término C de glicoforina C (GC) interacciona con los dominios PDZ de DLG 15 humana, PSD95, NeDLG, MMP2, AF6, 41,8 y MINT1 (con Mint-1 descrita previamente). Glicoforina C es una proteína integral de membrana expresada en células eritroides, timo, estómago, mama, hígado aducto y fetal, monocitos, células T y B (Le Van Kim et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 20407-20414, y es conocida por su papel en los eritrocitos humanos, donde la misma interacciona con MPP1 y la proteína 4.1 para regular la forma, integridad y 20 estabilidad mecánica de los glóbulos rojos (Marfatia et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 24191-24197; Reid et al., 1987, Blood 69: 1068-1072).

Las interacciones entre glicoforina C y las proteínas PDZ DLG, PSD95, NeDLG, MMP2, AF6, 41.8 y MINT1 se consideran necesarias para el mantenimiento de la integridad física de las células en las cuales se expresan las mismas. La modulación de las interacciones GC-PDZ alterará la función de éstas y puede ser utilizada para tratar, pero sin carácter limitante, policitemia vera, y esferocitosis.

25 Q. CDw128A (IL8RA)

Como se ha descrito arriba, CDW128A se fija a los dominios PDZ de DLG1 y NeDLG. Existen dos formas para el receptor IL-8, IL-8RA (CDw128A) e IL-8RB (CDw128B), los dos cuales son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y la rama de receptores de quimioquinas de la familia de rodopsina (CDw128A y CDw128B fijan ambos IL-8 con la misma afinidad, pero solamente CDw128B fija otras 3 quimioquinas CXC emparentadas con IL-8: la actividad estimulante del crecimiento del melanoma (GRO/MGSA), el péptido 2 activador 30 de los neutrófilos (NAP-2) y ENA-78. Véase, v.g., Ahuja, SK y Murphy, PM. 1996, J. Biol. Chem. 271: 20545-50.

CDw128A se expresa en todos los granulocitos, un subconjunto de células T, monocitos, células endoteliales, queratinocitos, eritrocitos, y células de melanoma. IL-8 induce quimiotaxis de neutrófilos, basófilos, y linfocitos T y aumenta la adhesión de neutrófilos y monocitos a las células endoteliales. La fijación de IL-8 a IL-8RA induce un 35 aumento transitorio en los niveles intracelulares de calcio, activación de la fosfolipasa D, un estallido respiratorio de neutrófilos y quimiotaxis. Esta respuesta pro-inflamatoria es eficaz en las respuestas inmunes normales. Los inhibidores de CDw128A son útiles para el tratamiento de psoriasis, artritis reumatoide, poliartritis, y para control de trastornos dependientes de la angiogénesis tales como los melanomas y el cáncer de mama.

(R) CD3-eta (η)

40 CD3-η es una variante de remodelación de CD3 zeta y un componente del complejo CD3/TCR, que se requiere para reconocimiento de antígeno, transducción de señales y activación de las células T (Weiss y Littman, 1994, Cell 76: 263-274.). Véase, Barclay et al., 1997, The Leucocyte Antigen Facts Book. 2^a edición, Academic Press. Como se demuestra por experimentos consignados en esta memoria, la región C-terminal de CD3-η es un ligando para los dominios PDZ de MINT1, proteína 41,8, DNG1 y PSD95. Las interacciones de CD3-η con dominios PDZ, y CD3-η 45 con MINT1, la proteína 41,8, DLG1 y PSD95 se cree son importantes en la activación de las células T, que se requiere para todas las respuestas inmunes celulares. La modulación de esta interacción por agonistas y antagonistas puede utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, rechazo de aloinjertos agudo y crónico, esclerosis múltiple, enfermedad de rechazo inverso, y artritis reumatoide.

(S) LPAP (CD45-AP, LSM-1)

50 LPAP es una proteína transmembranal expresada en células T y B en reposo y activadas. Se ha demostrado que LPAP se fija a CD45, una proteína que forma parte del complejo receptor de las células T y se ha encontrado que se co-localiza con CD4, CD2 y Thy-1. LPAP se ha precipitado también por co-inmunización con p56 (lck) y ZAP-70. La función real de LPAP se desconoce, pero se ha sugerido que es una molécula de ensamblaje para el complejo CD45.

Como se ha demostrado anteriormente, LPAP se fija a DLG-1 y MINT-1. Notablemente, DLG-1 y MINT-1 se expresan ambas en las células T. Se ha demostrado también que DLG-1 coprecipita con p56 (lck) en las células T. Los ensayos descritos en esta memoria han demostrado también que DLG-1 se fija a CD95 y KV1.3, y la fijación de MINT-1 a KV1.3. Todas estas moléculas están implicadas en la señalización por el TCR. Se cree que LPAP funciona 5 organizando la señalización por CD45 en la activación de las células T, posiblemente por reclutamiento de p56 (lck) como sustrato para CD45. Se ha demostrado que el bloqueo de la función de CD45 deteriora gravemente la respuesta de las células T. Es de esperar que la inhibición de la interacción entre las proteínas LPAP y PDZ altere el 10 camino mediado por CD45 del resto de la respuesta inmune. Los agonistas y antagonistas de la fijación PL-PDZ pueden utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, escleroderma y enfermedad de rechazo inverso.

(T) CD46 (Proteína cofactor de la membrana del complemento (MCP))

CD46 es una proteína de membrana que se expresa en todas las células nucleadas, pero no en los eritrocitos. CD46 15 es un miembro del regulador de la familia de proteínas de activación del complemento. Su función primaria es la protección de las células contra el ataque del complemento por desactivación del complemento C3b/C4b depositado en la membrana (Liszewski, et al., 1999, *Adv. Immunol.* 61: 201-283). CD46 existe en más de 8 isoformas que se generan por remodelación diferencial, con pesos moleculares que varían desde 45 a 70 kD. Además de la función anterior, CD46 sirve también como el receptor para el virus del sarampión y para otros microorganismos patógenos (v.g. *Streptococcus pyogenes*) (Manchester et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2161; Okada et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2489-2493.). CD46 parece también estar sobreexpresada en ciertos tumores (Jurianz 20 et al., 1999, *Mol Immunol* 36: 929-939), haciendo así las células tumorales insensibles a la acción del complemento. Véase, Barclay et al., (1997). *The Leucocyte antigen facts book*, 2^a edición, Academic Press.

Como se ha indicado arriba, CD46 se fija a DLG1, PSD95 y Ne-DLG. Se cree que esta interacción es necesaria para 25 la distribución apropiada en las membranas de CD46 y/o el reciclamiento de CD46. La alteración de la interacción CD46-PDZ puede reducir la capacidad del virus del sarampión y otros patógenos para entrar en las células, y hace que los tumores que expresan CD46 sean sensibles al ataque por el complemento. La administración de agonistas y antagonistas de la interacción CD46-PDZ es útil para el tratamiento, pero sin carácter limitante, de cánceres y enfermedades infecciosas virales.

(U) CDw128B

Como se ha descrito arriba, CDw128B se fija a los dominios PDZ de DLG1, NeDLG, PSD95, y 41.8 en los ensayos 30 arriba descritos. Existen dos formas para el receptor de IL-8, IL-8RA (CDw128A) e IL-8RB (CDw128B) las dos cuales son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y la rama de receptores de quimoquininas de la familia de la rodopsina. CDw128A y CDw128B fijan ambas IL-8 con afinidad igual, pero únicamente CDw128B fija también otras tres quimoquininas CXC emparentadas con IL-8: la actividad estimulante del crecimiento del melanoma (GRO/MGSA), el péptido 2 activador de los neutrófilos (NAP-2) y ENA-78. Véase, v.g., Ahuja, SK y Murphy, PM. 35 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 20545-50.

CDw128B se expresa en todos los granulocitos, un subconjunto de células T, monocitos, células endoteliales, queratinocitos, eritrocitos, y células de melanoma. IL-8 induce quimiotaxis de neutrófilos, basófilos, y linfocitos T pero 40 reducida con relación a IL8RA y aumenta la adhesión de neutrófilos y monocitos a las células endoteliales. La fijación de IL-8A a su receptor induce un aumento transitorio en los niveles intracelulares de calcio y liberación de gránulos, pero no induce activación de fosfolipasa D o un estallido respiratorio en los neutrófilos. Esta respuesta pro-inflamatoria es eficaz en las respuestas inmunes normales. Los inhibidores de CDw128B son útiles para el tratamiento de psoriasis, artritis reumatoide, poliartritis, y para el control de trastornos dependientes de la angiogénesis tales como melanomas y cáncer de mama.

(V) DOCK2

45 La familia DOCK son un grupo de proteínas morfogenéticas transmembranales que interaccionan con el citoesqueleto para afectar a los cambios de forma de la célula. Miembros de esta nueva familia incluyen *Drosophila myoblast city* (mbc), DOCK180, DOCK2, DOCK3, CED5, KIAA0209 y CLASP. La molécula prototípica, DOCK1 o DOCK180 es el homólogo humano del gen de *C. elegans*, CED5 que está implicado en el atrapamiento y la fagocitosis de células apoptóticas por los macrófagos. DOCK2 se encuentra en los linfocitos de sangre periférica y 50 puede convertir una célula aplastada en una morfología redondeada después de transfección (Nagase, et. al. 1996. *DNA Res* 3:321-329, Nishihara, H. 1999. *Hokkaido Igaku Zasshi* 74:157).

Como se ha demostrado anteriormente, DOCK2 es una PL y se fija a las proteínas PDZ. Utilizando proteínas PDZ como adaptador, DOCK2 se compleja con A, B, C para controlar la forma de la célula en la preparación para el 55 tránsito de los linfocitos para la circulación vascular. La modulación de DOCK2 por agonistas y antagonistas de su interacción con proteínas PDZ puede utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, leucemia aguda, crisis de blastos, inflamación posterior a infarto de miocardio, e inflamación post-traumática.

W. CD34

Como se ha demostrado arriba, CD34 se fija a DLG1, PSD95, y NeDLG. CD34 se expresa en una pequeña subpoblación de células de la médula ósea que incluye células madre hematopoyéticas. CD34 está presente también en células estomales de la médula ósea, y en células endoteliales. Las selectinas CD62L (selectina-L) y

5 CD62E (selectina-E) se fijan a CD34. CD34 media la ligación y/o el enrollamiento de los leucocitos. Las propiedades de las células madre hematopoyéticas de CD34 incluyen diferenciación mieloide de las células madre. La modulación de la interacción CD34-PDZ con agonistas y/o antagonistas puede utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, mielodisplasia, leucemias, inflamación post-traumática, e inflamación posterior a infarto de miocardio.

10 X. Cadena beta I del receptor Fc épsilon (FcεRβI)

El receptor de afinidad alta para IgE humana, FcεRI, está compuesto de un homodímero α , β , y γ enlazado a disulfuro. La cadena α fija la porción Fc de IgE, mientras que la cadena β sirve para amplificar las señales que son transducidas por el homodímero de la cadena γ . Existen ambos complejos (tetrámero $\alpha\beta\gamma 2$ y trímero $\alpha\gamma 2$), pero la cadena β amplifica la señal 5 a 7 veces, como se mide por activación Syk y movilización del calcio. Adicionalmente, 15 el FcεRβI es un ligando PDZ y es un miembro de la familia de receptores CD20/FcεRβI. Como se ha demostrado arriba, FcεRβI se fija a MINT1.

Como el receptor de afinidad alta para IgE, FcβRI en los basófilos y los mastocitos juega un papel esencial en la iniciación de las respuestas alérgicas. La señalización por el FcβRI comienza por reticulación de un alérgeno multivalente fijado a IgE. El resultado es desgranulación vesicular, liberación de histamina, leucotrienos y citoquinas 20 pro-inflamatorias (IL-6 y TNFα), factores responsables de los síntomas de hipersensibilidad inmediata. La alteración de la señalización por direccionamiento de la interacción PL/PDZ con agonistas y antagonistas puede utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, asma, dermatitis atópica, eczema, reacción de fármacos, mastocitosis, urticaria, síndrome eosinofilia-mialgia (Turner, H., et al., 1999, *Nature* 402 SUPP: B24).

Y. Ligando FAS (FasL)

25 CD95 (Fas/Apo-1) y el ligando Fas (FasL) son un par receptor-ligando implicado críticamente en la homeostasis de los linfocitos y la tolerancia periférica. La fijación de Fas por su ligando da como resultado la muerte apoptótica de las células, un mecanismo importante principal para el aclaramiento seguro de las células indeseables durante la resolución de la respuesta inflamatoria aguda. FasL está restringido principalmente a los linfocitos T activados y es inducido rápidamente. El ligando Fas está regulado frecuentemente en sentido creciente en el cáncer de mama, en 30 comparación con las células epiteliales normales de mama y enfermedad benigna de mama. Como se ha demostrado arriba, FasL se fija al dominio PDZ KIAA0561. Los modificadores PDZ-PL son útiles para el tratamiento, pero sin carácter limitante, de tumores, v.g. tumores no sensibles a la quimioterapia convencional.

Z. CDW125 (IL5R)

35 Como se ha demostrado arriba, CDW125 se fija a PTN-4 y RGS12. CDW125 es un receptor de IL-5 expresado en eosinófilos y basófilos. IL-5 promueve el crecimiento y la diferenciación de precursores de eosinófilos y activa los eosinófilos maduros (Takatsu et al. 1994, *Adv. Immunol.* 57: 145-190). La forma secretada de CDW125 tiene propiedades antagonistas y es capaz de inhibir la proliferación y diferenciación de los eosinófilos inducida por IL-5. La modulación de la fijación de CDW125 a los dominios PDZ puede utilizarse para tratar, pero sin carácter limitante, asma, dermatitis atópica, eczema, reacción con los fármacos, urticaria, mastocitosis, y eosinofilia.

40 AA. Receptor 1 del Linfoma de Burkitt (BLR-1; CXCR5)

BLR-1 es un receptor transmembranal detectado primariamente en las células B y se ha demostrado que está regulado en sentido creciente en las células T estimuladas (Dobner et al., 1992, *Eur J. Immunol.* 22: 2795-2799; Flynn et al., 1998, *J. Exp. Med.* 188: 297-304). BLR-1 funciona en la quimiotaxis de las células B y T en los folículos de órganos linfoides secundarios (v.g., el bazo) para desarrollo y selección apropiados frente a los抗ígenos (Forster et al., 1996, *Cell* 87: 1037-1047. Un ligando es el quimoatrayente de los linfocitos B (BLC), que se expresa fuertemente en los folículos de los parches de Peyer, el bazo, y los ganglios linfáticos (Gunn et al., 1998, *Nature* 391: 799-803). Coherente con su papel quimiotáctico es la demostración de que la expresión de BLR-1 está regulada en sentido decreciente en las células B activadas y desarrolladas (células plasmáticas) para evitar que las mismas se retengan en los folículos (Forster et al., 1994, *Cell Mol Biol* 40: 381-387), y que las células B blr-1 fallen 50 en migrar a los folículos de células B (Forster et al., 1996).

Como se demuestra por experimentos consignados en esta memoria, el extremo C-terminal de BLR-1 se fija a la proteína MINT1 que contiene dominio PDZ. Sin pretender quedar ligados por un mecanismo particular, la interacción entre BLR-1 y MINT1, y entre BLR-1 y los dominios PDZ es necesaria para la distribución y señalización apropiadas de BLR-1 en la superficie celular. Cuando se rompe esta interacción, las aptitudes quimiotácticas de las células linfoides que expresan BLR-1 se rompe análogamente. Dicha rotura da como resultado una respuesta inmune reducida, interferencia con la capacidad de los linfocitos para circular adecuadamente y desarrollar respuestas al antígeno. Los agonistas y antagonistas de esta interacción pueden utilizarse para el tratamiento, pero sin carácter limitante, de lupus

eritematoso sistémico, e scleroderma y otras enfermedades autoinmunes.

BB. CD4

CD4 es un co-receptor con el receptor de las células T (TCR) implicado en el reconocimiento de antígeno. Ambos CD4 y TCR pertenecen a la familia de supergenes de inmunoglobulinas. La activación de las células T se intensifica por aumento de la avidez de las células T para células efectoras y células diana. El dominio citoplásmico está implicado en la transducción de señales y la asociación con la tirosina-quinasa p56^{lck}. CD4 se expresa en la mayoría de los timocitos, las dos terceras partes de los linfocitos T de la sangre periférica, monocitos y macrófagos.

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (HIV-1) infecta las células por fusión membranal mediada por sus glicoproteínas de la envoltura (gp120-gp41) y se desencadena por la interacción de CD4 y un co-receptor de quimioquinas, CCR5 o CXCR4. La modulación de los inhibidores de CD4-PDZ con agonistas y antagonistas puede ser utilizada para tratar, pero sin carácter limitante, la infección de HIV inmediatamente después de la exposición a HIV, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, scleroderma, lupus eritematoso sistémico, y psoriasis.

6.5 Agonistas y Antagonistas de las Interacciones PDZ-PL

Como se describe en esta memoria, las interacciones entre proteínas PDZ y proteínas PL en las células (v.g., células hematopoyéticas, v.g., células T y células B) pueden alterarse o inhibirse por la administración de inhibidores o antagonistas. Los inhibidores pueden identificarse utilizando ensayos de cribado descritos en esta memoria. Los motivos descritos en esta memoria se utilizan para designar inhibidores. En algunos aspectos de la descripción, los antagonistas tienen una estructura (v.g., secuencia peptídica) basada en los residuos C-terminales de las proteínas del dominio PL enumeradas en la **TABLA 2**. En algunos aspectos de la descripción, los antagonistas tienen una estructura (v.g., secuencia peptídica) basada en un motivo PL descrito en esta memoria.

