



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 834**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01987213 .4**

96 Fecha de presentación : **15.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1337555**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2003**

54 Título: **Proteínas Bcl-2 mutantes y utilizaciones correspondientes.**

30 Prioridad: **20.11.2000 US 716395**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2009

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72 Inventor/es: **Fesik, Stephen, W.;**
Petros, Andrew, M.;
Yoon, Ho-Sup y
Nettesheim, David, G.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 330 834 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

Proteínas Bcl-2 mutantes y utilizaciones correspondientes.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas Bcl-2 mutantes derivadas de la Bcl-2 humana de tipo salvaje. Las proteínas de la presente invención pueden ser utilizadas en ensayos biológicos para identificar sustancias que bloqueen la capacidad de Bcl-2 para inhibir la muerte celular programada.

10 **Antecedentes de la invención**

La apoptosis o muerte celular programada (de aquí en adelante "PCD") es una característica altamente conservada y esencial del desarrollo y la homeostasis en los organismos superiores. Kelekar y col., *Molecular and Cellular Biology*, 17(12):7040-7046 (1997). La apoptosis es un mecanismo mediante el cual el organismo sustituye las células más viejas por células nuevas sanas, o mediante el cual una célula se destruye a sí misma para impedir la transmisión de errores genéticos a su progenie. En algunos cánceres, por ejemplo, se acepta de manera general que una alteración del crecimiento celular y/o de la muerte celular es debida a la acumulación de varias mutaciones en genes "clave" que regulan estos procesos. El sistema normal es incapaz de eliminar las células que contienen estos genes mutados y tiene como resultado un crecimiento celular incontrolado. Por tanto, la naturaleza aberrante del crecimiento celular o de la apoptosis que se observan en el cáncer y en otras enfermedades, es la consecuencia de un mal funcionamiento de las rutas reguladoras que controlan el equilibrio entre el crecimiento celular y la muerte celular.

Un grupo de moléculas que está implicado en la estimulación o en la supresión de las respuestas apoptóticas es la familia de proteínas Bcl-2. La familia Bcl-2 contiene proteínas que estimulan o inhiben la muerte celular. Algunas de las inhibidoras, referidas frecuentemente como proteínas anti-apoptóticas, incluyen: Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, E1B 19K de adenovirus, BHRF1 del virus de Epstein-Barr y Ced-9 de *Caenorhabditis elegans*. Las promotoras de la muerte celular, referidas frecuentemente como proteínas pre-apoptóticas, incluyen, por ejemplo: Bax, Bak, Bad, Bik, Bid y Bcl-x_S. Una característica importante de la familia Bcl-2 es que sus miembros pueden interactuar (esto es, dimerizar) consigo mismos o con otros miembros de la familia. (Kelekar, *supra*. Ver también Otilie, S. y col., *J. of Biol. Chem.*, 272(49):30866-30872 (1997)). Se cree que estas interacciones proteína-proteína son críticamente importantes para determinar la respuesta de una célula a una señal de muerte (Kelekar, *supra*, ver también Yang y col., *Cell*, 80:285-291 (1995)).

Se ha elucidado la estructura tridimensional del miembro Bcl-x_L de la familia Bcl-2 (Muchmore y col., *Nature*, 381:335-341 (1996)). La estructura de Bcl-x_L contiene dos hélices hidrofóbicas centrales rodeadas por hélices anfifílicas. Un bolsillo de unión hidrofóbico es creado por la proximidad espacial de tres dominios particulares, conocidos como BH1, BH2 y BH3, y proporciona un sitio de unión para las proteínas que estimulan la muerte. Sattler M. y col., *Science*, 275:983-986 (1997). Se sabe también que las proteínas que estimulan la muerte interactúan con este sitio de unión a través de sus dominios BH3. *Id.*

Se conoce en la técnica que la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2 y Bcl-x_L, que están presentes a menudo en células cancerosas y en otras células enfermas, tiene como resultado el bloqueo de las señales apoptóticas y permite que dichas células proliferen. Por ejemplo, se encuentran niveles elevados de expresión del gen de Bcl-2 en una amplia variedad de cánceres humanos. Además, se cree que bloqueando Bcl-2 y Bcl-x_L, puede inducirse la apoptosis en células enfermas y puede proporcionar una terapia eficaz para el cáncer y otras enfermedades causadas por el deterioro del proceso apoptótico. Por tanto, existe en la técnica la necesidad de un ensayo que pueda ser utilizado para identificar compuestos que desencadenen o induzcan la apoptosis mediante la inhibición de las interacciones entre la familia de proteínas Bcl-2.

Se sabe también en la técnica que la Bcl-2 existente en la naturaleza o de tipo salvaje se comporta mal y se agrega cuando es puesta en solución. Tal agregación hace difícil que los investigadores utilicen Bcl-2 en estudios estructurales, tales como cristalografía de rayos X o RMN, que pueden ayudar al diseño de fármacos que bloqueen la capacidad de Bcl-2 para inhibir la muerte celular programada. Adicionalmente, la agregación de Bcl-2 en solución hace también difícil utilizar la proteína Bcl-2 existente en la naturaleza o de tipo salvaje en ensayos para identificar sustancias que bloqueen la capacidad de Bcl-2 para inhibir la muerte celular programada. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar una forma alterada o mutada de Bcl-2 que no se agregue en solución y que pueda ser utilizada en estudios estructurales. Sin embargo, hasta ahora, los esfuerzos para desarrollar tal proteína alterada o mutada no han tenido éxito. Por ejemplo, Anderson y col. en *Protein Expression and Purification*, 15:162-170 (1999), describen el clonaje y la expresión de una Bcl-2 humana recombinante referida como "rhBcl-2". En esta forma mutante de Bcl-2, el supuesto bucle flexible de Bcl-2 ha sido truncado y sustituido por un adaptador flexible que consta de cuatro (4) residuos de alanina. Además, el extremo carboxi hidrofóbico de Bcl-2 está sustituido por seis (6) residuos de histidina. Específicamente, el mutante de Bcl-2 por delección de Anderson y col. puede ser resumido según sigue: Bcl-2₍₆₃₂₎-AAAA-Bcl-2₍₅₆₋₂₀₆₎-HHHHHH. Aunque Anderson y col. pudieron expresar con éxito su mutante en *E. coli* y purificarlo, observaron que el límite de solubilidad de su proteína expresada era menor que el ideal para estudios estructurales basados en rayos X o en RMN bajo las condiciones examinadas. Por ello, existe actualmente la necesidad en la técnica de una forma alterada o mutante de Bcl-2 que pueda ser utilizada en estudios estructurales

basados en rayos X o en RMN. Existe también la necesidad de ensayos de selección para identificar compuestos que sean capaces de unirse a Bcl-2. Tales ensayos de selección pueden ser conseguidos con un mutante de Bcl-2 soluble en agua.

5

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una proteína mutante derivada de una proteína Bcl-2 humana de tipo salvaje. Más específicamente, en las proteínas mutantes de la presente invención, una secuencia de residuos de aminoácidos que comprende un bucle flexible de la proteína Bcl-2 humana de tipo salvaje ha sido sustituida por una secuencia diferente (esto es, por una secuencia de aminoácidos de sustitución) que contiene al menos dos aminoácidos ácidos. Los aminoácidos ácidos pueden ser ácido glutámico o ácido aspártico o una combinación de ambos. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de sustitución comprende una secuencia de al menos una porción de un bucle flexible de la proteína Bcl-x_L humana. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de sustitución comprende la secuencia de la SEC ID N°:1. Una proteína mutante particularmente preferida tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2.

En una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de sustitución de la proteína mutante comprende una secuencia de al menos 4 a 50 residuos de aminoácidos aproximadamente. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de sustitución comprende una secuencia de al menos 16 a 25 residuos de aminoácidos aproximadamente.

Las proteínas mutantes de la invención tienen un punto isoeléctrico menor que el de la Bcl-2 de tipo salvaje. Preferiblemente, el punto isoeléctrico es de 4,5 a 6,0 aproximadamente y, más preferiblemente, de 5,0 a 5,5 aproximadamente. Un punto isoeléctrico particularmente preferido es 5,0.

La presente invención se refiere también a un ensayo para identificar sustancias que se unan a una proteína Bcl-2, comprendiendo el ensayo las etapas de (a) la provisión de una sustancia candidato para ser analizada; (b) la provisión de un péptido marcado que es capaz de unirse estrechamente a una proteína mutante de la invención; (c) la formación de un complejo del péptido marcado con la proteína mutante; (d) la formación de una mezcla de reacción mediante la puesta en contacto de la sustancia candidato con el complejo péptido marcado/proteína mutante; (e) la incubación de la mezcla de reacción bajo condiciones suficientes para permitir que la sustancia candidato reaccione y desplace al péptido marcado y (f) la determinación de la cantidad de péptido marcado que ha sido desplazada de la unión a dicha proteína mutante. Preferiblemente, el péptido es marcado con un radioisótopo, con un resto fluorescente, con un enzima, con una molécula de unión específica o con una partícula. Más preferiblemente, el péptido es marcado con un compuesto de fluoresceína. Muy preferiblemente, el péptido es marcado con isotiocianato de fluoresceína o con 5-carboxi-fluoresceína.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de tipo salvaje para las isoformas 1, 2 y 3 de Bcl-2 (de aquí en adelante Bcl-2/iso1, Bcl-2/iso2 y Bcl-3/iso3, respectivamente) y la secuencia de tipo salvaje de la proteína Bcl-x_L. Las diferencias entre Bcl-2/iso1, Bcl-2/iso2 y Bcl-3/iso3 están resaltadas en negrita. El bucle putativo amorfo (residuos de aminoácidos 35-91) está subrayado.

La Figura 2 muestra una representación en forma de cintas de la Bcl-x_L humana de tipo salvaje. El bucle amorfo está mostrado como la cinta desenrollada que se proyecta a la izquierda en la Figura.