Los agonistas y antagonistas PDZ/PL pueden ser cualquiera de una gran diversidad de compuestos, tanto existentes naturalmente como sintéticos, orgánicos e inorgánicos, y con inclusión de polímeros (v.g., oligopeptídos, polipéptidos, oligonucleótidos, y polinucleótidos), moléculas pequeñas, anticuerpos, azúcares, ácidos grasos, nucleótidos y análogos de nucleótidos, análogos de estructuras existentes naturalmente (v.g., peptidomiméticos, análogos de ácido nucleico, etcétera), y numerosos otros compuestos. Aunque, por conveniencia, la presente exposición se refiere fundamentalmente a antagonistas de las interacciones PDZ-PL, se reconocerá que también pueden utilizarse agonistas de la interacción PDZ-PL en los métodos descritos en esta memoria.

En un aspecto, los péptidos y peptidomiméticos o análogos contienen una secuencia de aminoácidos que se fija a un dominio PDZ en las células hematopoyéticas tales como células T y células B, o inhibe de otro modo la asociación de las proteínas PL y proteínas PDZ. En una realización, los antagonistas comprenden un péptido que tiene una secuencia correspondiente a la secuencia carboxi-terminal de una proteína PL enumerada en la **TABLA 2**, v.g., un péptido enumerado en la **TABLA 4**. Típicamente, el péptido comprende al menos los cuatro (4) residuos C-terminales de la proteína PL, y a menudo el péptido inhibidor comprende más de cuatro residuos (v.g., al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, doce o quince residuos) del término C de la proteína PL. Véase, v.g., la sección 6.5.1, más adelante. Además, los dominios C-terminales de receptores específicos de la superficie expresados por el sistema hematopoyético y las células endoteliales pueden utilizarse en sí mismos como inhibidores, y pueden utilizarse como la base para el diseño racional de inhibidores no peptídicos. Véase la sección 6.6, más adelante.

En algunos aspectos, el antagonista es una proteína de fusión que comprende una secuencia de este tipo. Las proteínas de fusión que contienen una secuencia de aminoácidos transmembranales transportadores son particularmente útiles. Véase, v.g. la sección 6.5.2, más adelante.

En algunos aspectos, el inhibidor es una variante conservada de la secuencia de proteínas C-terminales PL que tiene actividad inhibidora. (Véase, v.g. la sección 6.5.3, más adelante).

En algunos aspectos, el antagonista es un peptidomimético de una secuencia C-terminal de PL. Véase, v.g. la sección 6.5.4, más adelante.

45 En algunos aspectos, el inhibidor es una molécula pequeña (es decir, que tiene un peso molecular menor de 1 kD). Véase, v.g. la sección 6.5.5, más adelante.

6.5.1 Antagonistas de Péptidos

En un aspecto, los antagonistas comprenden un péptido que tiene una secuencia de un término carboxi de proteína PL enumerado en la **TABLA 2**. El péptido comprende al menos los dos (2) residuos C-terminales de la proteína PL, y típicamente, el péptido inhibidor comprende más de dos residuos (v.g. al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, doce o quince residuos), del término C de la proteína PL. En la mayoría de los casos, los residuos compartidos con el péptido inhibidor con la proteína PL se encuentran en el término C del péptido. Sin embargo, en algunos aspectos, la secuencia es interna. Análogamente, en algunos casos, el péptido inhibidor comprende residuos de una secuencia PL que está cerca del término C, pero no en el propio término C de una proteína PL (véase, Gee et al., 1998, J. Biological Chem. 273: 21980-87).

Por ejemplo, la "secuencia core del motivo de fijación del dominio PDZ" de un receptor de superficie de las células hematopoyéticas a su término C contiene los cuatro últimos aminoácidos, pudiendo utilizarse esta secuencia para dirigir dominios PDZ en células hematopoyéticas. El núcleo de cuatro aminoácidos de una secuencia motivo de fijación del dominio PDZ puede contener aminoácidos adicionales en su término amino para aumentar 5 adicionalmente su afinidad de fijación y/o estabilidad. En una realización, el péptido de la secuencia del motivo de fijación del dominio PDZ puede ser desde cuatro aminoácidos hasta 15 aminoácidos. Se prefiere que la longitud de la secuencia sea 6-10 aminoácidos. Más preferiblemente, la secuencia del motivo de fijación del dominio PDZ contiene 10 8 aminoácidos. Aminoácidos adicionales en el extremo del terminal amino de la secuencia core pueden derivarse de la secuencia natural en cada receptor de superficie de las células hematopoyéticas o un enlazador sintético. Los aminoácidos adicionales pueden estar también sustituidos de manera conservadora. Cuando el tercer residuo del término C es S, T o Y, este residuo puede estar fosforilado antes del uso del péptido.

En algunos aspectos, los inhibidores peptídicos y no peptídicos del ... son pequeños, v.g., tienen menos de 10 15 residuos de aminoácidos de longitud si se trata de un péptido. Adicionalmente, se ha informado que un número limitado de aminoácidos ligandos están directamente en contacto con el dominio PDZ (generalmente menos de 8) (Kozlov et al., 2000, *Biochemistry* 39, 2572; Doyle et al., 1996, *Cell* 85, 1067) y que péptidos tan cortos como los 3 aminoácidos del terminal C retienen a menudo propiedades de fijación similares a péptidos más largos (> 15 aminoácidos) (Yanagisawa et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272, 8539).

Las **FIGURAS 3A-H** muestran el uso de péptidos para inhibir las interacciones PL-PDZ utilizando el ensayo G arriba descrito. En las **FIGURAS 3A y B**, los ensayos de inhibición se llevaron a cabo utilizando proteínas de fusión GST 20 que contenían dominios PDZ de DLG1 o PSD95 (véase arriba y la **TABLA 3**). La fijación de péptidos PL biotinilados para Clasp2, CD46, Fas, o KV1.3 (como se enumera en la **TABLA 4**) se determinó en presencia de diversos péptidos competidores (a una concentración de 100 μ M) o en ausencia de un competidor (igualada a fijación 100%). Los péptidos competidores eran péptidos 8-meros que tenían la secuencia del término C de Clasp2 (MTSSSSVV), 25 CD46 (REVKFTSL), o Fas (RNEIQSLV), un 19-mero sin marcar que tenía la secuencia del término C de KV1.3 (es decir, AA33L no biotinilado como se enumera en la **TABLA 3**), o un péptido que tenía la secuencia de los residuos 64-76 de la hemoglobina (Vidal et al., 1999, *J. Immunol.* 163, 4811), es decir un competidor no emparentado. La fijación del péptido biotinilado (10 μ M para Fas y KV1.3, 20 μ M para Clasp2 y CD46) a GST sola se sustraio de la fijación a las proteínas de fusión para obtener la señal neta para cada condición experimental. Esta señal neta se normalizó luego dividiendo por la señal en ausencia de péptido competidor, y los datos se representaron 30 gráficamente. Las barras de error indicaban la desviación estándar de las medidas duplicadas. Se observaba la inhibición específica de la fijación de Clasp2 PL-DLG PDZ con el Clasp-2 8-mero, el CD46 8-mero, el Fas-8-mero y el péptido KV13, pero no en ausencia de péptido o utilizando un péptido no emparentado.

Las **FIGURAS 3C-F** muestran ensayos similares que utilizan péptidos más cortos para la inhibición (v.g., un 3-mero y un 5-mero). Las **FIGURAS 3C-E** muestran la fijación de péptidos PL biotinilados para Clasp-2, CD46, Fas, o KV1.3, a la concentración indicada (como se enumera en la **TABLA 3**) a proteínas de fusión GST que contienen 35 dominios PDZ de NeDLG, DLG1 o PSD95 en ausencia o presencia de un péptido 1 mM 3-mero que tiene la secuencia del término C de Clasp-2 (SVV). (Tabla 3). La **FIGURA 3F** muestra el efecto sobre la fijación de un péptido CD49E 5-mero (**ATSDA**) a proteínas de fusión GST que contienen un dominio PDZ de 41,8 kD.

6.5.2 Variantes Peptídicas

40 Habiendo identificado péptidos de fijación PDZ y secuencias inhibidoras de la interacción PDZ-PL, pueden hacerse variaciones de estas secuencias y las variantes de péptidos resultantes pueden ensayarse respecto a la fijación del dominio PDZ o actividad inhibidora de PDZ-PL. En aspectos adicionales, las variantes tienen la misma o diferente capacidad de fijación de un dominio PDZ que el péptido parental. Típicamente, tales sustituciones de aminoácidos 45 son conservadoras, es decir, los residuos de aminoácidos se reemplazan con otros residuos de aminoácidos que tienen propiedades físicas y/o químicas similares a los residuos que reemplazan. Preferiblemente, sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquéllas en las cuales un aminoácido se reemplaza con otro aminoácido comprendido dentro de la misma clase designada.

6.5.3 Peptidomiméticos

50 Una vez identificados los péptidos de fijación de PDZ y las secuencias inhibidoras de la interacción PDZ-PL, pueden prepararse miméticos peptídicos utilizando métodos de rutina, y la actividad inhibidora de los miméticos puede confirmarse utilizando los ensayos de la invención. Así pues, en algunos aspectos adicionales, el antagonista es un mimético peptídico de una secuencia del terminal C de PL. El profesional experto reconocerá que los residuos y polipéptidos de síntesis individuales que incorporan miméticos pueden sinterizarse utilizando una diversidad de procedimientos y metodologías, todos los cuales están bien descritos en la literatura científica y de patentes, v.g., 55 Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman et al. (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY. Pueden producirse también polipéptidos que incorporan miméticos utilizando procedimientos de síntesis en fase sólida, como se describe, v.g. por Di Marchi, et al., Patente U.S. Núm. 5.422.426. Los miméticos pueden sintetizarse también utilizando metodologías combinatorias. Diversas técnicas para generación de bibliotecas de péptidos y peptidomiméticos son bien conocida, e incluyen, v.g., las técnicas Multipin, de bolsa de té, y la técnica mixta división-acoplamiento; véase, v.g., Al-Obeidi (1998) *Mol. Biotechnol.* 9:205-223; Hruby (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:114-60

119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234.

6.5.4 Moléculas Pequeñas

En algunos aspectos, el inhibidor es una molécula pequeña (es decir, que tiene un peso molecular menor que 1 kD). Métodos para cribado de moléculas pequeñas son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos anteriormente en la sección 6.4.

6.6. Receptores de Superficie Celular y Secuencias de Fijación del Dominio PDZ

Las secciones siguientes describen receptores específicos de superficie expresados por diferentes tipos de células en el sistema hematopoyético y la respuesta inmune. Los términos C de estos receptores se utilizan como inhibidores, o sirven como la base para el diseño de péptidos de secuencias motivo de fijación de dominio PDZ, variantes, proteínas de fusión, peptidomiméticos, y moléculas pequeñas para uso en la inhibición de las interacciones PDZ-PL. En un aspecto preferido, los péptidos se ensayoan en un ensayo para actividad inhibidora o moduladora (véase también, **TABLA 4**, y la discusión anterior).

6.6.1 Secuencias del Motivo de Fijación del Dominio PDZ de Receptores de Superficie de las Células T

Cierto número de receptores de superficie expresados por las células T contienen una secuencia motivos de fijación del dominio PDZ (secuencia PL). Estas moléculas incluyen CD3 γ , CD4, CD6, CD38, CD49e, CD49f, CD53, CD83, CD90, CD95, CD97, CD98, CDw137 (41BB), CD166, CDw128 (IL8 R), DNAM-1, ligando Fas (FasL) y LPAP (Barclay et al., 1997, The Leucocyte Antigen Facts Book, segunda edición, Academic Press), CLASP-1, CLASP-2, CLASP-4, KV 1.3, y DOCK2.

La secuencia core C-terminal de CD3 es SSQL (SEQ ID NO: 4). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también SSSQL (SEQ ID NO:5), SSSSQL (SEQ ID NO:6), PSSSSQL (SEQ ID NO:7), y PPSSSSQL (SEQ ID NO:8) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en las células T.

La secuencia core C-terminal de CD4 es CSPI (SEQ ID NO: 9). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también TCSPI (SEQ ID NO:10), KTCSPI ; (SEQ ID NO:11), QKTCSPI (SEQ ID NO:12), y FQKTCSPI (SEQ ID NO:13) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD6 es ISAA (SEQ ID NO:14). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también DISAA (SEQ ID NO:15), DDISAA (SEQ ID NO:16), YDDISAA (SEQ ID NO:17), y DYDDISAA (SEQ ID NO:18) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD38 es TSEI (SEQ ID NO:19). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también CTSEI (SEQ ID NO:20), SCTSEI (SEQ ID NO:21), SSCTSEI (SEQ ID NO:22), y DSSCTSEI (SEQ ID NO:23) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD49e es TSDA (SEQ ID NO:24). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también ATSDA (SEQ ID NO:25), PATSDA (SEQ ID NO:26), PPATSDA (SEQ ID NO:27), y KPPATSDA (SEQ ID NO:28) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD49f es TSDA (SEQ ID NO:29). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también LTSDA (SEQ ID NO:30), RLTSDA (SEQ ID NO:31), ERLTSDA (SEQ ID NO:32), y

KERLTSDA (SEQ ID NO:33) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD53 es TIGL (SEQ ID NO:34). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también QTIGL (SEQ ID NO:35), SQTIGL (SEQ ID NO:36), TSQTIGL (SEQ ID NO:37), y KTSQTIGL (SEQ ID NO:38) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD83 es TELV (SEQ. ID. NO:248). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también KTELV (SEQ. ID. NO: 249), HKTELV (SEQ. ID. NO:250), PHKTELV (SEQ. ID. NO:251), y TPHKTELV (SEQ. ID. NO:252) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD90 es FMSL (SEQ ID NO:39). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también DFMSL (SEQ ID NO:40), TDFMSL (SEQ ID NO:41), ATDFMSL (SEQ ID NO:42), y QATDFMSL (SEQ ID NO:43) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD95 es QSLV (SEQ ID NO:44). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también IQSLV (SEQ ID NO:45), EIQLSV (SEQ ID NO:46), NEIQSLV (SEQ ID NO:47), y RNEIQSLV (SEQ ID NO:48) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD97 es ESGI (SEQ ID NO:49). Cuando se añaden a la secuencia core residuos

existentes naturalmente, se pueden utilizar también SESGI (SEQ ID NO:50), ASESGI (SEQ ID NO:51), RASESGI (SEQ ID NO:52), y LRASESGI (SEQ ID NO:53) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CD98 es PYAA (SEQ ID NO:54). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también FPYAA (SEQ ID NO:55), RFPYAA (SEQ ID NO:56), LRFPYAA (SEQ ID NO:57), y LLRFPYAA (SEQ ID NO:58) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CDw137 es GCEL (SEQ ID NO:59). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también GGCEL (SEQ ID NO:60), EGGCEL (SEQ ID NO:61), EEEGGCEL (SEQ ID NO:62), y EEEEGGCEL (SEQ ID NO:63) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

10 La secuencia core C-terminal de CD166 es KTEA (SEQ ID NO:64). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también HKTEA (SEQ ID NO:65), NHKTEA (SEQ ID NO:66), NNNHKTEA (SEQ ID NO:67), y ENNHKTEA (SEQ ID NO:68) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

15 La secuencia core C-terminal de CDw128 es SSNL (SEQ ID NO:69). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también VSSNL (SEQ ID NO:70), NVSSNL (SEQ ID NO:71), VNVSSNL (SEQ ID NO:72), y SVNVSNL (SEQ ID NO:73) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

20 La secuencia core C-terminal de DNAM-1 es KTRV (SEQ ID NO:74). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también PKTRV (SEQ ID NO:75), RPKTRV (SEQ ID NO:76), RRPKTRV (SEQ ID NO:77), y SRRPKTRV (SEQ ID NO:78) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de FasL es LYKL (SEQ ID NO:79). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también GLYKL (SEQ ID NO:80), FGLYKL (SEQ ID NO:81), FFGLYKL (SEQ ID NO:82), y TFFGLYKL (SEQ ID NO:83) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

25 La secuencia core C-terminal de LPAP es VTAL (SEQ ID NO:84). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también HVTAL (SEQ ID NO:85), LHVTAL (SEQ ID NO:86), GLHVTAL (SEQ ID NO:87), y QGLHVTAL (SEQ ID NO:88) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

30 La secuencia core C-terminal de CLASP-1 es SAQV (SEQ. ID. NO:218). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también SSAQV (SEQ. ID. NO: 219), SSSAQV (SEQ. ID. NO:220), ISSSAQV (SEQ. ID. NO: 221), y SISSSAQV (SEQ. ID. NO:222) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

35 La secuencia core C-terminal de CLASP-2 es SSVV (SEQ. ID. NO:223). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también SSSVV (SEQ. ID. NO: 224), SSSSVV (SEQ. ID. NO:225), TSSSSVV (SEQ. ID. NO: 226), y MTSSSSVV (SEQ. ID. NO:227) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de CLASP-4 es YAEV (SEQ. ID. NO:228). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente RYAEV (SEQ. ID. NO: 229), PRYAEV (SEQ. ID. NO:230), SPRYAEV (SEQ. ID. NO:

40 231), y GSPRYAEV (SEQ. ID. NO:232) se pueden utilizar también para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de KV1.3 es FTDV (SEQ. ID. NO:238). Cuando se añaden a la secuencia core residuos existentes naturalmente, se pueden utilizar también IFTDV (SEQ. ID. NO:239), KIFTDV (SEQ. ID. NO:240), KKIFTDV (SEQ. ID. NO:241), y IKKIFTDV (SEQ. ID. NO: 242) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

La secuencia core C-terminal de DOCK2 es STDL (SEQ. ID. NO:243). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también LSTDL (SEQ. ID. NO:244), SLSTDL (SEQ. ID. NO:245), DSLSTDL (SEQ. ID. NO:246), y PDSLSTDL (SEQ. ID. NO:247) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células T.

50 6.6.2 Secuencias del Motivo de Fijación del Dominio PDZ de Receptores de Superficie de las Células B

Cierto número de receptores de superficie expresados por células B contienen una secuencia motivo de dominio PDZ. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, CD38, CD53, CD95, CD97, CD98, CDw137, CD138, CDw125 (IL5R), DNAM-1, LPAP, Syndecan-2 (Barclay et al., 1997, The Leucocyte Antigen Facts Book, segunda edición, Academic Press) y BLR-1. Las secuencias motivo específicas de CD38, CD53, CD83, CD95, CD97, CD98, CDw137, DNA-1, DOCK2, LPAP, CLASP-1, CLASP-2 y CLASP-4 se han descrito en los párrafos anteriores.