La Figura 3 muestra una representación en forma de cintas de la estructura derivada de RMN de (A) Bcl-2/iso1 y (B) Bcl-2/iso2.

Descripción detallada de la invención

55

I. La Presente Invención

La presente invención se refiere a proteínas Bcl-2 mutantes que no se agregan en solución y que pueden ser utilizadas en ensayos para identificar sustancias que se unan a una proteína Bcl-2.

60

65

ES 2 330 834 T3

II. Listado de Secuencias

La presente solicitud contiene también un listado de secuencias. Para las secuencias de nucleótidos, los pares de bases están representados por los códigos de bases siguientes:

	<u>Símbolo</u>	<u>Significado</u>
5	A	A; adenina
10	C	C; citosina
	G	G; guanina
	T	T; timina
15	U	U; uracilo
	M	A o C
20	R	A o G
	W	A o T/U
	S	C o G
25	Y	C o T/U
	K	G o T/U
30	V	A o C o G; no T/U
	H	A o C o T/U; no G
	D	A o G o T/U; no C
35	B	C o G o T/U; no A
	N	(A o C o G o T/U)

40 Los aminoácidos mostrados en la solicitud están en la forma L y están representados por las abreviaturas de aminoácidos de tres letras siguientes:

	<u>Abreviatura</u>	<u>Nombre del aminoácido</u>
45	Ala	L-Alanina
	Arg	L-Arginina
50	Asn	L-Asparagina
	Asp	L-Ácido Aspártico
55	Asx	L-Ácido Aspártico o Asparagina
	Cys	L-Cisteína
	Glu	L-Ácido Glutámico
60	Gln	L-Glutamina
	Glx	L-Glutamina o Ácido Glutámico
65	Gly	L-Glicina
	His	L-Histidina

ES 2 330 834 T3

Abreviatura	Nombre del aminoácido
Ile	L-Isoleucina
5 Leu	L-Leucina
Lys	L-Lisina
Met	L-Metionina
10 Phe	L-Fenilalanina
Pro	L-Prolina
15 Ser	L-Serina
Thr	L-Treonina
Trp	L-Triptófano
20 Tyr	L-Tirosina
Val	L-Valina
25 Xaa	L-Desconocido u otro

III. *Proteínas de la Presente Invención*

30 La presente invención se refiere a proteínas Bcl-2 mutantes derivadas de la proteína Bcl-2 humana existente en la naturaleza o de tipo salvaje. Más específicamente, las proteínas mutantes de la presente invención son proteínas quiméricas que contienen residuos de aminoácidos derivados de la proteína Bcl-2 humana de tipo salvaje, pero que presentan un menor punto isoelectrico que la proteína de tipo salvaje. Por consiguiente, a diferencia de la proteína Bcl-2 humana existente en la naturaleza o de tipo salvaje, las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención no se agregan en solución. En una realización preferida, las proteínas mutantes de la presente invención contienen residuos de aminoácidos derivados de la proteína Bcl-x_L humana de tipo salvaje así como de la proteína Bcl-2 humana existente en la naturaleza o de tipo salvaje. Como las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención no se agregan cuando son colocadas en solución, estas proteínas pueden ser utilizadas en estudios estructurales de cristalografía de rayos X y de RMN, así como en ensayos para identificar compuestos candidato que bloqueen la capacidad de Bcl-2 para inhibir la muerte celular programada.

Según se utiliza en la presente, el término “punto isoelectrico” o (pI) se refiere al pH al cual la proteína no lleva carga neta. Los puntos isoelectricos de Bcl-2/iso1, Bcl-2/iso2 y Bcl-2/iso3 son 7,0, 7,2 y 7,2 aproximadamente, respectivamente. Las proteínas mutantes de la presente invención tienen un punto isoelectrico menor que el de la Bcl-2 de tipo salvaje y, preferiblemente, en el rango de 4,5 a 6,0 aproximadamente. Más preferiblemente, el punto isoelectrico de una proteína mutante de la invención es de 4,5 a 5,5 aproximadamente. Un punto isoelectrico más preferido es de 5,0 aproximadamente a 5,5 aproximadamente. Un punto isoelectrico muy preferido es 5,0. Los medios para determinar el punto isoelectrico de una proteína son bien conocidos por las personas con experiencia habitual en la técnica.

50 Según se utiliza en la presente, el término proteína Bcl-2 humana “existente en la naturaleza” o “de tipo salvaje”, se refiere a cualquiera de las tres proteínas que son isoformas de la Bcl-2 humana. Estas isoformas están mostradas como SEC ID N^{os}:3, 4 y 5. La proteína mostrada en la SEC ID N^o:3 es referida como “isoforma 1” (Bcl-2/iso1) y está descrita en Tsujimoto, Y. y col., Science, 226:1097-1099 (1984) y Tsujimoto, Y. y col., PNAS, 83:5214-5218 (1986). La proteína mostrada en la SEC ID N^o:4 es referida como “isoforma 2” (Bcl-2/iso2) y está descrita en Cleary, M. y Sklar, K., PNAS, 82:7439-7443 (1985) y Cleary, M. y col., Cell, 47:19-28 (1986). La proteína mostrada en la SEC ID N^o:5 es referida como “isoforma 3” (Bcl-2/iso3) y está descrita en Bakshi, A. y col., Cell, 41:899-906 (1985) y Seto, M. y col., EMBO J., 7:123-131 (1988). Como puede observarse en la Fig. 1, Bcl-2/iso3 difiere de Bcl-2/iso1 y Bcl-2/iso2 en el residuo en posición 48 (F en lugar de I). Bcl-2/iso1 difiere de las otras dos isoformas en los residuos en posición 96 y 110 (A y G en lugar de T y R, respectivamente).

60 Según se utiliza en la presente, el término proteína Bcl-x_L humana “existente en la naturaleza” o de “tipo salvaje”, se refiere a la proteína mostrada en la SEC ID N^o:6 y descrita en Cell, 74:597-608 (1993).

65 Según se utiliza en la presente, el término “aproximadamente”, cuando se utiliza para modificar un punto isoelectrico, significa $\pm 5\%$. Cuando se utiliza para modificar la longitud de una secuencia de aminoácidos, “aproximadamente” significa ± 2 aminoácidos.

ES 2 330 834 T3

La proteína Bcl-x_L humana existente en la naturaleza o de tipo salvaje contiene un bucle flexible amorfo (significando que no presenta una estructura secundaria regular tal como una hélice α o una lámina β) que no es requerido para mantener la integridad de la proteína en solución (Muchmore y col., Nature, 381:335-341 (1996)). Este bucle se encuentra en los residuos de aminoácidos 35-91 (ver la Figura 1 y la SEC ID N°:6). Se conoce en la técnica que la proteína Bcl-x_L conserva su función como proteína anti-apoptótica incluso cuando se elimina este bucle de la proteína. Sobre la base de la homología de secuencias entre Bcl-x_L y Bcl-2, se supone que los residuos 35-91 de Bcl-2 son también amorfos e innecesarios para mantener la integridad de la proteína. Estos bucles amorfos son puntos de modificación post-traduccional tal como fosforilación.

Las proteínas mutantes de la presente invención derivan de la proteína Bcl-2 humana. Específicamente, las proteínas Bcl-2 humanas mutantes de la presente invención tienen los residuos de aminoácidos que forman su bucle flexible amorfo sustituidos por al menos de 4 a 50 residuos de aminoácidos aproximadamente, de los cuales al menos dos son aminoácidos ácidos, esto es, ácido glutámico (Glu) o ácido aspártico (Asp). Los aminoácidos ácidos pueden estar situados en cualquier posición dentro de la secuencia de sustitución. Además, la secuencia de sustitución puede contener sólo un tipo de aminoácido ácido (esto es, dos o más Glus o dos o más Asps) o una combinación de ambos. Según se desea en esta descripción, no existe ningún límite sobre el tipo o sobre el número total de aminoácidos ácidos que comprende la secuencia de sustitución (siempre que contenga al menos dos aminoácidos ácidos).

En una realización preferida, el bucle flexible, amorfo, de la proteína Bcl-2 humana es sustituido por una secuencia de al menos desde 4 a 50 residuos de aminoácidos aproximadamente, correspondientes a una secuencia contigua de residuos de aminoácidos procedente del bucle amorfo de Bcl-x_L, en la que al menos dos de los residuos son aminoácidos ácidos. Más preferiblemente, los residuos de aminoácidos del bucle flexible, amorfo, de Bcl-2 están sustituidos por al menos de 16 a 25 residuos de aminoácidos aproximadamente (de los cuales al menos dos son aminoácidos ácidos) procedentes del bucle flexible, amorfo, correspondiente de la proteína Bcl-x_L humana. Incluso más preferiblemente, la secuencia completa del bucle flexible, amorfo de Bcl-2, que tiene los residuos de aminoácidos 35-91, está sustituida por la secuencia DVEENRTEAPEGTESE (SEC ID N°:1) que codifica una porción del bucle flexible de la proteína Bcl-x_L humana existente en la naturaleza o de tipo salvaje.

Las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención pueden contener de 150 aproximadamente a 180 residuos de aminoácidos aproximadamente.