La secuencia core C-terminal de CD138 es EFYA (SEQ ID NO:89). Cuando se añaden residuos existentes

naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también EEFYA (SEQ ID NO:90), QEEFYA (SEQ ID NO:91), KQEEFYA (SEQ ID NO:92), y TKQEEFYA (SEQ ID NO:93) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células B.

5 La secuencia core C-terminal de CDw125 es DSVF (SEQ ID NO:94). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también EDSVF (SEQ ID NO:95), LEDSVF (SEQ ID NO:96), TLEDSVF (SEQ ID NO:97), y ETLEDSVF (SEQ ID NO:98) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células B.

10 La secuencia core C-terminal de Syndecan-2 es EFYA (SEQ. ID. NO:258). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también KEFYA (SEQ. ID. NO: 259), TKEFYA (SEQ. ID. NO:260), PTKEFYA (SEQ. ID. NO: 261), y APTKEFYA (SEQ. ID. NO:262) PDZ para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células B.

15 La secuencia core C-terminal de BLR-1 es LTTF (SEQ. ID. NO: 253). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también SLTTF (SEQ. ID. NO: 254), TSLTTF (SEQ. ID. NO: 255), ATSLTTF (SEQ. ID. NO: 256), y NATSLTTF (SEQ. ID. NO: 257) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células B.

6.6.3 Secuencias Motivo de Fijación de Receptores de Superficie de las Células Agresoras Naturales

Cierto número de receptores de superficie expresados por células NK contienen una secuencia motivo de dominio PDZ. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, CD38, CD56, CD98 y DNAM-1. Las secuencias motivo específicas de CD38, CD98 y DNAM-1 se han descrito en los párrafos anteriores.

20 La secuencia core C-terminal de CD56 es ESKA (SEQ ID NO:99). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también NESKA (SEQ ID NO:100), ENESKA (SEQ ID NO:101), KENESKA (SEQ ID NO:102), and TKE-NESKA (SEQ ID NO:103) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en las células NK.

6.6.4 Secuencias Motivo de Fijación del Dominio PDZ de Receptores de Superficie de los Monocitos

25 Ciertas células del linaje monocítico (monocitos y macrófagos) contienen una secuencia motivo del dominio PDZ. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, CD38, CD44, CD46, CD49e, CD49f, CD53, CD61, CD95, CD97, CD98, CD148, CDw128, CDw137, Ly-6, DNAM-1 y Fc ϵ RI β . Las secuencias motivo específicas de CD38, CD49e, CD49f, CD53, CD95, CD97, CD98, CDw128, CDw137, DNAM-1, Galectin 3 (Mac-2) y del receptor de manosa se han descrito en los párrafos anteriores.

30 La secuencia core C-terminal de CD44 es KIGV (SEQ ID NO: 104). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también MKIGV (SEQ ID NO:105), DMKIGV (SEQ ID NO:106), VDMKIGV (SEQ ID NO:107) y NVDMKIGV (SEQ ID NO:108) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

35 La secuencia core C-terminal de CD46 es FTSL (SEQ ID NO:109). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también KFTSL (SEQ ID NO:110), VKFTSL (SEQ ID NO:111), EVKFTSL (SEQ ID NO:112) y REVKFTSL (SEQ ID NO:113) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

40 La secuencia core C-terminal de CD61 es KSLV (SEQ ID NO:114). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también LKSLV (SEQ ID NO:115), FLKSLV (SEQ ID NO:116), RFLKSLV (SEQ ID NO:117) y GRFLKSLV (SEQ ID NO:118) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

45 La secuencia core C-terminal de CD148 es GYIA (SEQ ID NO:119). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también NGYIA (SEQ ID NO:120), TNGYIA (SEQ ID NO:121), KTNGYIA (SEQ ID NO:122) y GKTNGYIA (SEQ ID NO:123) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

La secuencia core C-terminal de Ly-6 es QTLL (SEQ ID NO:124). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también LQTLL (SEQ ID NO:125), LLQTL (SEQ ID NO:126), VLLQTL (SEQ ID NO:127) y SVLLQTL (SEQ ID NO:128) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

50 La secuencia core C-terminal de Fc ϵ RI β es PIDL (SEQ ID NO:129). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también PPIDL (SEQ ID NO:130), SPPIDL (SEQ ID NO:131), MSPPIDL (SEQ ID NO:132) y EMSPPIDL (SEQ ID NO:133) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

55 La secuencia core C-terminal de Galectina 3 es YTMI (SEQ ID NO:134). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también SYTMI (SEQ ID NO:135), ASYTMI (SEQ ID NO:136), SASYTMI (SEQ ID NO:137) y TSASYTMI (SEQ ID NO:138) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ

en monocitos.

La secuencia core C-terminal del receptor de manosa es HSVI (SEQ ID NO:139). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también EHSV1 (SEQ ID NO:140), NEHSV1 (SEQ ID NO:141), QNEHSV1 (SEQ ID NO:142) y EQNEHSV1 (SEQ ID NO:143) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en monocitos.

5 6.6.5. Secuencias Motivo de Fijación del Dominio PDZ de Receptores de Superficie de los Granulocitos

Cierto número de receptores de superficie expresados por granulocitos contienen una secuencia motivo del dominio PDZ. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, CD53, CD95, CD97, CD98, CD148, CDw125, CDw128, Fc ϵ RI β y G-CSFR. Las secuencias específicas de motivo de la mayoría de estas moléculas han sido descritas en 10 los párrafos anteriores.

La secuencia core C-terminal de G-CSFR es TSVL (SEQ ID NO:144). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también ITSVL (SEQ ID NO:145), PITSVL (SEQ ID NO:146), FPITSVL (SEQ ID NO:147) y LFPITSVL (SEQ ID NO:148) para direccionar una proteína que contiene el dominio PDZ en monocitos.

15 6.6.6 Secuencias Motivo de Fijación del Dominio PDZ de Receptores de Superficie de las Células Endoteliales

Si bien las células endoteliales no son células hematopoyéticas, las mismas interaccionan íntimamente con el sistema hematopoyético dado que forman el revestimiento de los vasos sanguíneos. Como tales, las células endoteliales entran en contacto con las células del sistema hematopoyético. Así, la capacidad para regular la función de las células endoteliales proporciona una regulación indirecta de las células hematopoyéticas.

20 20 Cierto número de receptores de superficie expresados por células endoteliales contienen una secuencia motivo del dominio PDZ. Estas moléculas incluyen, pero sin carácter limitante, CD34, CD46, CD66b, CD66c, CD105, CD106, CD62e (selectina E) y VCAM1.

La secuencia core del terminal C de CD34 es DTEL (SEQ ID NO: 149). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también ADTEL (SEQ ID NO: 150), VADTEL (SEQ ID NO: 151), VVADTEL (SEQ ID NO: 152) y HVVADTEL (SEQ ID NO: 153) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células endoteliales.

25 30 La secuencia core C-terminal de CD66b y CD66c es VALI (SEQ ID NO: 154). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también RVALI (SEQ ID NO:155), ARVALI (SEQ ID NO:156), LARVALI (SEQ ID NO: 157) y VLARVALI (SEQ ID NO:158) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células endoteliales.

La secuencia core C-terminal de CD105 es SSMA (SEQ ID NO:159). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también TSSMA (SEQ ID NO:160), STSSMA (SEQ ID NO:161), CSTSSMA (SEQ ID NO:162) y PCSTSSMA (SEQ ID NO: 162) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células endoteliales.

35 35 La secuencia core C-terminal de CD106 es KSKV (SEQ ID NO:163). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también QKSKV (SEQ ID NO:164), AQKSKV (SEQ ID NO:165), EAQKSKV (SEQ ID NO:166) y VEAQKSKV (SEQ ID NO:167) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células endoteliales.

40 40 La secuencia core C-terminal de CD62e es SYIL (SEQ ID NO:168). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también PSYIL (SEQ ID NO:169), KPSYIL (SEQ ID NO:170), QKPSYIL (SEQ ID NO:171) y YQKPSYIL (SEQ ID NO:172) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células endoteliales.

45 45 La secuencia core C-terminal de VCAM1 es KSKV (SEQ. ID. NO:233). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, pueden utilizarse también QKSKV (SEQ. ID. NO:234), AQKSKV (SEQ. ID. NO:235), EAQKSKV (SEQ. ID. NO:236), y VEAQKSKV (SEQ. ID. NO:237) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en células endoteliales.

6.6.7 Receptores de la Superficie Celular de Mastocitos, Basófilos y Eosinófilos

Fc ϵ RI β , CDw125, CDw128 e IL-8RB son receptores transmembranales expresados por mastocitos, basófilos y eosinófilos. Estos receptores juegan un papel en la activación de dichas células dando como resultado desgranulación y liberación de histamina en las reacciones alérgicas. La secuencia core C-terminal de Fc ϵ RI β es PIDL (SEQ ID NO: 4). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también PPIDL (SEQ ID NO: 5), SPPIDL (SEQ ID NO: 6), MSPPIDL (SEQ ID NO:7) y EMSPPIDL (SEQ ID NO: 8) para direccionar una proteína que contiene dominio PDZ en mastocitos. Adicionalmente, el residuo E puede sustituirse con G para aumentar su afinidad de fijación.

La secuencia core C-terminal de CDw125 es DSVF (SEQ ID NO:9). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también EDSVF (SEQ ID NO:10), LEDSVF (SEQ ID NO:11), TLEDSVF (SEQ ID NO:12), y ETLEDSVF (SEQ ID NO:13) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en mastocitos.

5 La secuencia core C-terminal de CDw128 es SSNL (SEQ ID NO:14). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también VSSNL (SEQ ID NO:15), NVSSNL (SEQ ID NO:16), VNVSSNL (SEQ ID NO:17), y SVNVSNL (SEQ ID NO:18) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en mastocitos.

10 La secuencia core C-terminal de IL-8RB es STTL (SEQ ID NO:19). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también TSTTL (SEQ ID NO:20), HTSTTL (SEQ ID NO:21), GHSTTTL (SEQ ID NO:22) y SGHT-STTL (SEQ ID NO:23) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en mastocitos.

6.6.8. Otras Secuencias Motivo de Fijación del Dominio PDZ

15 La secuencia core C-terminal de NMDA es ESDV (SEQ ID NO: 263). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también IESDV (SEQ. ID. NO:264), SIESDV (SEQ. ID. NO:265), PSLESDV (SEQ. ID. NO:266), y MPSIESDV (SEQ. ID. NO: 267) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células neuronales.

20 La secuencia core C-terminal de neurexina es EYYV (SEQ. ID. NO:268). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también KEYYV (SEQ. ID. NO: 269), DKEYYV (SEQ. ID. NO:270), KDKKEYYV (SEQ. ID. NO:271), y NDKKEYYV (SEQ. ID. NO:272) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células neuronales.

25 La secuencia core C-terminal de glicoforina C es EYFI (SEQ. ID. NO:273). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, se pueden utilizar también KEYFI (SEQ. ID. NO: 274), RKEYFI (SEQ. ID. NO:275), SRKEYFI (SEQ. ID. NO:276), y SSRKEYFI (SEQ. ID. NO:277) para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ.

30 La secuencia core C-terminal de CD148 es KTIA (SEQ. ID. NO:278). Cuando se añaden residuos existentes naturalmente a la secuencia core, GKTIA (SEQ. ID. NO:279), FGKTI (SEQ. ID. NO:280), TFGKTI (SEQ. ID. NO:281), and TTFGKTI (SEQ. ID. NO: 282) se pueden utilizar también para dirigir una proteína que contiene dominio PDZ en células epiteliales o mieloides.

6.7. Preparación de Péptidos

6.7.1. Síntesis Química

35 Los péptidos de la invención o análogos de los mismos se pueden preparar utilizando virtualmente cualquier método conocido en la técnica para la preparación de péptidos y análogos de péptidos. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar en forma lineal utilizando síntesis convencionales de péptidos en solución o en fase sólida y escindirse de la resina seguido por procedimientos de purificación (Creighton, 1983, Protein Structures y Molecular Principles, W.H. Freeman y Co., N.Y.). Procedimientos adecuados para la síntesis de los péptidos descritos en esta memoria son bien conocidos en la técnica. La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (v.g., el procedimiento de degradación de Edman y espectroscopia de masas).

40 Adicionalmente, pueden sintetizarse químicamente análogos y derivados de los péptidos. El enlace entre cada aminoácido de los péptidos de la invención puede ser una amida, una amida sustituida o un isósteros de amida. Aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos pueden introducirse como sustitución o adición en la secuencia. Aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin carácter limitante, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -amino-isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteíco, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β -metil-aminoácidos, α -metilaminoácidos, α -metilaminoácidos, y análogos de aminoácidos en general. Adicionalmente, el aminoácido puede ser D (dextrorrotatorio) o L (levorrotatorio).

6.7.2. Síntesis Recombinante

50 Si el péptido está compuesto enteramente de aminoácidos codificados por genes, o una porción del mismo está compuesta de este modo, el péptido o la porción relevante puede sintetizarse también utilizando técnicas convencionales de ingeniería genética recombinante. Para la producción recombinante, una secuencia de nucleótidos que codifica una forma lineal del péptido se inserta en un vehículo de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector viral de RNA, los elementos necesarios para replicación y traducción. El vehículo de expresión se transfecta en una célula diana adecuada que expresará el péptido. Dependiendo del sistema de expresión utilizado, el péptido expresado se aisla luego por procedimientos bien establecidos en la

técnica. Métodos para producción recombinante de proteínas y péptidos son bien conocidos en la técnica (véase, v.g., Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y.).

Pueden utilizarse una diversidad de sistemas vectores de expresión de hospedador para expresar los péptidos descritos en esta memoria. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias transformadas con DNA recombinante de bacteriófago o vectores de expresión de DNA plasmídico que contienen una secuencia codificante apropiada; levaduras u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión recombinantes de levaduras u hongos que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión recombinantes de virus (v.g., baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión recombinantes de virus (v.g., el virus del mosaico de la coliflor o el virus del mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión recombinantes de plásmidos (v.g., el plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante; o sistemas de células animales.

Los elementos de expresión de los sistemas de expresión varían en su robustez y sus especificidades. Dependiendo del sistema hospedador/vector utilizado, cualquiera de cierto número de elementos adecuados de transcripción y traducción, que incluyen promotores constitutivos e inducibles, pueden utilizarse en el vector de expresión. Por ejemplo, cuando la clonación se realiza en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y análogos; cuando se realiza la clonación en sistemas de células de insecto, pueden utilizarse promotores tales como el promotor polihedrón de baculovirus; cuando la clonación se efectúa en sistemas de células vegetales, se pueden utilizar promotores derivados del genoma de células vegetales (v.g., promotores del choque térmico; el promotor para la subunidad pequeña de RUBISCO; el promotor para la proteína de fijación de clorofila a/b) o de virus de plantas (v.g., el promotor de RNA 35S de CaMV; el promotor de la proteína de la cubierta de TMV); cuando la clonación se realiza en sistemas de células de mamífero, se pueden utilizar promotores derivados del genoma de células de mamífero (v.g., el promotor metalotioneína) o de virus de mamífero (v.g., el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus Vaccinia); cuando se generan líneas de células que contienen copias múltiples del producto de expresión, se pueden utilizar vectores basados en SV40, BPV y EBV con un marcador seleccionable adecuado.

En los casos en que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de las secuencias que codifican los péptidos de la invención puede impulsarse por cualquiera de cierto número de promotores. Por ejemplo, pueden utilizarse promotores virales tales como los promotores 35S RNA y 19S RNS de CaMV (Brisson et al., 1984, *Nature* 310: 511-514), o el promotor de la proteína de la cubierta de TMV (Takamatsu et al., 1987, *EMBO J.* 6: 307-311); alternativamente, se pueden utilizar promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO (Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.* 3: 1671-1680; Broglie et al., 1984, *Science* 224: 838-843) o promotores del choque térmico, v.g., hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja (Gurley et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565). Estos constructos pueden introducirse en 'planleucocitos' utilizando plásmidos Ti, plásmidos Ri, vectores de virus de plantas, transformación directa de DNA, microinyección, electroporación, etc. Para revisiones de tales técnicas véase, v.g., Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, pp. 421-463; y Grierson & Corey, 1988, *Plant Molecular Biology*, 2^a edición, Blackie, Londres, cap. 7-9.

En un sistema de expresión de insecto que puede utilizarse para producir los péptidos de la invención, se utiliza el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar los genes extraños. El virus se deja crecer en células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificante puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo en el gen de la polihedrina) del virus y ponerse bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). La inserción satisfactoria de una secuencia codificante dará como resultado la desactivación del gen de la polihedrina y la producción de virus recombinante no ocluido (es decir, virus que carece de la cubierta proteinácea codificada por el gen de la polihedrina). Estos virus recombinantes se utilizan luego para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las cuales se expresa el gen insertado; (v.g., véase Smith et al., 1983, *J. Virol.* 46: 584 Smith, Patente U.S. Núm. 4.215.051). Ejemplos adicionales de este sistema de expresión puede encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ausubel et al., editores., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

En células hospedadoras de mamífero, se pueden utilizar cierto número de sistemas de expresión basados en virus. En casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, una secuencia codificante puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, v.g. el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen químerico puede insertarse luego en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (v.g., la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el péptido en hospedadores infectados (v.g., véase Logan & Shenk, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3655-3659). Alternativamente, puede utilizarse el promotor 7,5K de Vaccinia (véase, v.g., Mackett et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7415-7419; Mackett et al., 1984, *J. Virol.* 49: 857-864; Panicali et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4927-4931).

Otros sistemas de expresión para producir péptidos lineales de la invención serán evidentes para quienes poseen experiencia en la técnica.

6.7.3 Purificación de los Péptidos y Análogos Peptídicos

Los péptidos y análogos de péptidos de la invención pueden purificarse por métodos conocidos en la técnica tales como cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad y análogos. Las condiciones reales utilizadas para purificar un péptido o análogo particular

5 dependerán, en parte, de factores tales como carga neta, hidrofobicidad, hidrofilia, etc., y serán evidentes para quienes poseen experiencia en la técnica. Los péptidos purificados pueden identificarse por ensayos basados en sus propiedades físicas o funcionales, con inclusión de la marcación radiactiva seguida por electroforesis en gel, radioinmunoensayos, ELISA, bioensayos, y análogos.

Para purificación por cromatografía de afinidad, puede utilizarse cualquier anticuerpo que se fije específicamente a 10 los péptidos o análogos peptídicos. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores, con inclusión pero sin carácter limitante de conejos, ratones, ratas, etc., por inyección con un péptido. El péptido puede unirse a un portador adecuado, tal como BSA o KLH, por medio de un grupo funcional de cadena lateral o enlazadores unidos a un grupo funcional de la cadena lateral. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, con inclusión pero sin carácter limitante de Freund's (completo o incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa bocallave, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilos Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

20 Anticuerpos monoclonales para un péptido se pueden preparar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas de células continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497, la técnica del hibridoma de las células B humanas, Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030 y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)). Adicionalmente, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos químicos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) por remodelación de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Alternativamente, se pueden adaptar técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente U.S. Núm. 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios con 30 especificidad de péptido.

35 Fragmentos de anticuerpo que contienen delecciones de sitios de fijación específica pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin carácter limitante, fragmentos F(ab')₂, que se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y fragmentos Fab, que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión (Huse et al., 1989, *Science* 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para el péptido de interés.

40 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para el péptido deseado puede estar unido, por ejemplo, a agarosa, y el complejo anticuerpo-agarosa se utiliza en inmuno Cromatografía para purificar péptidos de la invención. Véase, Scopes, 1984, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York, Inc., NY, Livingstone, 1974, *Methods Enzymology: Immunoaffinity Chromatography of Proteins* 34:723-731.

6.8. Usos de Compuestos de Fijación y Antagonistas de Dominio PDZ

En un aspecto de la invención, los compuestos de fijación e inhibidores PDZ-PL del dominio PDZ de la presente invención son útiles en la regulación de diversas actividades de las células hematopoyéticas (v.g., células T y células B) y otras células implicadas en la respuesta inmune.

45 En un aspecto de la descripción, los compuestos se utilizan para inhibir la activación de los leucocitos, que se manifiesta en eventos medibles que incluyen, pero sin carácter limitante, producción de citoquinas, adhesión de células, expansión de números de células, apoptosis y citotoxicidad. Como corolario, los compuestos se pueden utilizar para tratar diversas afecciones asociadas con activación indeseable de los leucocitos, con inclusión pero sin carácter limitante de inflamación aguda y crónica, enfermedad de rechazo inverso, rechazo de trasplantes, 50 hipersensibilidades y autoinmunidad tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad periodontal, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus juvenil, diabetes no dependiente de insulina, y alergias, y otras afecciones indicadas en esta memoria (véase, v.g., la Sección 6.4, arriba).

55 Así pues, un aspecto de la descripción se refiere también a métodos de utilización en tales composiciones en la modulación de la activación de los leucocitos tal como se mide, por ejemplo, por citotoxicidad, producción de citoquinas, proliferación celular, y apoptosis. Ensayos para activación son bien conocidos. Por ejemplo, los antagonistas de la interacción PDZ/PL pueden evaluarse como sigue: (1) los linfocitos T citotóxicos pueden incubarse con células diana marcadas radiactivamente y la lisis específica del antígeno de estas células diana puede detectarse por la liberación de radioactividad, (2) los linfocitos T adyuvantes pueden incubarse con antígenos y células presentadoras de antígeno, y la síntesis y secreción de citoquinas puede medirse por métodos estándar

(Windhagen A, et al., 1995, *Immunity* 2 (4): 373-80), (3) las células presentadoras de antígeno se pueden incubar con antígeno entero de proteínas y la presentación de dicho antígeno en MHC puede detectarse por ensayos de activación de los linfocitos T o por métodos biofísicos (Harding et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 4230-4), (4) los mastocitos pueden incubarse con reactivos que reticulan sus receptores Fc-épsilon y la liberación de histamina medirse por inmunoensayo enzimático (Siraganian, et al., 1983, *TIPS* 4:432-437).

5 Análogamente, el efecto de los antagonistas de la interacción PDZ/PL sobre los productos de la activación de los leucocitos en un organismo modelo (v.g., ratón) o un paciente humano puede evaluarse también por diversos métodos que son bien conocidos. Por ejemplo, (1) la producción de anticuerpos en respuesta a la vacunación puede detectarse fácilmente por métodos estándar utilizados corrientemente en los laboratorios clínicos, v.g., un ELISA; (2)

10 10 la migración de células inmunes a sitios de inflamación puede detectarse por raspado de la superficie de la piel y colocación de un recipiente estéril para capturar las células que migran en el sitio de raspado (Peters et al., 1988, *Blood* 72: 1310-5); (3) la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en respuesta a mitógenos o reacción de linfocitos mixtos puede medirse utilizando ³H-timidina; (4) la capacidad fagocítica de granulocitos, macrófagos, y otros fagocitos en PBMCs puede medirse por ubicación de PBMCs en pocillos junto con partículas marcadas (Peters et al., 1988); y (5) la diferenciación de células del sistema inmunitario puede medirse por marcación de PBMCs con anticuerpos para moléculas CD tales como CD4 y CDE8 y medida de la fracción de los PBMCs que expresan estos marcadores.

15 20 En un ensayo ilustrativo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana, clones de células T humanas (v.g., Jurkat E6, ATCC TIB-152), clones de células B transformadas por EBV (v.g., 9D10, ATCC CRL-8752), clones o líneas de células T específicas de antígeno pueden utilizarse para examinar antagonistas de la interacción PDZ/PL in vitro. La inhibición de la activación de estas células o líneas de células puede utilizarse para la evaluación de antagonistas potenciales de la interacción PDZ/PL.

25 Métodos estándar por los cuales se estimulan las células hematopoyéticas para sufrir la activación característica de una respuesta inmune son, por ejemplo,

30 35 A) Estimulación específica de antígeno de respuestas inmunes. Pueden generarse esplenocitos de ratón pre-inmunizados o naïf por procedimientos estándar. Adicionalmente, clones e hibridomas de células T específicos de antígeno (v.g., específicos de MBP), y numerosas líneas de células de linfoma de células B (v.g., CH27), han sido caracterizados previamente y están disponibles para los ensayos descritos a continuación. Esplenocitos o células B específicos de antígeno pueden mezclarse con células T específicas de antígeno en presencia de antígeno para generar una respuesta inmune. Esto puede realizarse en presencia o ausencia de antagonistas de la interacción PDZ/PL para ensayar si los antagonistas de la interacción PDZ/PL modulan la respuesta inmune, más adelante.

40 45 B) Activación de células T inespecíficas. Los métodos siguientes pueden utilizarse para activar células T en ausencia de antígeno: 1) reticulación del receptor de células T (TCR) por adición de anticuerpos contra las moléculas de activación del receptor (v.g., TCR, CD3, o CD2) junto con anticuerpos contra moléculas co-estimulantes, por ejemplo anti-CD28; 2) activación de receptores de superficie de las células en una modalidad inespecífica utilizando lectinas tales como concanavalina A (con A) y fitohemaglutinina (PHA); 3) mimetización de la activación mediada por receptores de superficie celular utilizando agentes farmacológicos que activan la proteína-quinasa C (v.g., ésteres forbol) y aumento del Ca²⁺ citoplásmico (v.g., ionomicina).

50 55 C) Activación de células B inespecíficas: 1) Aplicación de anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como IgM, CD20 o CD21. 2) Pueden utilizarse también lipopolisacárido (LPS), ésteres forbol, ionóforos de calcio e ionomicina para evitar el disparo del receptor.

D) Reacción de linfocitos mixtos (MLR). La mezcladura de PBMC del donante con PBMC del receptor para activar los linfocitos por presentación de antígenos tisulares despareados, lo que ocurre en todos los casos excepto en gemelos idénticos.

E) Generación de un clon o línea de células T específico(a) que reconoce un antígeno particular. Un enfoque estándar consiste en generar células T específicas de la toxina del tétanos de un donante que ha sido potenciado recientemente con toxina del tétanos. Se utilizan células presentadoras de antígeno coincidentes en el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC-) y una fuente de toxina del tétanos para mantener especificidad de antígeno de la línea de células o el clon de células T (Lanzavecchia, A., et al., 1983, *Eur. J. Immun* 13: 733-738).

Cuantificación del Ensayo

Los ensayos arriba descritos pueden cuantificarse por una diversidad de métodos de cuantificación bien conocidos. Por ejemplo:

(A) Fosforilación de tirosina

La fosforilación de tirosina de proteínas de respuesta rápida tales como HS1, PLC-r, ZAP-76, y Vav es un evento bioquímico temprano que sigue a la activación de los leucocitos. Las proteínas fosforiladas en tirosina pueden detectarse por transferencia Western utilizando anticuerpos contra los residuos tirosina fosforilados. La fosforilación de tirosina de estas proteínas de respuesta rápida puede utilizarse como ensayo estándar para activación de los leucocitos (J. Biol. Chem., 1997, 272 (23): 14562-14570). Cualquier cambio en el patrón de fosforilación de estas proteínas o proteínas emparentadas cuando se generan respuestas inmunes en presencia de antagonistas potenciales de la interacción PDZ/PL es indicativa de un antagonista potencial de la interacción PDZ/PL.

(B) Flujo de Calcio Intracelular

La cinética de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} se mide a lo largo del tiempo después de estimulación de células precargadas con un tinte sensible al calcio. Después de la fijación de Ca^{2+} , el tinte indicador (v.g., Fluor-4 (Molecular Probes)), exhibe un aumento en el nivel de fluorescencia utilizando citometría de flujo, fluorometría en solución, y microscopía confocal. Cualquier cambio en el nivel o la sincronización del flujo de calcio cuando se generan respuestas inmunes en presencia de antagonistas de la interacción PDZ/PL es indicativo de una inhibición de esta respuesta.

(C) Regulación de Marcadores de Activación Temprana

La expresión/regulación aumentada y disminuida de los niveles de marcadores de la activación de los linfocitos tempranos tales como CD69, IL-2R, MHC clase II, B7 y TCR se miden comúnmente con anticuerpos marcados por fluorescencia utilizando citometría de flujo. Todos los anticuerpos están disponibles comercialmente. Cualquier cambio en los niveles de expresión de marcadores de activación de linfocitos cuando las respuestas inmunes se generan en presencia de los antagonistas de la interacción PDZ/PL es indicativa de una inhibición de esta respuesta.

(D) Liberación de Ácido/Actividad Metabólica Incrementadas

La activación de la mayoría de los caminos de transducción de señales conocidos desencadena aumentos de metabolitos ácidos. Este evento biológico reproducible se mide como la tasa de liberación de ácido utilizando un microfisiómetro (Molecular Devices), y se utiliza como un marcador de activación temprana cuando se compara el tratamiento de células con métodos terapéuticos biológicos potenciales (McConnell, H.M. et al., 1992, Science 257: 1906-1912 y McConnell, H.M., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 2750-2754). Cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en la liberación de ácido de la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), sugiere un efecto del antagonista de interacción PDZ/PL sobre la función biológica.

(E) Ensayos de Proliferación Celular/Viabilidad Celular

(1) Incorporación de ^3H -timidina

La exposición de los linfocitos a antígeno o mitógeno *in vitro* induce síntesis de DNA y proliferación celular. La medida de la actividad mitótica por incorporación de ^3H -timidina en DNA recién sintetizado es uno de los ensayos utilizados más frecuentemente para activación cuantitativa de las células T. Dependiendo de la población de células y la forma de estimulación utilizada para activar las células T, puede medirse la actividad mitótica dentro de 24-72 horas *in vitro*, después de pulsos de ^3H -timidina (Mishell, B. B. y S. M. Shiigi, 1980, Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company y Dutton, R. W. y Pearce, J. D., 1962, Nature 194: 93). Cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en CPM de la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), sugiere un efecto del antagonista de la interacción PDZ/PL sobre la función biológica.

(2) MTS [5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil)-tetrazolio, sal interna] es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad (Barltrop, J.A. et al., 1991, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 1:611). 1-5 días después de la activación de los linfocitos, el compuesto MTS tetrazolio, reactivo de Owen, sufre reducción biológica por las células a un producto coloreado de formazano que es soluble en medio de cultivo de tejidos. La intensidad de color se lee a 490 nm menos 650 nm utilizando un lector de microplacas. Cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en intensidad de color de la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), puede sugerir un efecto del antagonista de la interacción PDZ/PL en la función biológica (Mosmann, T., 1983, J. Immunol. Methods 65:55 y Barltrop, J. A. et al., (1991)).

(3) La bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de timidina, se incorpora fácilmente en las células que sufren síntesis de DNA. Células pulsadas con BrdU se marcan con un anticuerpo anti-BrdU conjugado a una enzima (Gratzner, H.G., 1982, Science 218: 474-475). Se utiliza un sustrato colorimétrico soluble para visualizar las células proliferantes que han incorporado BrdU. La reacción se para con ácido sulfúrico y la placa se lee a

450 nm utilizando un lector de microplacas. Cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en la intensidad de color de la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), sugiere un efecto del antagonista de la interacción PDZ/PL sobre la función biológica.

5 (F) Apoptosis por Annexina V

La muerte celular programada o apoptosis es un evento temprano en una cascada de reacciones catabólicas que conducen a la muerte celular. Una pérdida en la integridad de la membrana celular permite la fijación de fosfatidilserina conjugada fluorescentemente. Las células teñidas pueden medirse por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Vermes, I., 1995, J. Immunol. Methods. 180: 39-52). En una realización, cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en el número de células apoptóticas de la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), sugiere un efecto del antagonista de la interacción PDZ/PL sobre la función biológica. Para evaluación de la apoptosis *in situ*, pueden utilizarse también ensayos para evaluación de la muerte celular en muestras de tejido en estudios *in vivo*.

(G) Cuantificación de la Producción de Citoquinas

15 Sobrenadantes de células recogidos después de la estimulación de las células durante 16-48 horas se guardan a -80°C hasta su ensayo o se ensayoan directamente respecto a producción de citoquinas. Pueden realizarse ensayos de citoquinas múltiples en cada muestra. IL-2, IL-3, IFN-γ y otros ensayos ELISA de citoquinas están disponibles para ratón, rata, y humano (Endogen, Inc. y BioSource). La producción de citoquinas se mide utilizando un protocolo ELISA sándwiches estándar de dos anticuerpos como se describe por el fabricante. La presencia de peroxidasa de 20 rábano picante se detecta con sustrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB) y la reacción se para con ácido sulfúrico. Se mide la absorbencia a 450 nm utilizando un lector de microplacas. Cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en la intensidad de color de la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), sugiere un efecto del antagonista de la interacción PDZ/PL sobre la función biológica. Véase también el Ejemplo 1, más adelante. La detección de 25 citoquinas intracelulares utilizando anticuerpos anti-citoquina proporciona la ventaja adicional de medida de las citoquinas antes de poblaciones de células mixtas. Esto permite fenotipar la frecuencia de medición de los tipos de células productoras de citoquinas en suspensión o en tejidos.

(H) NF-AT Puede Visualizarse por Inmunotinción

30 La activación de las células T requiere la importación del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT) al núcleo. Esta translocación de NF-AT puede visualizarse por inmunotinción con un anticuerpo anti-NF-AT (Cell 1998, 93:851-861). Por ello, se ha utilizado la translocación nuclear de NF-AT para ensayar la activación de las células T. Análogamente, se han utilizado ensayos informadores de NF-AT/luciferasa como medida estándar de activación de las células T (MCB 1996, 12: 7151-7160). Cualquier aumento o disminución estadísticamente significativo en la 35 translocación nuclear de NF-AT producida por la muestra tratada con el antagonista de la interacción PDZ/PL, en comparación con una muestra de control (sin tratamiento), sugiere un efecto del antagonista de la interacción PDZ/PL sobre la función biológica. Con objeto de optimizar el uso de los péptidos y análogos de péptidos descritos en esta memoria en un individuo humano, pueden utilizarse diversos modelos animales para definir ciertos parámetros clínicos. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ensayarse en diferentes dosificaciones, 40 formulaciones y rutas de administración en un modelo de ratón de trasplante cardíaco para optimizar su capacidad para inhibir las respuestas de rechazo a trasplantes de órganos sólidos (Fulmer et al., 1963, Am. J. Anat. 113: 273; Jockusch et al., 1983, Exp. Neurol. 81: 649).

En situaciones en las que se desea la inhibición de una respuesta de las células T, los compuestos de la invención 45 pueden utilizarse para inhibir las interacciones del dominio PDZ con CD3, CD4, CD6 y CDw137. Adicionalmente, los compuestos de la invención se pueden utilizar para inhibir interacciones del dominio PDZ con CD53 y CD138 en las células B. Con objeto de inhibir las reacciones alérgicas mediadas por IgE, los compuestos de la invención pueden utilizarse para inhibir interacciones del dominio PDZ con FcεRIβ, CDw125 y CDw128. Adicionalmente, puede utilizarse una secuencia motivo de fijación del dominio PDZ (secuencia PL) de CD95 para inducir apoptosis de linfomas.

(I) Ensayos de Liberación de Mediadores Inflamatorios

50 Son bien conocidos en la técnica ensayos para liberación de mediadores inflamatorios con objeto de acceder al efecto de los compuestos o tratamientos de desgranulación mediada por IgE. Véase, Berger et al., 1997, Measuring Cell Degranulation v.g., cap. 19.6 Immunology Method Manual. Academic Press, Ltd. 1436-1440 y Siraganian, 1983, Histamine Secretion from Mast Cells and Basophil. TIPS 4:432-437.