Un ejemplo de una proteína Bcl-2 mutante preferida de la presente invención incluye, pero no se limita a:

```
MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDDVEENRTEAPEGTESEVVHLALR
QAGDDFSRRYRGDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWGRIVAFFEFGG
VMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHHTWIQDNGGWDAFVELYGPMSR (SEC
ID N°:2) .
```

Según se discutió previamente, las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención no se agregan en solución, a diferencia de la proteína Bcl-2 existente en la naturaleza o de tipo salvaje. Aunque sin desear estar ligados a ninguna teoría, los inventores de la presente invención creen que la sustitución del bucle flexible, amorfo, completo de Bcl-2 por una porción del bucle flexible, amorfo de la proteína Bcl-x_L humana, hace que las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención sean más ácidas y reduce por tanto el punto isoeléctrico de las proteínas Bcl-2 mutantes en comparación con la proteína Bcl-2 existente en la naturaleza o de tipo salvaje. Más específicamente, los inventores encontraron que cuando se eliminaban los residuos de aminoácidos 49-91 del bucle flexible amorfo de Bcl-x_L, esta proteína acortada se comportaba bien en solución y no se agregaba. Se determinó que el punto isoeléctrico de esta proteína Bcl-x_L acortada era de 4,9 aproximadamente. Los inventores eliminaron posteriormente los mismos residuos de aminoácidos (49-91) del bucle flexible, amorfo de Bcl-2. Sorprendentemente, esta proteína acortada no se comportaba bien en solución y mostraba agregación. Se determinó que el punto isoeléctrico de esta proteína Bcl-2 acortada era de 6,4 aproximadamente. Los inventores compararon los bucles acortados de las proteínas Bcl-x_L y Bcl-2 y se dieron cuenta que el bucle acortado de Bcl-x_L contenía más residuos de aminoácidos ácidos que el bucle acortado de Bcl-2, dando así a la proteína Bcl-x_L acortada un punto isoeléctrico más bajo que a la proteína Bcl-2 acortada. Los inventores creen que la diferencia entre los puntos isoeléctricos explica la diferencia en el comportamiento de las dos proteínas.

Las proteínas mutantes de la presente invención tienen un punto isoeléctrico menor de 6,0 aproximadamente, preferiblemente menor de 5,5 aproximadamente. Más específicamente, los inventores encontraron que cuando la secuencia completa del bucle flexible, amorfo de Bcl-2, que tiene los residuos de aminoácidos 35-91, es sustituida por los residuos de aminoácidos DVEENRTEAPEGTESE (SEC ID N°:1) (que representan una porción del bucle flexible de la proteína Bcl-x_L humana existente en la naturaleza o de tipo salvaje), el punto isoeléctrico de esta proteína Bcl-2 mutante es 5,0 aproximadamente. Los inventores creen que esta reducción del punto isoeléctrico de la proteína Bcl-2 mutante de la presente invención, cuando se compara con la proteína Bcl-2 de tipo salvaje, explicaría el porqué las proteínas Bcl-2 mutantes no se agregan en solución.

Las proteínas mutantes de la presente invención pueden ser preparadas utilizando técnicas conocidas en el oficio, tales como las técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifique una proteína Bcl-2 mutante como la descrita anteriormente, puede ser insertada en un vector de ADN adecuado, tal como un plásmido. Más específicamente, la secuencia de nucleótidos puede ser insertada en un vector de ADN adecuado utilizando técnicas conocidas en el oficio, incluyendo, pero sin limitarse a, extremos romos o extremos escalonados para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de los extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligadura con ligasas apropiadas. Las técnicas para tales manipulaciones están descritas en Sambrook, J. y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989). Una vez que ha sido preparada la secuencia de nucleótidos, es insertada en el vector de ADN y el vector es utilizado para transformar un huésped adecuado. La proteína mutante recombinante es producida en el huésped mediante expresión. El huésped transformado puede ser una célula procariótica o eucariótica.

Una vez que las proteínas de la presente invención han sido preparadas, pueden ser sustancialmente purificadas mediante varios procedimientos cromatográficos, incluyendo intercambio iónico, afinidad, exclusión de tamaños o interacción hidrofóbica (ver, Crichton, T., *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y. (1983)). La composición de cualquiera de las proteínas sintéticas de la presente invención puede ser confirmada mediante análisis de aminoácidos o secuenciación (utilizando el procedimiento de degradación de Edman). Las proteínas mutantes de la presente invención pueden ser utilizadas en ensayos de selección. Más específicamente, las proteínas mutantes de la presente invención pueden ser utilizadas para identificar moléculas pequeñas que bloqueen la capacidad de Bcl-2 para inhibir la muerte celular programada.

IV. Ensayos de Selección Utilizando las Proteínas de la Presente Invención

La presente invención se refiere también a una variedad de ensayos de selección para identificar compuestos candidato que sean capaces de unirse a las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención e inhibir así la muerte celular programada. El ensayo de la presente invención se centra en la capacidad o incapacidad de los compuestos candidato para unirse a las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención y desplazar una molécula sonda marcada tal como un péptido.

Los ensayos de selección de la presente invención pueden ser utilizados para someter a selección un gran número de compuestos con el fin de identificar aquellos compuestos que sean capaces de unirse a Bcl-2. Los compuestos que sean identificados como que se unen a Bcl-2 pueden ser utilizados clínicamente como agentes anticancerosos. Específicamente, estos compuestos pueden ser utilizados para estimular la apoptosis en células cancerosas que sobreexpresen Bcl-2 en el tratamiento de ciertos cánceres. Los compuestos que no tengan actividad en los ensayos de selección, pueden ser eliminados de una consideración posterior como compuestos candidato.