6.9. Formulación y Ruta de Administración

6.9.1 Introducción de Agonistas o Antagonistas (v.g., Péptidos y Proteínas de Fusión) en las Células

En un aspecto, se introducen en una célula antagonistas PDZ-PL para modular (es decir, aumentar o disminuir) una función biológica o actividad de la célula. Muchas moléculas orgánicas pequeñas atraviesan fácilmente las membranas celulares (o pueden ser modificadas por una persona con experiencia utilizando métodos de rutina para aumentar la capacidad de los compuestos para entrar en las células, v.g., por reducción o eliminación de carga, aumento de la lipofilia, conjugación de la molécula a un resto de direccionamiento de un receptor de la superficie celular de tal modo que interaccione después con el receptor). Son también bien conocidos métodos para introducción de moléculas mayores, v.g. péptidos y proteínas de fusión, que incluyen, v.g., inyección, fusión mediada por liposomas, aplicación de un hidrogel, conjugación a un conjugado de resto de direccionamiento endocitosado por la célula, electroporación, y análogos).

En un aspecto, el antagonista o agente es un polipéptido de fusión o polipéptido derivatizado. Una proteína de fusión o derivatizada puede incluir un resto de direccionamiento que aumente la capacidad del polipéptido para atravesar una membrana celular o haga que el polipéptido se administre preferentemente a un tipo de célula especificado (v.g., células hepáticas o células tumorales) o preferentemente a un compartimiento celular (v.g., compartimiento nuclear). Ejemplos de moléculas de direccionamiento incluyen colas de lípidos, secuencias de aminoácidos tales como el péptido antenapedia o una señal de localización nuclear (NLS; v.g. nucleoplasmmina de *Xenopus*, Robbins et al., 1991, *Cell* 64: 615).

En un aspecto, una secuencia peptídica o un análogo de péptido determinado que inhibe una fijación dominio PDZ-proteína PL en un ensayo se introduce en una célula por enlace de la secuencia a una secuencia de aminoácidos que facilita su transporte a través de la membrana plasmática (una "secuencia transportadora transmembranal"). Los péptidos pueden utilizarse directamente o fusionarse a una secuencia transportadora transmembranal a fin de facilitar su entrada en las células. En el caso de un péptido de fusión de este tipo, cada péptido puede fusionarse con un péptido heterólogo directamente en su término amino o por utilización de un polienlazador flexible tal como el pentámero G-G-G-G-S (SEQ ID NO: 1) repetido 1 a 3 veces. Dicho enlazador se ha utilizado en la construcción de anticuerpos monocatenarios (scFv) por inserción entre V_H y V_L (Bird et al., 1988, *Science* 242: 423-426; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5979-5883). El enlazador está diseñado para hacer posible la interacción correcta entre dos hojas beta que forman la región variable del anticuerpo monocatenario. Otros enlazadores que pueden utilizarse incluyen Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp (SEQ ID NO: 2) (Chaudhary et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1066-1070) y Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp (SEQ ID NO: 3) (Bird et al., 1988, *Science* 242: 423-426).

Se han descrito en la técnica cierto número de secuencias peptídicas capaces de facilitar la entrada de un péptido enlazado a estas secuencias en una célula a través de la membrana plasmática (Derossi et al., 1998, *Trends in Cell Biol.* 8: 84). Para el propósito de esta invención, se hace referencia colectivamente a tales péptidos como péptidos transmembranales transportadores. Ejemplos de estos péptidos incluyen, pero sin carácter limitante, tal derivado de HIV (Vives et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 16010; Nagahara et al., 1998, *Natl. Med.* 4: 1449), antenapedia de *Drosophila* (Derossi et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 261: 10444), VP22 del virus del herpes simple (Elliot y D'Hare, 1997, *Cell* 88: 223-233), las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 2 y 3 de anticuerpos anti-DNA (Avraneas et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5601-5606), la proteína de 70 kDa del choque térmico (Fujihara, 1999, *EMBO J.* 18: 411-419) y transportana (Pooda et al., 1998, *FASEB J.* 12: 67-77). En una realización preferida de la invención, se utiliza un péptido tat truncado de HIV que tiene la secuencia de GYGRKKRRQRRRG SEQ ID NO: 173).

Se prefiere que una secuencia transportadora transmembranal se fuse a una secuencia carboxi-terminal de un receptor hematopoyético de la superficie celular en su término amino con o sin un enlazador. Generalmente, el término C de una secuencia motivo de fijación del dominio PDZ (secuencia PL) tiene que estar libre a fin de interaccionar con un dominio PDZ. La secuencia transportadora transmembranal puede utilizarse totalmente o en parte con tal que la misma sea capaz de facilitar la entrada del péptido en una célula.

Un aspecto alternativo de la descripción, puede utilizarse una secuencia C-terminal sola de un receptor hematopoyético de la superficie celular cuando se administra de una manera que permita su entrada en las células en ausencia de una secuencia transportadora transmembranal. Por ejemplo, el péptido puede ser administrado en una formulación de liposomas o utilizando un enfoque de terapia génica por administración de una secuencia codificante para el motivo de fijación del dominio PDZ solo o como una molécula de fusión en una célula diana.

Los compuestos pueden administrarse también por vía de liposomas, que sirven para direccionar los conjugados a un tejido particular, tal como un tejido linfóide, o direccionarse selectivamente a células infectadas, así como aumentar la vida media de la composición peptídica. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípido, capas láminares y análogos. En estas preparaciones, el péptido a administrar se incorpora como parte de un liposoma, solo o en asociación con una molécula que se fija, v.g., a un receptor prevaleciente entre células linfoides, tales como anticuerpos monoclonales que se fijan al antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunógenas. De este modo, los liposomas

- cargados con un péptido o conjugado de la invención deseado pueden dirigirse al sitio de las células linfoides, donde los liposomas administran luego las composiciones inhibidoras seleccionadas. Liposomas para uso en la invención se forman a partir de lípidos estándar formadores de vesículas, que incluyen generalmente fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esterol, tal como colesterol. La selección de los lípidos está guiada generalmente por consideraciones, v.g., de tamaño del liposoma, labilidad en medio ácido y estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Están disponibles una diversidad de métodos para preparación de liposomas, como se describen en, v.g., Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980), Patentes U.S. Núms. 4,235,871, 4,501,728 y 4,837,028.
- El direccionamiento de los liposomas utilizando una diversidad de agentes de direccionamiento es bien conocido en la técnica (véase, v.g., las patentes U.S. Núms. 4.957.773 y 4.603.044). Para direccionamiento a las células inmunes, un ligando a incorporar en el liposoma puede incluir, v.g., anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para determinantes de la superficie celular de las células del sistema inmunitario deseadas. Una suspensión de liposomas que contenga un péptido o conjugado puede administrarse por vía intravenosa, local, tópica, etc. en una dosis que varíe de acuerdo con, entre otras cosas, en modalidad de administración, el conjugado que se esté administrando, y la fase de la enfermedad que se esté tratando.
- Con objeto de administrar específicamente un péptido de secuencia motivo de fijación de dominio PDZ (secuencia PL) a un tipo de célula específico, el péptido puede enlazarse a un resto de direccionamiento específico de la célula, con inclusión, pero sin carácter limitante, de ligandos para diversas moléculas de la superficie de los leucocitos tales como factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, así como anticuerpos o fragmentos de fijación de antígeno de los mismos. Dado que un gran número de receptores de superficie celular han sido identificados en leucocitos, pueden utilizarse ligandos o anticuerpos específicos para estos receptores como restos de direccionamiento específicos de la célula. Por ejemplo, pueden utilizarse interleuquina-2, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y CD40 o fragmentos peptídicos de los mismos para dirigir específicamente células T activadas (*The Leucocyte Antigen Facts Book*, 1997, Barclay et al. (editores), Academic Press). Se pueden utilizar CD28, CTLA-4 y CDE40L o fragmentos peptídicos de los mismos para dirigir específicamente células B. Adicionalmente, pueden utilizarse dominios Fc para dirigir ciertas células expresantes de receptores tales como monocitos.
- Los anticuerpos son los restos de direccionamiento específicos de la célula más versátiles debido a que pueden ser generados contra cualquier antígeno de la superficie celular. Se han generado anticuerpos monoclonales contra marcadores específicos de linaje de leucocitos tales como ciertos antígenos CD. Genes de la región variable de un anticuerpo pueden aislarse fácilmente de células de hibridoma por métodos bien conocidos en la técnica. Sin embargo, dado que los anticuerpos están ensamblados entre dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, se prefiere utilizar un scFv como resto de direccionamiento específico de la célula. Tales scFv están constituidos por dominios V_H y V_L enlazados a una sola cadena polipeptídica por un péptido enlazador flexible.
- La secuencia del resto de fijación del dominio PDZ (secuencia PL) puede estar enlazada a una secuencia transportadora transmembranal y un resto de direccionamiento específico de la célula para producir una molécula de tri-fusión. Esta molécula puede fijarse a una molécula de la superficie de los leucocitos, pasa a través de la membrana y dirige los dominios PDZ. Alternativamente, una secuencia motivo de fijación del dominio PDZ (secuencia PL) puede enlazarse a un resto de direccionamiento específico de una célula que se fija a una molécula de la superficie que internaliza el péptido de fusión.
- En otro enfoque, se han utilizado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (proteinoides) a fin de administrar productos farmacéuticos. Por ejemplo, la patente U.S. Núm. 4.925.673 describe portadores de microesferas proteinoides que contienen fármaco así como métodos para su preparación y utilización. Estas microesferas proteinoides son útiles para la administración de cierto número de agentes activos. Véanse también las Patentes U.S. Núms. 5.907.030 y 6.033.884.
- #### 6.9.2 Introducción de Polinucleótidos en las Células
- Un polinucleótido que codifica un péptido C-terminal receptor de superficie puede ser útil en el tratamiento de diversas condiciones anormales asociadas a la activación de los leucocitos. Por introducción de secuencias génicas en las células, la terapia génica puede utilizarse para tratar afecciones en las cuales los leucocitos están activados dando como resultado consecuencias deletéreas. En un aspecto, un polinucleótido que codifica un péptido de secuencia PL de la invención se introduce en una célula en la que se expresa el mismo. El péptido expresado inhibe luego la interacción de las proteínas PDZ y proteínas PL en la célula.
- Así, en un aspecto, los polipéptidos de la invención se expresan en una célula por introducción de un ácido nucleico (v.g., un vector de expresión de DNA o mRNA) que codifica la proteína o péptido deseado en la célula. La expresión puede ser constitutiva o inducible, dependiendo del vector y la elección del promotor. Métodos para introducción y expresión de ácidos nucleicos en la célula son bien conocidos en la técnica y se describen en esta memoria.
- En un aspecto específico, se administran a un individuo humano ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un péptido descrito en esta memoria, se administran a un individuo humano. En este aspecto, el ácido nucleico produce su producto codificado que media un efecto terapéutico por inhibición de la activación de los

leucocitos. Pueden utilizarse cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica. Métodos ilustrativos se describen a continuación.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215. Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología del DNA recombinante que pueden utilizarse se describen en Ausubel et al., (editores), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY.

En un aspecto preferido, la composición terapéutica comprende una secuencia codificante que forma parte de un vector de expresión. En particular, un ácido nucleico de este tipo tiene un promotor enlazado operativamente a la secuencia codificante, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización específica, se utiliza una molécula de ácido nucleico en la cual la secuencia codificante y cualesquier otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión intracromosómica del ácido nucleico (Koller y Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435-438).

La administración de ácido nucleico a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vector portador de ácido nucleico, o indirecto, en cuyo caso, las células se transforman primeramente con el ácido nucleico *in vitro* y se trasplantan luego al paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En un aspecto específico, el ácido nucleico se administra directamente *in vivo*, donde el mismo se expresa para producir el producto codificado. Esto puede realizarse por cualesquier métodos conocidos en la técnica, v.g., por construcción del mismo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administración al mismo, de tal modo que se convierte en intracelular, v.g., por infección utilizando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (véase Patente U.S. Núm. 4.980.286), por inyección directa de DNA desnudo, por el uso de bombardeo con micropartículas (v.g., un cañón de genes; Biolistic, Dupont), por revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, por encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, por administración del mismo en unión con un péptido que se sabe penetra en el núcleo, o por administración del mismo enlazado a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptores (véase v.g., Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432) que puede utilizarse luego para direccionamiento a tipos de células que expresan específicamente los receptores. En otro aspecto, puede formarse un complejo ácido nucleico-ligando en el cual el ligando comprende un péptido viral fusogénico para romper los endosomas, haciendo posible que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica. En otro aspecto adicional, el ácido nucleico puede direccionarse *in vivo* para absorción y expresión específicas por la célula, por direccionamiento a un receptor específico (véanse, v.g. las Publicaciones PCT WO 92/06180 fechada el 16 de abril, 1992; WO 92/22635 fechada el 23 de diciembre, 1992; WO92/20316 fechada el 26 de noviembre, 1992; WO93/14188 fechada el 22 de julio, 1993; WO 93/20221 fechada el 14 de octubre, 1993). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del DNA de la célula hospedadora para expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435-438).

En un aspecto preferido, pueden utilizarse adenovirus como vectores virales en terapia génica. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se encuentran en estado de división (Kozarsky y Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 499-503). Otros casos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., 1991, *Science* 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, *Cell* 68:143-155; y Mastrangeli et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225-234. Adicionalmente, vectores adenovirales con tropismo modificado pueden utilizarse para direccionamiento específico de células (WO 98/40508). Ha sido propuesto también un virus adeno-asociado (AAV) para uso en terapia génica (Walsh et al., 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300).

Adicionalmente, vectores retrovirales (véase Miller et al., 1993, *Meth. Enzymol.* 217: 581-599) se han modificado para delecionar secuencias retrovirales que no son necesarias para empaquetamiento del genoma viral e integración en el DNA de la célula hospedadora. La secuencia codificante a utilizar en terapia génica se clona en el vector, lo que facilita la administración del gen a un paciente. Detalles adicionales acerca de vectores retrovirales pueden encontrarse en Boesen et al., 1994, *Biotherapy* 6: 291-302, que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas con objeto de hacer las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son Clowes et al., 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Kiem et al., 1994, *Blood* 83:1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141; y Grossman y Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114.

Otro enfoque para terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo de tejido. Usualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se ponen luego bajo selección a fin de aislar aquellas células que han absorbido y están expresando el gen transferido. Dichas células se administran luego a un paciente.

En este aspecto, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de administración *in vivo* de la célula

recombinante resultante. Tal introducción puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, con inclusión, pero sin carácter limitante, de transfección, electroporación, lipofección, microinyección, infección con un vector viral o vector de bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen en la técnica numerosos métodos para la introducción de genes extraños en células. Véanse, v.g., Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; China, 1985, Pharmac. Ther. 29: 69-92) y pueden ser utilizados de acuerdo con la presente invención, con tal que las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras no se vean alteradas. El método debería proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico en la célula, a fin de que el ácido nucleico pueda ser expresado por la célula y sea preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular. En una realización preferida, la célula utilizada para terapia génica es autóloga para el paciente.

En un aspecto específico, el ácido nucleico a introducir para propósitos de terapia génica comprende un promotor inducible enlazado operativamente a la secuencia codificante, de tal modo que la expresión del ácido nucleico pueda ser controlada por control de la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

15 Oligonucleótidos tales como moléculas RNA y DNA antisentido, y ribozimas que funcionan para inhibir la traducción de un mRNA receptor de superficie de los leucocitos, especialmente su término C, están también dentro del alcance de la invención. Las moléculas de RNA y DNA antisentido actúan para bloquear directamente la traducción del mRNA por fijación al mRNA diana y prevención de la traducción de proteínas. En relación con DNA antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, v.g., entre las regiones -10 y +10 de una secuencia de nucleótidos.

20 El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificado que se selecciona del grupo que incluye, pero sin carácter limitante, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2, 2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético-metiléster, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3) w, y 2, 6-diaminopurina.

25 Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del RNA. El mecanismo de la acción de las ribozimas implica hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima a RNA diana complementario, seguida por escisión endonucleolítica. Dentro del alcance de la invención se encuentran moléculas de ribozima con motivo en cabeza de martillo modificada por ingeniería que catalizan específica y eficientemente la escisión endonucleolítica de secuencias de RNA receptoras de la superficie de los leucocitos.

30 Los sitios específicos de escisión por ribozima dentro de cualquier diana potencial de RNA se identifican inicialmente por escaneo de la molécula diana respecto a sitios de escisión de ribozimas que incluyen las secuencias siguientes, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, secuencias de RNA cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse respecto a 40 características estructurales predichas tales como estructura secundaria que pueden hacer inadecuada la secuencia del oligonucleótido. La idoneidad de dianas candidato puede evaluarse también ensayoando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando ensayos de protección contra las ribonucleasas.

45 Las moléculas de RNA y DNA antisentido y ribozimas pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ácido nucleico. Éstos incluyen técnicas para síntesis química de oligodesoxirribonucleótidos bien conocidos en la técnica tales como por ejemplo síntesis química de fosforamiditos en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de RNA por transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de DNA que codifican la molécula de RNA. Tales secuencias de DNA pueden incorporarse en una gran diversidad de vectores que contienen promotores de RNA-polimerasa adecuados tales como los promotores de las polimerasas T7 o SP6. Alternativamente, pueden introducirse de manera estable en líneas de células constructos de 50 cDNA antisentido que sintetizan RNA antisentido constitutiva o induciblemente, dependiendo del promotor utilizado.

55 Pueden introducirse diversas modificaciones en las moléculas de DNA como medio de aumento de la estabilidad intracelular y la vida media. Modificaciones posibles incluyen, pero sin carácter limitante, la adición de secuencias flanqueantes de ribo- o desoxinucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiesterasa dentro de la cadena principal del oligodesoxirribonucleótido.

55 6.9.3. Otras Composiciones Farmacéuticas

Los compuestos descritos en esta memoria pueden administrarse a un individuo *per se* o en la forma de una composición estéril o una composición farmacéutica. Composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención pueden fabricarse por medio de procesos convencionales de mezcladura, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las

composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de los péptidos o análogos de péptidos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración seleccionada.

- 5 Para administración tópica, los compuestos descritos en esta memoria se pueden formularse como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. como son bien conocidos en la técnica.