Los compuestos candidato que van a ser sometidos a selección pueden incluir numerosas clases químicas. Sin embargo, los compuestos candidato son típicamente moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños con un peso molecular de 150 aproximadamente a 800 daltons aproximadamente. Tales compuestos candidato contendrán grupos funcionales necesarios para una interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluirán al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los compuestos candidato contienen a menudo un carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Pueden encontrarse también compuestos candidato entre las biomoléculas, incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los compuestos candidato puede ser obtenidos de una amplia variedad de fuentes tales como bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, están disponibles, o son producidas fácilmente, bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos sintéticamente son fácilmente modificados mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden ser utilizados para producir bibliotecas combinatorias. Agentes farmacológicos conocidos pueden ser sometidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales.

En los ensayos de unión competitiva, el compuesto candidato puede competir con un analito marcado por la unión específica a lugares en un agente de unión unido a una superficie sólida. En tal ensayo, el analito marcado puede ser un péptido marcado y el agente de unión puede ser la proteína Bcl-2 mutante de la presente invención unida a la fase sólida. La concentración de analito marcado unido al agente de unión es inversamente proporcional a la capacidad del compuesto candidato para competir en el ensayo de unión. La tasa de inhibición del analito marcado por el compuesto candidato depende las condiciones del ensayo de unión y de las concentraciones del agente de unión, del analito marcado y del compuesto candidato que son utilizadas. Bajo condiciones de ensayo especificadas, se dice que un compuesto candidato es capaz de unirse a la proteína Bcl-2 mutante de la presente invención en un ensayo de unión competitiva, si la tasa de unión del analito marcado al agente de unión disminuye un diez por ciento (10%) o más.

ES 2 330 834 T3

En un ensayo de unión directa, un compuesto candidato se une a la proteína Bcl-2 mutante de la presente invención cuando la señal medida es dos veces el nivel de fondo o superior.

5 En un ensayo de unión competitiva, el compuesto candidato compete con los analitos marcados para unirse a la proteína Bcl-2 mutante de la presente invención. Según se describe en la presente, el agente de unión puede estar unido a una superficie sólida para llevar a cabo la separación del analito marcado unido del analito marcado no unido. Alternativamente, la unión competitiva puede ser llevada a cabo en una fase líquida, y puede utilizarse cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en el oficio para detectar la liberación del analito marcado unido o para separar el analito marcado unido del analito marcado no unido. Después de la separación, se determina la cantidad de analito
10 marcado unido. La cantidad de proteína presente en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de analito marcado unido.

Alternativamente, puede llevarse a cabo un ensayo de unión homogéneo, en el cual no es necesaria una etapa de separación. En estos tipos de ensayo, la unión de compuesto candidato a la proteína Bcl-2 mutante tiene como resultado el desplazamiento de un analito marcado y el cambio posterior de la señal emitida por el analito.
15

Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva para detectar compuestos candidato capaces de unirse a las proteínas Bcl-2 mutantes de la presente invención está descrito en el Ejemplo 2 de la presente.

20 Según se discutió aquí anteriormente, los ensayos de selección descritos en la presente emplean una o más moléculas marcadas. La marca utilizada en el ensayo de la presente invención puede proporcionar directamente o indirectamente una señal detectable. Las diferentes marcas que pueden ser utilizadas incluyen radioisótopos, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes, enzimas, moléculas de unión específica, partículas, por ejemplo partículas magnéticas, etcétera. Las moléculas de unión específica incluyen pares tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específica, el miembro complementario está normalmente marcado con una molécula que facilita la detección, de acuerdo con procedimientos conocidos. Además, la unión de estas marcas a las proteínas mutantes de la presente invención se lleva a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en el oficio.
25

30 Una variedad de otros reactivos puede estar también incluida en el ensayo de selección. Éstos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo albúmina, detergentes, etc., que son utilizados para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o reducir interacciones no específicas o de fondo. Pueden utilizarse reactivos que mejoren la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc. La mezcla de componentes es añadida en cualquier orden que proporcione la unión requerida. Las incubaciones se realizan a cualquier temperatura adecuada, típicamente entre 0 aproximadamente y 40°C aproximadamente. Los periodos de incubación son seleccionados para conseguir una actividad óptima. Típicamente, serán suficientes incubaciones de 0,05 y 10 horas aproximadamente.
35

A manera de ejemplo, y no de limitación, se presentarán a continuación ejemplos de la presente invención.
40

Ejemplo 1

45 *Preparación de Proteínas Bcl-2 Mutantes*

Construcción de plásmidos. Se prepararon construcciones de ácido nucleico para producir proteínas Bcl-2 mutantes que fueron posteriormente evaluadas con el fin de determinar su idoneidad para estudios estructurales de RMN. Todos los reactivos utilizados en la producción de estas construcciones fueron obtenidos de fuentes comercialmente disponibles. De manera general, se prepararon fragmentos de ácido nucleico mediante técnicas estándar de PCR y se clonaron en vectores comerciales mediante medios bien conocidos en la técnica. Todas las secuencias fueron confirmadas mediante análisis en un secuenciador de ADN ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores directos e inversos utilizados para amplificar los fragmentos de la PCR están mostrados en la Tabla 1 siguiente.
50
55