Formulaciones sistémicas incluyen aquéllas que están diseñadas para administración por inyección, v.g., inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

- 10 Para inyección, los compuestos descritos en esta memoria se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes suspendedores, estabilizadores y/o dispersantes.

- 15 Alternativamente, los compuestos se pueden encontrar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, v.g. agua estéril exenta de pirógenos, antes de su utilización.

Para administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Esta ruta de administración puede ser utilizada para administrar los compuestos a la cavidad nasal.

- 20 Para administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente por combinación de los péptidos o análogos de péptidos activos con barreras farmacéuticamente aceptables bien conocidas en la técnica. Tales portadores hacen posible que los compuestos de la invención se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lodos, suspensiones y análogos, para ingestión oral por un paciente a tratar. Para formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y tabletas, excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes de fijación. Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

- 30 En caso deseado, las formas de dosificación sólidas pueden estar recubiertas con azúcar o provistas de recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar.

Para preparaciones orales líquidas tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, portadores, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente, pueden añadirse agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y análogos.

- 35 Para administración bucal, los compuestos pueden presentar la forma de tabletas, pastillas, etc. formuladas de manera convencional.

- 40 Para administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente descripción se administran convenientemente en la forma de una pulverización aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, v.g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, v.g. de gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvos adecuada tal como lactosa o almidón.

- 45 Los compuestos se pueden formular también en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, v.g., que contienen bases de suppositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 50 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos pueden formularse también como una preparación de tipo depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales adecuados polímeros o hidrófobos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

- 55 Alternativamente, pueden emplearse otros sistemas de administración farmacéutica. Liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración que pueden utilizarse para administrar péptidos y análogos peptídicos. Pueden emplearse también ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque usualmente a costa de mayor toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden administrar utilizando un

5 sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Diversos materiales de liberación sostenida han sido establecidos y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar los compuestos durante unas cuantas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del reactivo terapéutico, se pueden emplear estrategias adicionales para estabilización de proteínas.

10 Dado que todos los compuestos descritos en esta memoria pueden contener cadenas laterales o extremos cargados, los mismos se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones arriba descritas como ácidos o bases libres o como sales farmacéuticamente aceptables. Sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que retienen sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

6.10. Dosificaciones Eficaces

15 Los compuestos descritos en esta memoria se utilizarán generalmente en una cantidad eficaz para alcanzar el propósito deseado. Para uso con objeto de inhibir los trastornos asociados con la activación de los leucocitos, los compuestos de la invención o composiciones farmacéuticas de los mismos se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por cantidad terapéuticamente eficaz se entiende una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del paciente objeto de tratamiento. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está plenamente dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en esta memoria. Una "cantidad inhibidora" o "concentración inhibidora" de un inhibidor de la fijación PL-PDZ es una cantidad que reduce la fijación al menos aproximadamente un 40%, con preferencia al menos aproximadamente 50%, a menudo al menos aproximadamente 70%, e incluso tanto como al menos aproximadamente 90%. La fijación puede medirse *in vitro* (v.g., en un ensayo A o ensayo G) o *in situ*.

20 25 Para administración sistémica, una cantidad terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para alcanzar un intervalo de concentración circulante que incluye el valor Cl_{50} tal como se determina en cultivo de células (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que inhibe el 50% de las interacciones receptor de superficie de los leucocitos-proteína que contiene el dominio PDZ). Dicha información puede utilizarse para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos.

30 Las dosificaciones iniciales pueden estimarse también a partir de datos *in vivo*, v.g., modelos animales, utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a humanos basándose en datos animales.

35 La cantidad y los intervalos de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de los compuestos que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosis de paciente usuales para administración por inyección varían desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg/día, con preferencia desde aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Los niveles terapéuticamente eficaces en suero pueden alcanzarse por administración de dosis múltiples cada día.

40 45 En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz de los compuestos puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Una persona con experiencia en la técnica podrá optimizar las dosis locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

La cantidad de compuesto administrada dependerá por supuesto del individuo que se esté tratando, del peso del individuo, la gravedad de la afección, la manera de administración y el criterio del médico prescriptor.

La terapia puede repetirse intermitentemente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando los mismos no sean detectables. La terapia puede proporcionarse sola o en combinación con otros fármacos. En el caso de afecciones asociadas con la activación de los leucocitos tales como el rechazo de trasplantes y la autoinmunidad, los fármacos que pueden utilizarse en combinación con los compuestos de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, agentes anti-inflamatorios esteroidales y no esteroidales.

6.10.1 Toxicidad

50 Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de los compuestos descritos en esta memoria proporcionará beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial.

La toxicidad de los compuestos descritos en esta memoria se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, v.g. por determinación del valor DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) o el valor DL_{100} (la dosis letal para el 100% de la población). La ratio de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico. Se prefieren compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo de células y estudios en animales pueden

utilizarse en la formulación de un intervalo de dosificación que es no tóxico para uso en humanos. La dosificación de los compuestos descritos en esta memoria está comprendida preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la dosis eficaz con toxicidad escasa o nula. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación pueden ser seleccionadas por el médico individual teniendo en cuenta el estado del paciente. (Véase, v.g., Fingl et al., 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Cap. 1, pag. 1).

5 **6.11. EJEMPLO 1: ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T INHIBIDA POR LOS PÉPTIDOS TAT DE FUSIÓN DEL TÉRMINO CARBOXILO DEL RECEPTOR DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS T**

10 6.11.1. Materiales y Métodos

6.11.1.1 Síntesis de Péptidos

15 Todos los péptidos se sintetizaron químicamente por procedimientos estándar. El péptido de fusión del término carboxilo Tat-CD3 (GYGRKKRRQRRRGPPSSSGL, SEQ ID NO: 174); el péptido de fusión del término carboxilo Tat-CLASP1 (GY-GRKKRRQRRRGSISSSAEV, SEQ ID NO: 175); el péptido de fusión del término carboxilo Tat-CLASP2 (GYGRKKRRQRRRG-MTSSSSVV, SEQ ID NO: 176); y el péptido Tat (GYGRKKRRQRRRG, SEQ ID NO: __); se disolvieron a 1 mM en PBS, pH 7, o dH₂O. El péptido de stock MBPAc1-16 (AcASQKRPSQRHGSKYLA) se disolvió a 5 mM. Todos los péptidos se dividieron en partes alícuotas y se guardaron a -80°C hasta ser ensayoados.

6.11.1.2 Cultivos de Células

20 Las células se mantuvieron y se ensayoaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternero fetal (HyClone), glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato de sodio 1 mM, y beta-mercaptopropano 50 µM.

6.11.1.3 Ensayo de Estimulación de las Células T

25 Se ensayaron sobrenadantes respecto a la producción de citoquinas después de la activación de líneas de células T. Se estimularon líneas de células T de ratón utilizando dos métodos diferentes, o con antígeno y células presentadoras de antígeno o con CD3 anti-ratón.

30 Células T de ratón específicas de antígeno, BR4.2, se activaron con las 16 secuencias de aminoácidos N-terminales de la proteína básica mielina (MBPAc1-16) y esplenocitos de ratones singénicos en placas de 96 pocillos. Células presentadoras de antígeno tratadas con mitomicina C, 2 x 10⁵ B10.BR, se añadieron a cada fila de MBPAc1-16 diluida serialmente desde 0 a 200 µM. A continuación, se añadieron a cada fila péptidos Tat 10 µM o medio solo. Finalmente, se añadieron a todos los pocillos 2 x 10⁴ células T específicas de MBPAc 1-16, precargadas con péptidos Tat 10 µM (véase arriba) (Rabinowitz et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8702-8707). Las células Se activaron por incubación nocturna a 5% de CO₂, 37°C. Se recogió el sobrenadante de células y se guardó a -80°C hasta su ensayo respecto a producción de citoquinas. El volumen final era 200 µl/pocillo.

35 El anticuerpo anti-CD3 de ratón (Pharmingen #145-2C11) se recubrió durante una noche a 4°C utilizando placas ELISA de fondo plano con 96 pocillos a una concentración final de 0,5 µg/ml, diluido en PBS. Inmediatamente antes de su utilización, las placas se lavaron 3 veces con 200 µl PBS/pocillo para eliminar el exceso de anti-CD3. Para asegurar que las células disponían de tiempo suficiente para transducir los péptidos Tat antes de la activación, se pretrataron las células T (5 x 10⁵ células/ml) con o sin péptidos Tat 10 µM durante 2 horas a 5% CO₂, 37°C, y se diluyeron luego en medio con o sin péptidos Tat 10 µM a una concentración final de 2 x 10⁴ células por pocillo en un volumen final de 200 µl. Las células se trataron luego como se ha descrito arriba.

40 6.11.1.4 ELISA de Citoquinas

45 Se midió IFNy de los sobrenadantes de células, arriba descritos, a la temperatura ambiente utilizando el protocolo 3 ELISA de Endogen, Inc.. Resumidamente, placas ELISA de 96 pocillos, con fondo plano, y de alta fijación se preincubaron durante una noche con anticuerpo de recubrimiento (MM700). Las placas se lavaron con TRIS 50 mM, 0,2% Tween 20, pH 8 y se bloquearon luego durante una hora con PBS más 2% BSA. Las placas lavadas se incubaron luego durante una hora con 25 µl de sobrenadante de células y 25 µl de tampón bloqueador, o con 50 µl de IFNy estándar. La presencia de IFNy se detectó con un anticuerpo monoclonal anti-IFNy de ratón marcado con biotina (MM700B, Endogen, Inc.). Se revelan cantidades cuantitativas de anticuerpo de detección con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante. El sustrato enzimático y coloreado para HRP, tetrametilbencidina (TMB), se reveló durante hasta 30 minutos y se detuvo con H₂SO₄ 1,0 M. Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas de microtitulación (Thermo Max, Molecular Devices) y se calculó la concentración de IFNy desconocido de los sobrenadantes de células a partir de una curva estándar generada por el software Softmax Pro. (Molecular Devices).

6.11.2 Resultados

Péptidos que contenían secuencias del transportador Tat enlazadas a secuencias C-terminales de diversos PLs se ensayoaron respecto a su capacidad para inhibir la activación de las células T. La **FIGURA 4A** muestra que el péptido de fusión Tat-CD3 inhibe la activación de las células T mediada por péptido:MHC en comparación con 5 controles de péptido Tat solo o sin péptido. La **FIGURA 4B** muestra que el péptido de fusión del término carboxilo Tat-CLASP-2 inhibía la activación de las células T mediada por anti-CD3 monoclonal en comparación con el péptido Tat solo. El péptido de fusión Tat-CLASP 1 no inhibía la activación de las células T en este experimento. Estos 10 resultados indican que los péptidos que contienen secuencias inhibidoras potenciales pueden transportarse en células T a través de péptido transportador tal como Tat para alterar la organización de receptores de superficie mediada por las proteínas PDZ. La alteración de la organización de los receptores de superficie mediada por PDZ conduce al bloqueo de la activación de las células T en respuesta al antígeno.

6.12. EJEMPLO 2. DISEÑO DE UN INHIBIDOR DE LA FIJACIÓN DE LIGANDO DLG1 CON POTENCIA MAYOR QUE 100 μ M

Una proteína de fusión GST/DLG1 (véase **TABLA 3**) y un péptido marcado con biotina correspondiente a los 20 15 aminoácidos del terminal C de la proteína CLASP-2, péptido AA2L (véase **TABLA 4**), se sintetizaron y purificaron por métodos estándar bien conocidos en la técnica como se ha descrito arriba. Se demostró luego que esta combinación de ligandos PDZ se fija específicamente utilizando tanto el ensayo "A" como el ensayo "G" (véase **TABLA 2**). Una vez demostrada la fijación específica, se determinó la afinidad aparente de la interacción de fijación 20 utilizando el Enfoque 1 de la sección titulada "Medida de la Afinidad de Fijación de Ligando PDZ" (véase **FIGURA 2A**). La afinidad aparente medida era 21 μ M. Esto implica que el péptido AA2L CLASP-2 21 μ M marcado ocupaba el 50% de los sitios de fijación para CLASP-2 en DLG1. Por tanto, el péptido CLASP-2 21 μ M sin marcar debería ser capaz de bloquear la fijación de un ligando dado para DLG1 aproximadamente en un 50%, suponiendo que el 25 ligando dado (1) se fija al mismo o los mismos sitios en DLG1 que Qasp~2 y (2) no se añade a concentración suficiente para reducir significativamente la fijación del péptido CLASP-2 (es decir no puede superar al polipéptido CLASP-2).

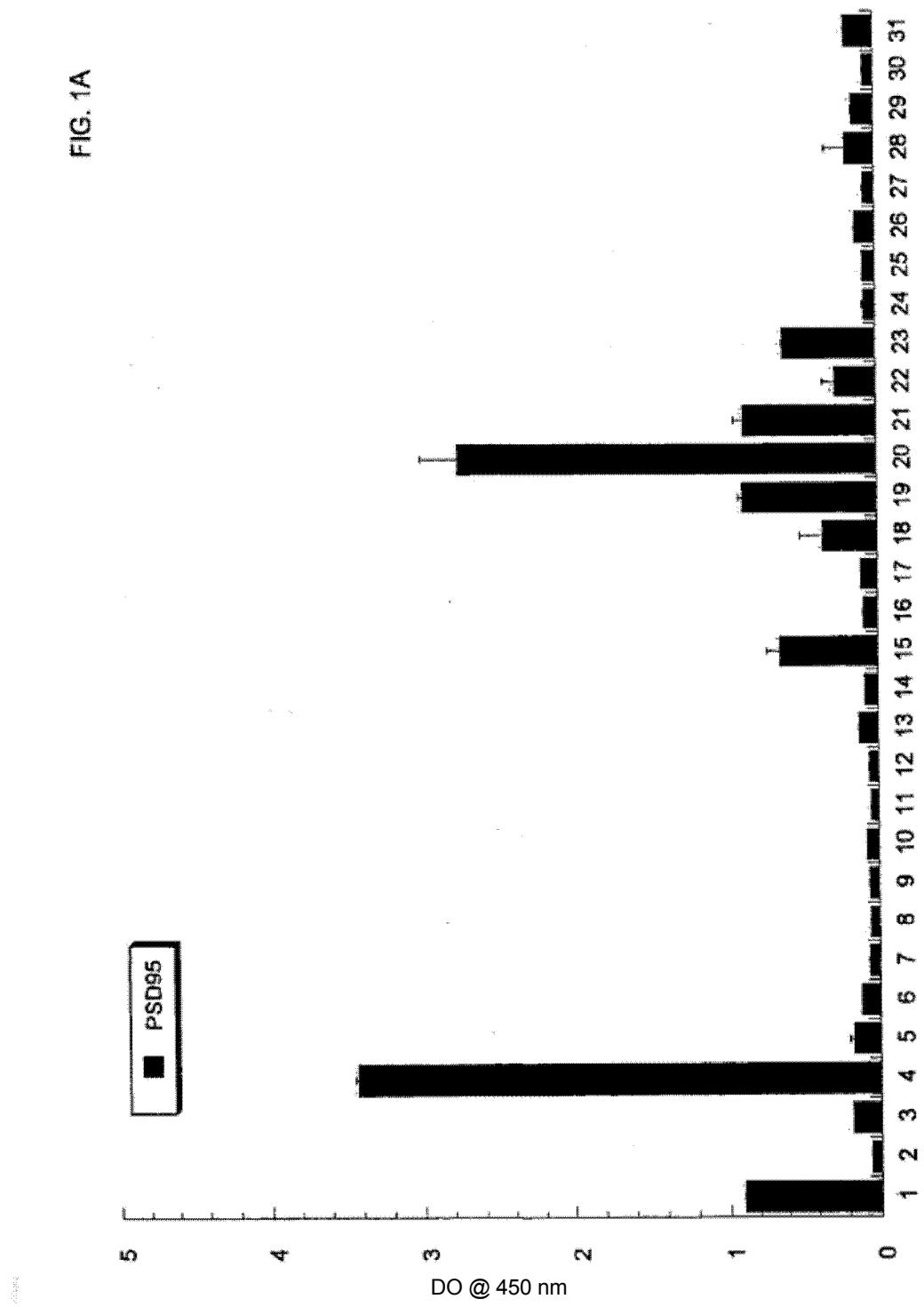
Para detectar dicha inhibición fue necesario sintetizar un análogo del péptido CLASP-2 AA2L que (1) retuviera 30 propiedades similares de fijación de DLG1 y (2) no generara por sí mismo una señal en el ensayo seleccionado para medir la inhibición. Dado que la mayoría de las interacciones moleculares entre las proteínas PDZ y sus ligandos implican únicamente los 6 aminoácidos del terminal C del ligando, se anticipó que una variante de ocho aminoácidos del péptido CLASP-2, MTSSSSVV, retendría propiedades de fijación de DLG1 similares a las del péptido CLASP-2 AA2L de 20 aminoácidos. Por ello se sintetizó este péptido CLASP-2 de ocho aminoácidos (que carecía de un 35 marcador funcional) y se purificó por técnicas estándar como se ha descrito arriba. Cuando 100 μ M del péptido CLASP-2 de ocho aminoácidos (funcionalmente sin marcar) y 20 μ M del péptido CLASP-2 AA2L marcado con biotina se añadieron simultáneamente a DLG1 en una variante del ensayo "G" (arriba descrita), la fijación del péptido CLASP-2 AA2L marcado era, como se había predicho, inhibida en más de 50% (**FIGURA 3A**). Un experimento 40 análogo en el cual el péptido CLASP-2 AA2L marcado se reemplazó con otro ligando DLG1 marcado, el péptido Fas AA13L marcado demostró una inhibición similar por el péptido CLASP-2 de ocho aminoácidos (**FIGURA 3A**). Por ello, se diseñó un inhibidor eficaz de la fijación del ligando DLG1 (es decir el péptido CLASP-2 de ocho aminoácidos MTSSSSVV) con un intervalo de potencia conocido (orden de magnitud 21 μ M) basándose en el conocimiento de la afinidad, 21 μ M, con la cual un ligando marcado particular, el péptido CLASP-2 AA2L, se fijaba a DLG1.

La presente invención no debe considerarse limitada en alcance por las realizaciones ilustradas propuestas sólo como ilustraciones de aspectos simples de la invención, y cualesquier secuencias que sean funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las ya indicadas y descritas en esta memoria resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede y los dibujos que se acompañan. Tales modificaciones deben considerarse comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de fusión o análogo peptídico del mismo para modulación de la fijación de una proteína PDZ y una proteína PL que comprende:
 - 5 (i) una secuencia de aminoácidos transmembranales transportadores capaz de facilitar la entrada de un péptido enlazado a ella en una célula a través de la membrana plasmática,
 - (ii) una secuencia peptídica polienlazadora flexible opcional, y
 - (iii) una secuencia peptídica del terminal carboxilo que comprende un motivo de fijación de dominio PDZ en el terminal C, comprendiendo la secuencia del motivo de fijación de dominio PDZ
- X*-S/T-D/E-V/I/L, en donde X* es cualquier aminoácido no aromático.
- 10 2. El péptido de fusión o análogo peptídico de la reivindicación 1, en donde la actividad de modulación funciona para inhibir la fijación de la proteína PDZ a la proteína PL.
3. El péptido o análogo peptídico de fusión de la reivindicación 2, en donde la secuencia C-terminal comprende cualquiera de las secuencias E-S-D-V o E-T-D-V.
- 15 4. El péptido o análogo peptídico de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia del péptido del terminal carboxilo comprende de 4 a 15 aminoácidos.
5. El péptido o análogo peptídico de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia de aminoácidos del transportador transmembranal se selecciona de (a) tat derivado de HIV, (b) antenapedia de Drosophila, y (c) VP22 del herpes simple.
- 20 6. El péptido o análogo peptídico de fusión de la reivindicación 5, en donde la secuencia del péptido del terminal carboxilo comprende de 4 a 15 aminoácidos.
7. El péptido o análogo peptídico de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia de aminoácidos del transportador transmembranal es un péptido tat que comprende la secuencia GYGRKKRRQRRRG.
- 25 8. El péptido o análogo peptídico de fusión de la reivindicación 3, en donde la secuencia de aminoácidos del transportador transmembranal es una secuencia tat derivada de HIV, y en donde la secuencia del péptido del terminal carboxilo contiene de 4 a 15 aminoácidos.