60

65

ES 2 330 834 T3

TABLA 1

	Secuencia de los Fragmentos	SEC ID N°:
5	5' -CACTCACCATATGGCTCACGCTGGGAGAACGGGGTACGACAAC-3'	7
	5' -GCGAGCTCTCGAGCTTCAGAGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'	8
10	5' -GCCCCAGAAGGGACTGAATCGGAGGTGGTCCACCTGGCCCTCCGCCAA-3'	9
	5' -CTCAGTACGGTCTCTTCCACATCATCTCCCGCATCCCCTCGTAGCC-3'	10
	5' -CACTCACCATATGGCTCACGCTGGGAGAACGGGGTACGACAAC-3'	11
15	5' -GCGAAGCTCTCGAGCTATCAATCAAACAGAGGCCGCATGCTGGGGCCGTA-3'	12
	5' -GAGGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAAGCCG-3'	13
	5' -CGGCTTGGCGGAGGGTCAGGTGGACCACCTC-3'	14
20	5' -GCCGCTACCGCCGCGACTTCGCCGAG-3'	15
	5' -CTCGGCGAAGTCGCGGCGGTAGCGGC-3'	16

25 Se preparó en primer lugar un fragmento que codificaba los aminoácidos 1-218 de Bcl-2 mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), utilizando un kit de RT-PCR de BOEHRINGER-MANNHEIM, Corp. (Indianapolis, IN). El fragmento fue generado utilizando las secuencias de cebadores SEC ID N°:7 y SEC ID N°:8 y ARNm Daudi (CLONTECH, Palo Alto, CA) como molde, bajo las condiciones sugeridas por el fabricante. El fragmento fue clonado inicialmente en los sitios de NdeI y XhoI del plásmido pET30b (Novagen, Madison, WI) para su expresión. El plásmido resultante fue denominado plásmido A.

30 Se generó posteriormente un segundo plásmido (plásmido B) que contenía fragmentos que codificaban los aminoácidos 1-34 de la SEC ID N°:3 (Bcl-2/iso1), los aminoácidos 29-44 de la SEC ID N°:6 (bucle de Bcl-x_L) y 92-218 de la SEC ID N°:3 (Bcl-2/iso1). Los fragmentos fueron generados con un kit de PCR ExpandLong (BOEHRINGER-MANNHEIM, Corp., Indianapolis, IN) utilizando como cebadores las SEC ID N°s:9 y 10, el plásmido A como molde y las siguientes condiciones de los ciclos: un ciclo a 94°C, 4 minutos, un ciclo a 94°C, 40 segundos, 15 ciclos a 55°C, 45 segundos; 68°C, 6 minutos y 1 ciclo a 72°C, 10 minutos. Las secuencias de los cebadores fueron diseñadas de tal manera que (1) amplificaran en dirección "hacia atrás" con el fin de omitir la secuencia intermedia del plásmido A (que contiene los nucleótidos que codifican los aminoácidos 35-91 de la SEC ID N°:3) y (2) contengan nucleótidos que codifiquen el bucle de Bcl-x_L (aminoácidos 29-44 de la SEC ID N°:6). La ligadura posterior del fragmento amplificado tuvo como resultado el plásmido B.

35 Se construyó un tercer plásmido (plásmido C) que contenía un fragmento que codificaba los aminoácidos 1-34 de la SEC ID N°:3 (Bcl-2/iso1), los aminoácidos 29-44 de la SEC ID N°:6 (bucle de Bcl-x_L) y 92-207 de la SEC ID N°:3 (Bcl-2/iso1). Se generó un fragmento a partir del plásmido B (como molde) utilizando reactivos estándar para PCR, ADN polimerasa Pfu y las SEC ID N°s:11 y 12 como cebadores, con las siguientes condiciones de ciclos: un ciclo a 94°C, 4 minutos, treinta ciclos a 94°C, 30 segundos; 55°C, 45 segundos; 72°C, 2 minutos; un ciclo a 72°C, 10 minutos. El fragmento resultante fue clonado en los sitios de NdeI y XhoI de pET28b (Novagen, Madison, WI), formándose el plásmido C.