FIG. 1A



© 2002

FIG. 1B

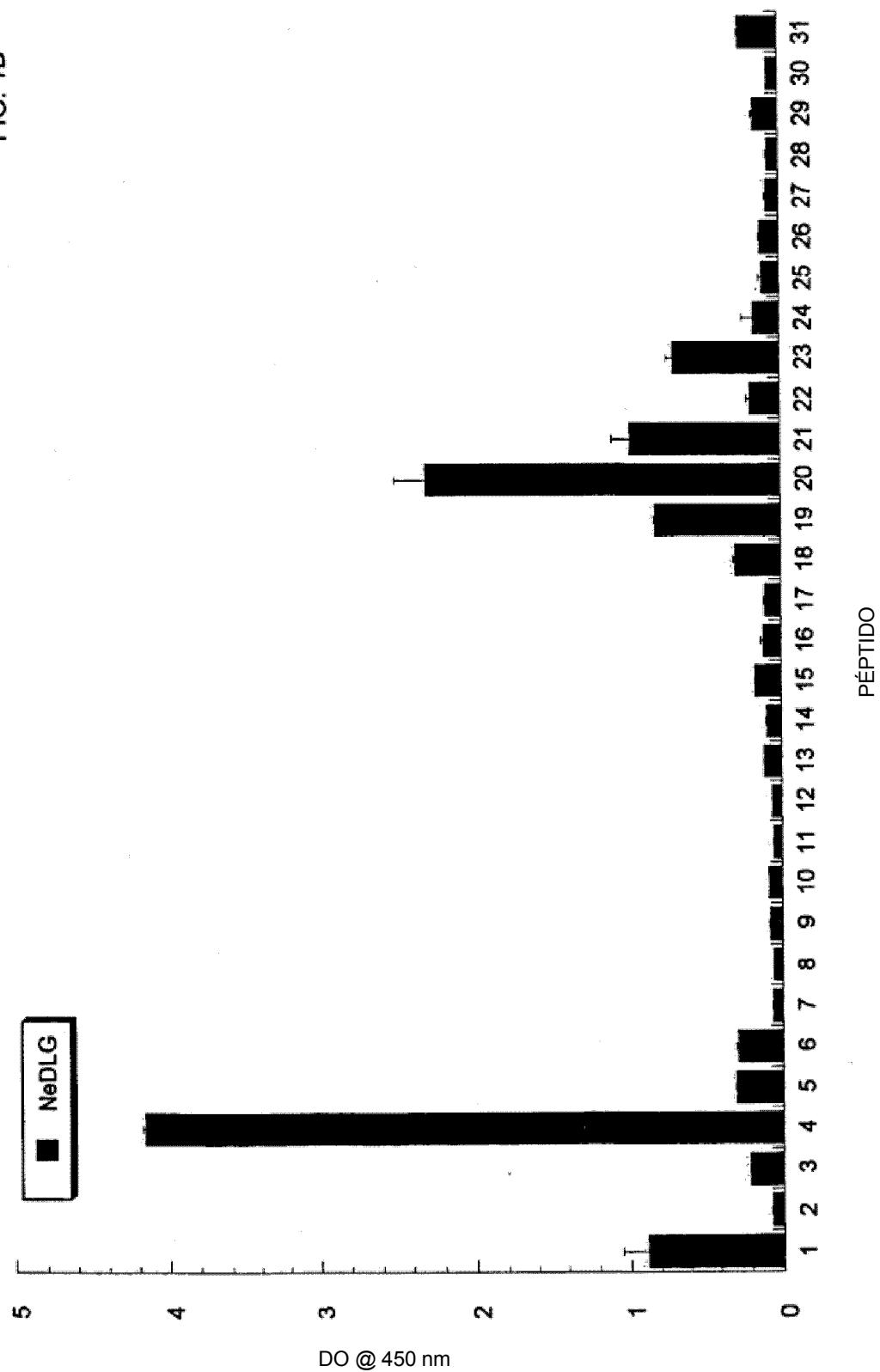


FIG. 1C

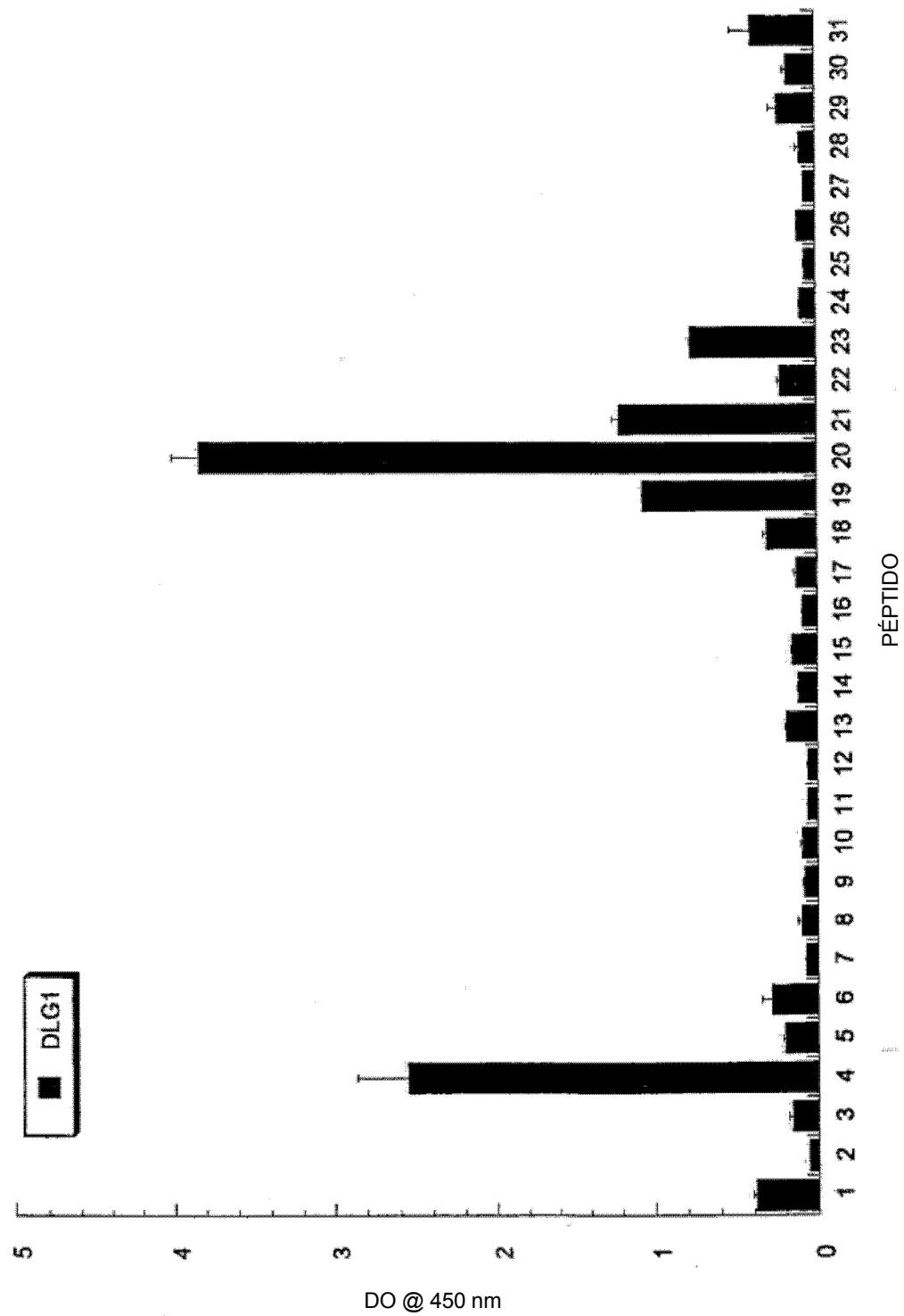


FIG. 1D

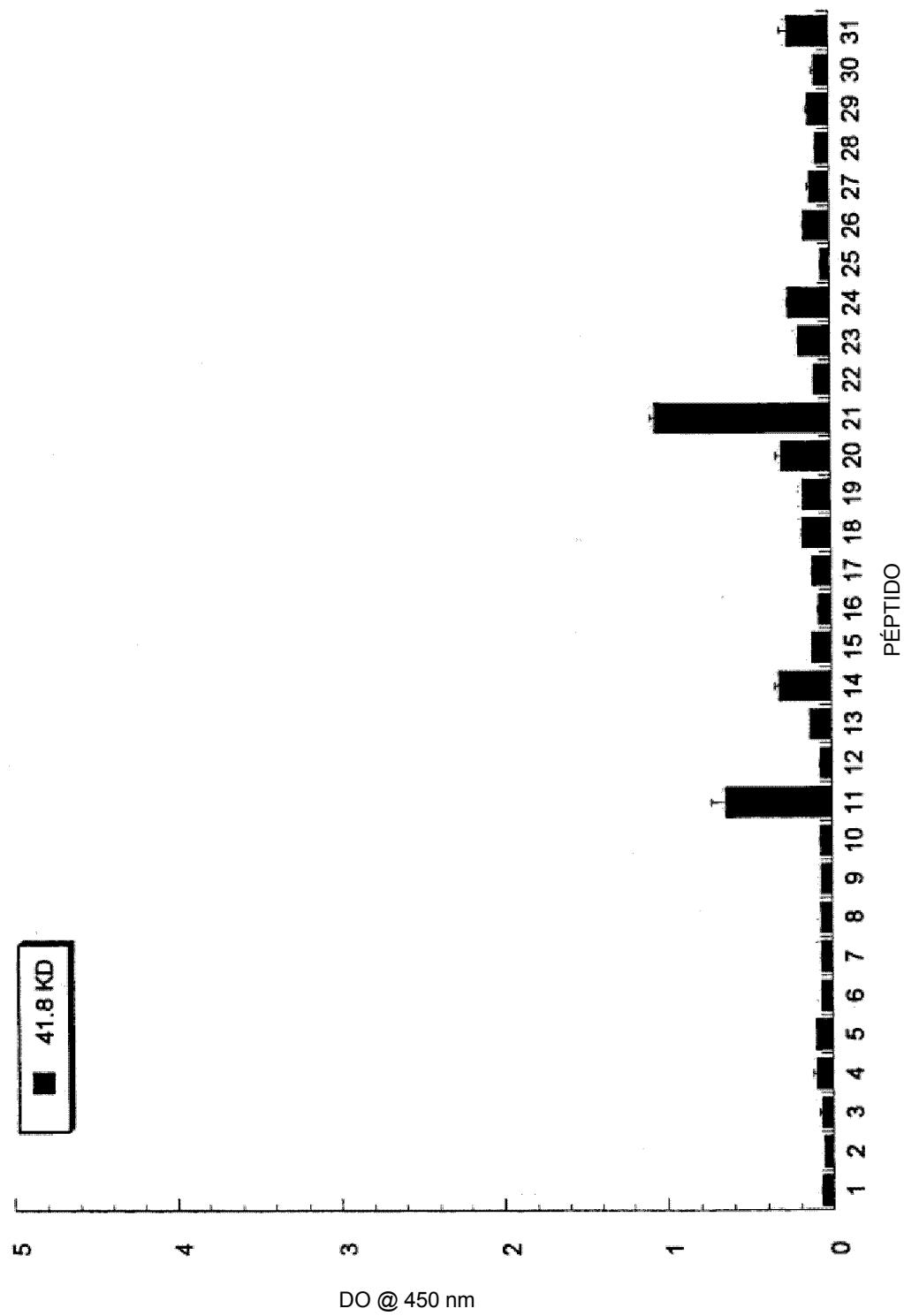


FIG. 2A

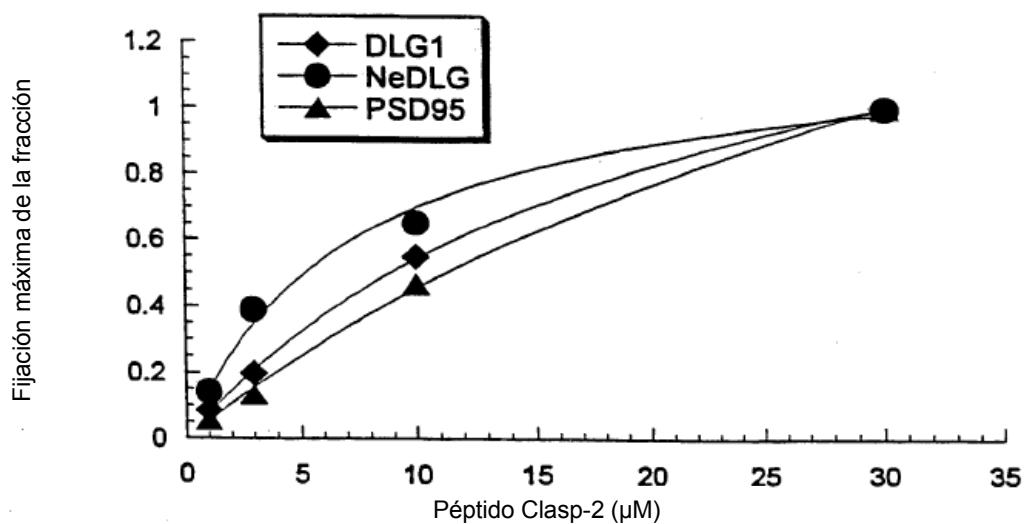


FIG. 2B

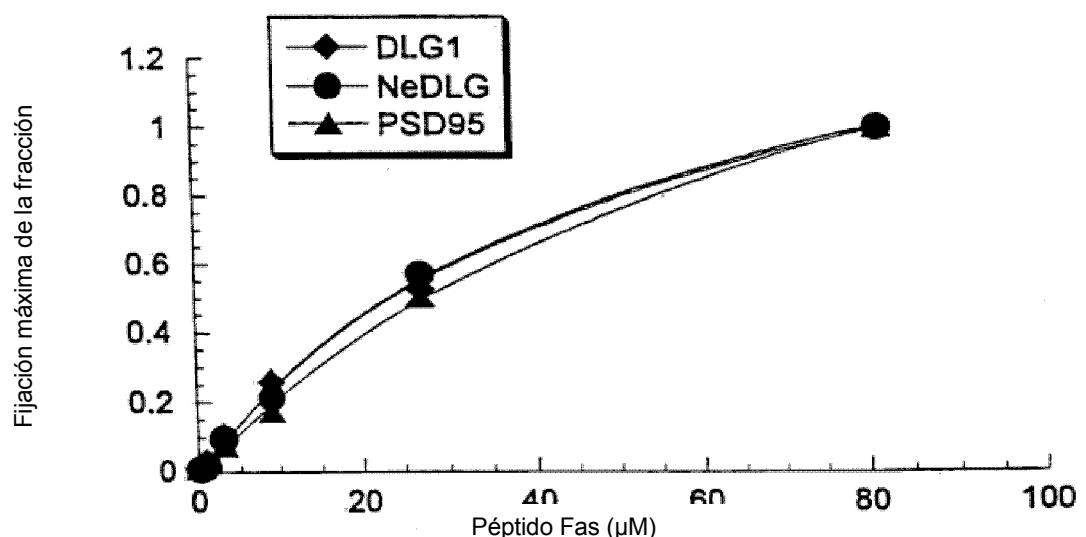


FIG. 3A

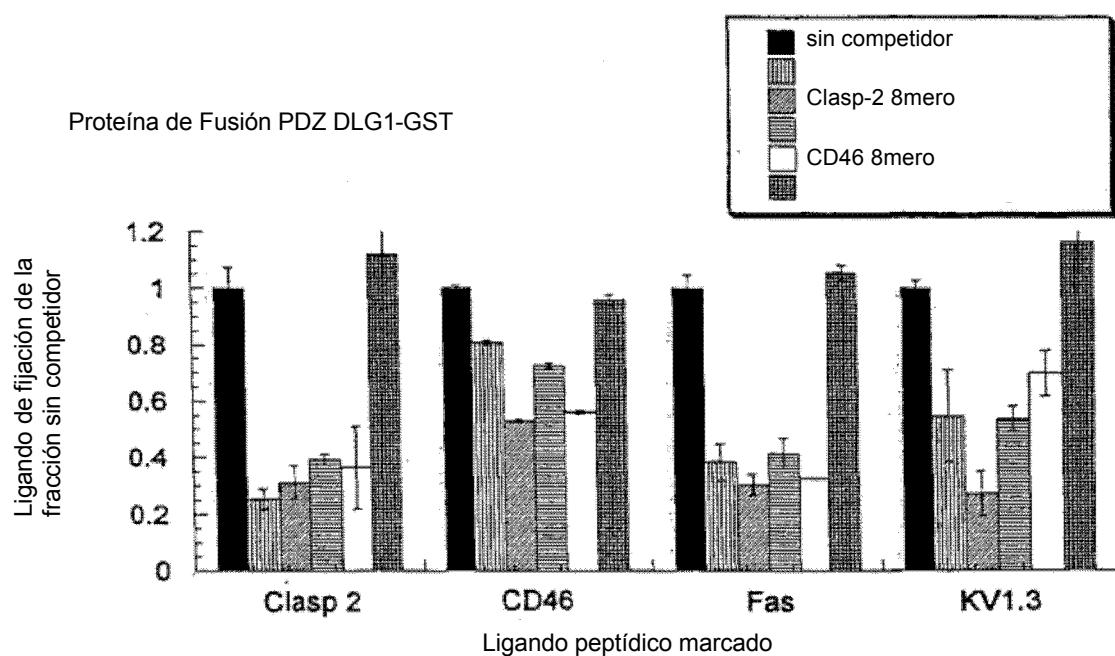


FIG. 3B

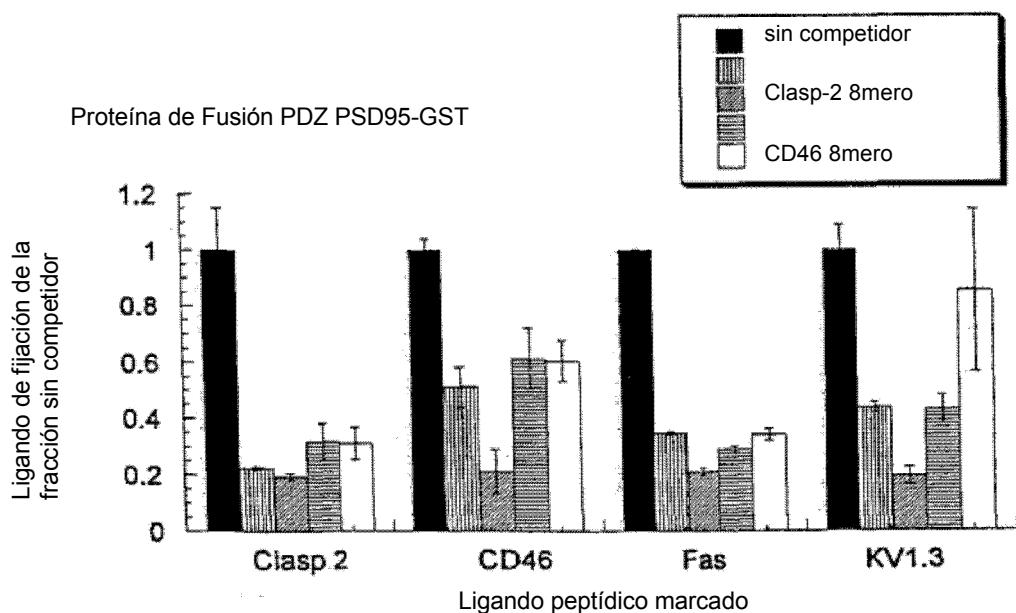


FIG. 3C

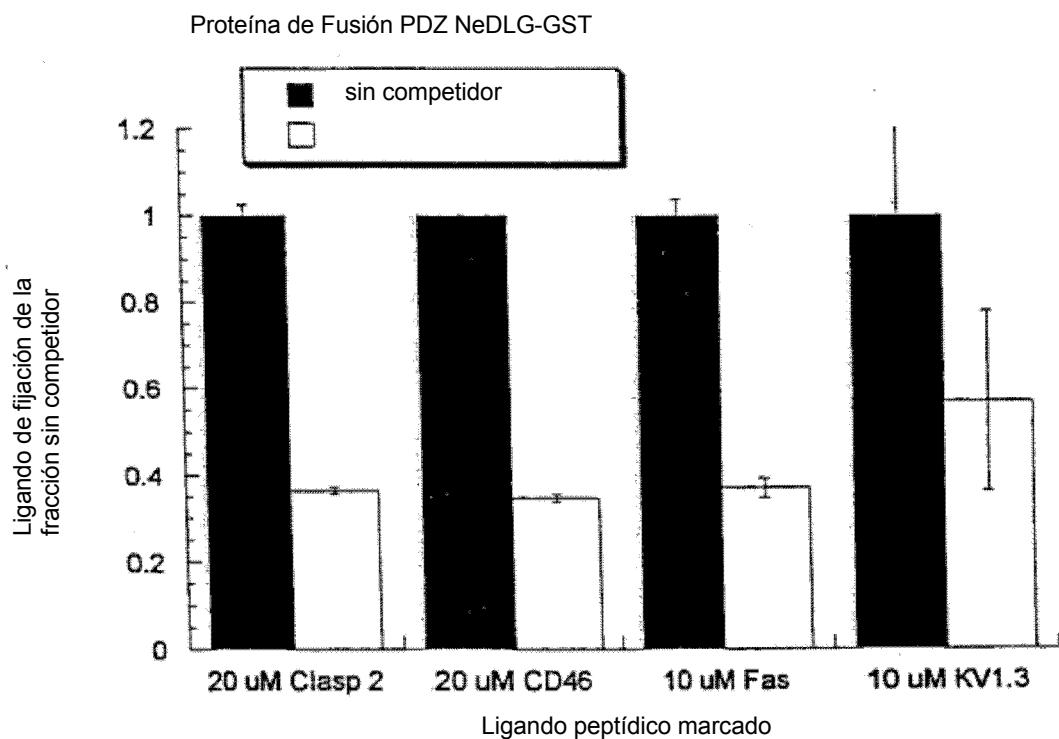


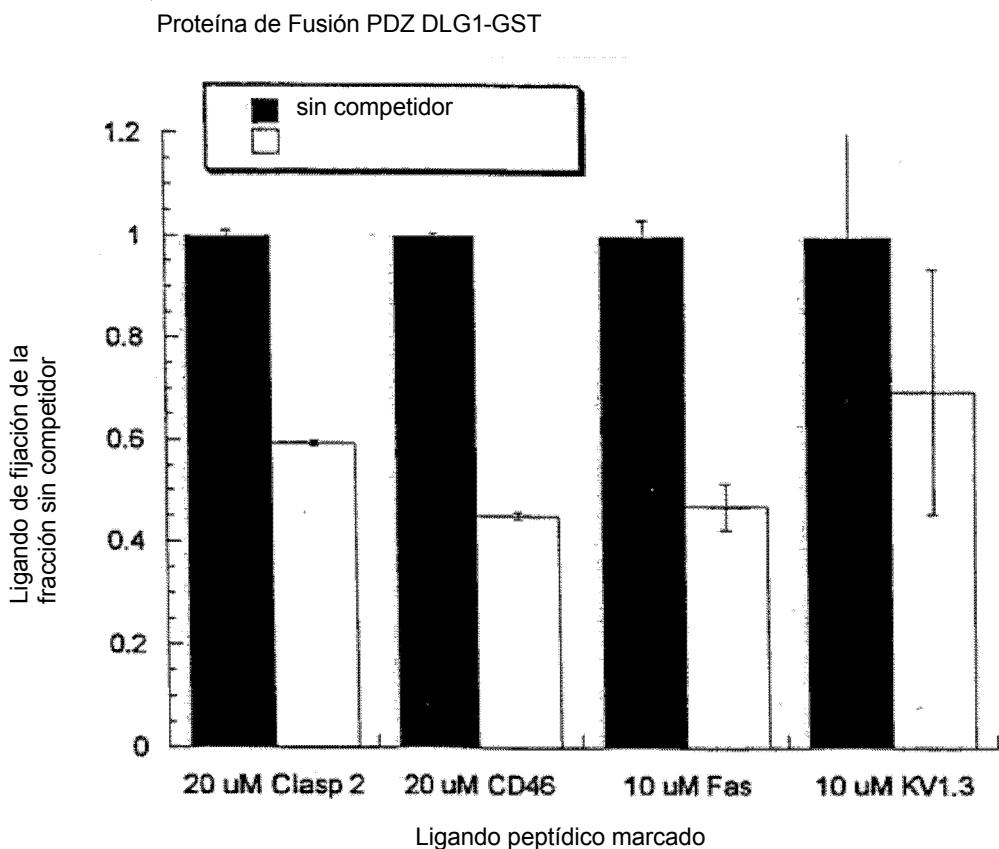
FIG. 3D

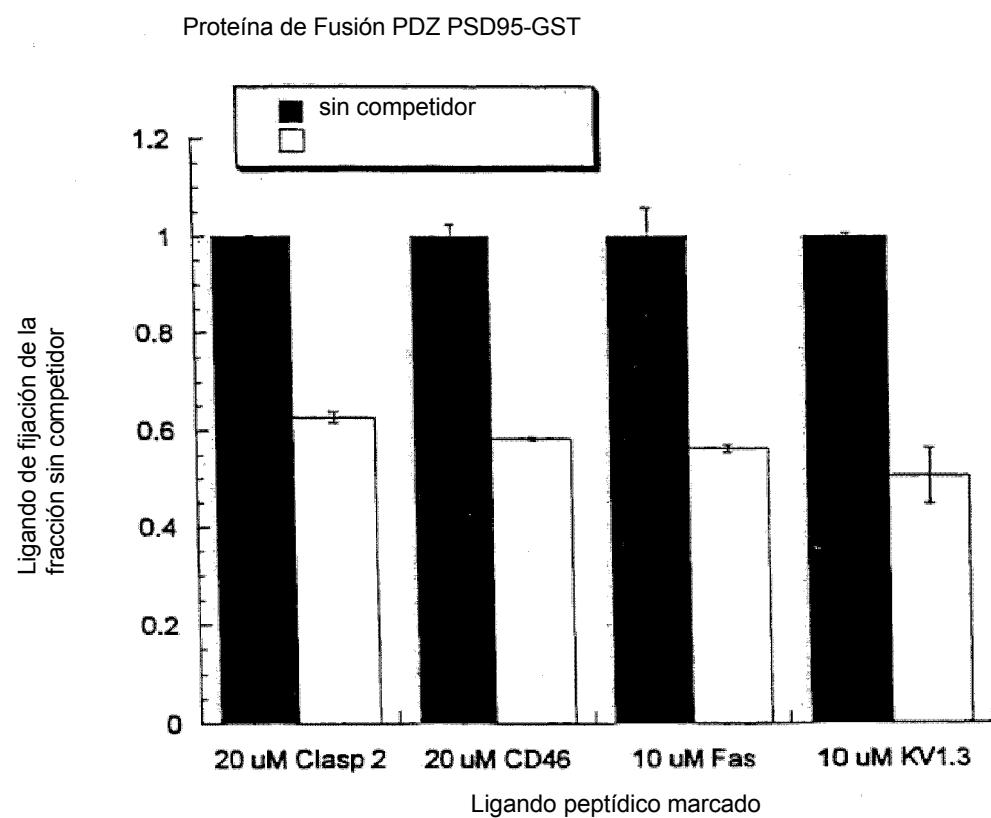
FIG. 3E

FIG. 3F

Proteína de Fusión 41.8 kD-GST

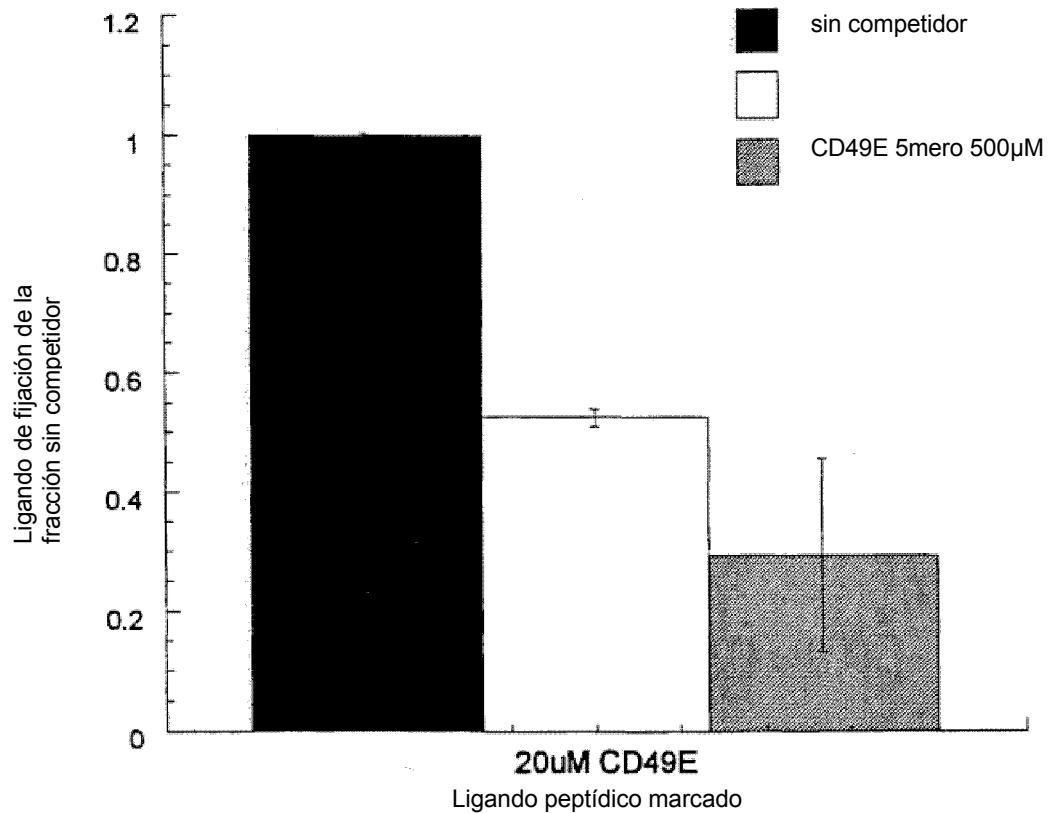


FIG. 4A

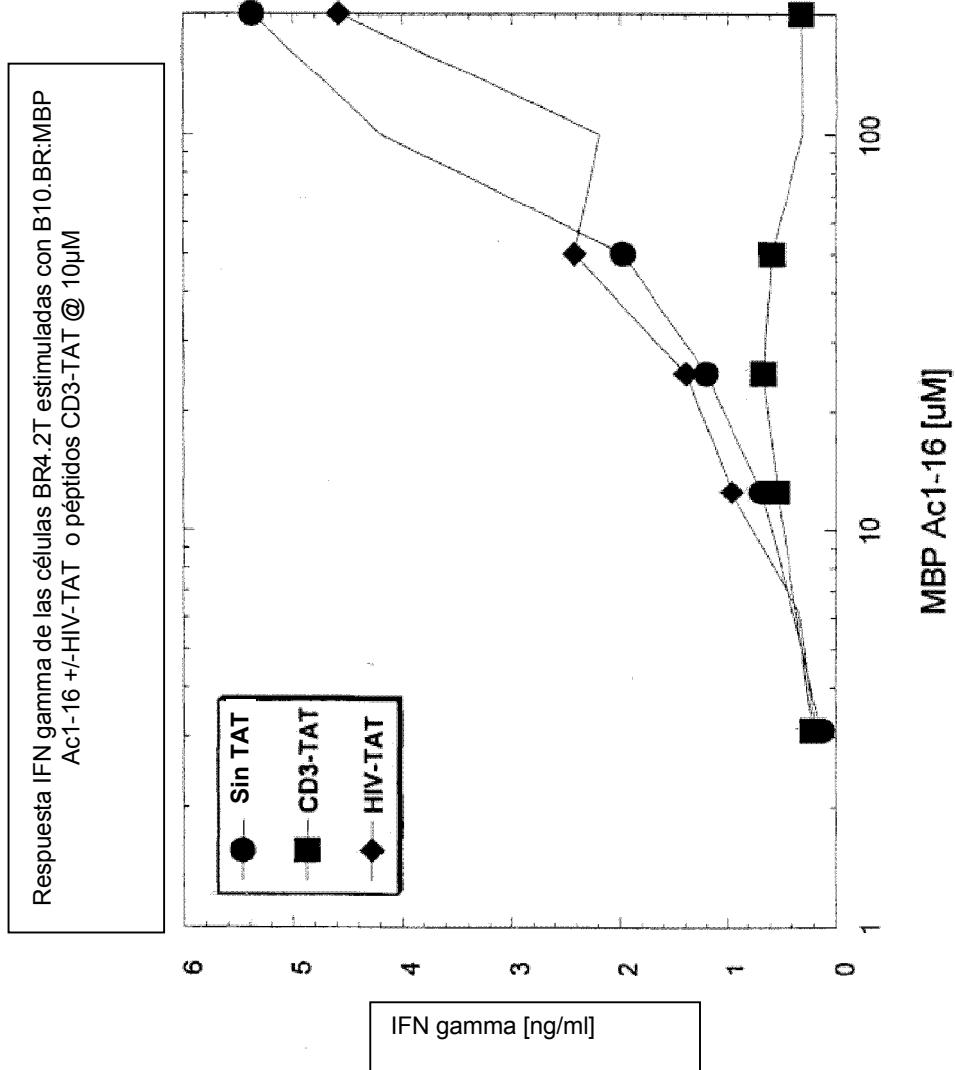


FIG. 4B