40 Para la construcción del plásmido para Bcl-2/iso2 (plásmido D), se utilizó el plásmido C como molde de ADN. La alanina 96 y la glicina 110 fueron cambiadas a treonina 96 y arginina 110, respectivamente, utilizando dos conjuntos de cebadores: SEC ID N°s:13 y 14 (para la mutación de Ala96 a Thr96) y las SEC ID N°s:15 y 16 (para la mutación de Gly110 a Arg110). Las secuencias mutadas fueron obtenidas utilizando el kit "Quick Change kit" de Stratagene® (Stratagene®, La Jolla, CA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

45 *Expresión y purificación de la muteína Bcl-2.* Las muteínas Bcl-2 fueron expresadas en células de *E. coli* BL21 (DE3) cultivadas en medio M9 que contenía ¹⁵NH₄Cl, ¹⁵NH₄Cl más [U-¹³C]glucosa o ¹⁵NH₄Cl, [U-¹³C]glucosa y un 75% de ²H₂O. Las células fueron inducidas con isopropil-D-tiogalactopiranosido 1 mM durante 3 horas a 30°C durante la fase logarítmica media. Las células fueron resuspendidas en Tris-Cl 20 mM, pH 7,8, NaCl 1,5 M, 2-mercaptoetanol 5 mM, y lisadas posteriormente en un Prensa Francesa. La fracción soluble fue cargada sobre una columna de Ni²⁺-agarosa, lavada con el mismo tampón de la columna, lavada posteriormente con imidazol 20 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,8, NaCl 1,5 M, 2-mercaptoetanol 5 mM y, finalmente, eluida con imidazol 500 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 7,8, 2-mercaptoetanol 5 mM.

50 La fracción de Bcl-2 eluida fue tratada con trombina biotilada de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante (Novagen, Madison, WI). Se utilizó trombina biotilada (0,5 unidades) para cortar 1 mg de proteína durante 16 horas a temperatura ambiente. La reacción de corte fue parada mediante la adición de Estreptavidina Agarosa (Nova-

ES 2 330 834 T3

gen, Madison, WI), diluida tres veces con Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, y pasada sobre otra columna de Ni²⁺ preequilibrada. Se recogió la fracción de Bcl-2 no marcada con his que fluía a través de la columna. La muteína Bcl-2 purificada fue concentrada y almacenada a 4°C. Se llevó a cabo la secuenciación proteica N-terminal de la muteína Bcl-2 purificada en un Secuenciador de Proteínas 477A (PE Applied Biosystems, Forster City, CA). La concentración de proteínas fue determinada utilizando un kit para el análisis de proteínas mediante Coomassie de Pierce (Rockford, IL) y UV.

Ejemplo 2

10 *Ensayos de Unión Competitiva para Medir las Afinidades de Péptidos por Bcl-2/iso1*

Se utilizó un ensayo de polarización de fluorescencia competitivo para medir la afinidad de diferentes péptidos por Bcl-2/iso1 (ver la Tabla 2) o Bcl-2/iso2 (ver la Tabla 3). Los ensayos competitivos se llevaron a cabo utilizando como sonda uno de los tres péptidos marcados con fluoresceína siguientes:

- 15 (1) (5-FAM)-AAAAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK (SEC ID N°:17), obtenido de Synpep Corporation, Dublin, CA,
- (2) (5-FAM)-AAAAAQRYGRELRRMSDEFVDSKK (SEC ID N°:18) o
- 20 (3) (FITC)-AAQRYGRELRRMSDEFVR (SEC ID N°:19). Las constantes de disociación de estos péptidos de Bcl-2/iso1 marcados con fluoresceína son ~20 nM, ~50 nM y ~100 nM, respectivamente.

25 Todas las valoraciones fueron automatizadas por medio de un instrumento de diagnóstico clínico de Abbott (IMx, modo FPIA) modificado con un protocolo especial para llevar a cabo las valoraciones. Se obtuvo una serie completa de diluciones de dos veces, compuesta por veinte muestras de 2 ml separadas, mediante la administración de la alícuotas individuales apropiadas a los primeros siete tubos, de alícuotas procedentes de una solución madre diluida intermedia para los siguientes siete tubos y una dilución intermedia más para los seis tubos finales. El tampón de dilución para todas las soluciones madre y muestras fue fosfato de sodio 120 mM a pH 7,55 con un 0,01% de gamma globulina bovina y un 0,1% de azida de sodio. Las concentraciones de las soluciones madre del péptido en DMSO eran 1-4 mM, según se determinó mediante la absorbancia de Trp (D.O. 280 nm), la absorbancia de Tyr (D.O. 293) o mediante análisis de aminoácidos. La concentración final de DMSO para todas las muestras no fue nunca superior al 1%. Se prepararon veinte muestras de 1,8 μ l sin péptido marcado con fluoresceína y se leyeron como blancos. A cada tubo se añadieron 0,2 μ l de una mezcla de Bcl-2, péptido marcado con fluoresceína; los tubos fueron incubados durante 5 minutos a 35°C y leídos posteriormente para determinar la intensidad total y la polarización. Los valores obtenidos para el péptido marcado con fluoresceína libre y unido fueron constantes dentro de un rango de \pm 5 mP. La concentración final de Bcl-2 era de 340 nM. Se realizaron comparaciones con otras concentraciones más bajas de Bcl-2 para el péptido de Bcl-2 de tipo salvaje. Controles adicionales utilizando un tampón que carecía de BGG mostraron que la unión no específica a BGG era despreciable.

Los datos de polarización en estado estacionario pueden ser analizados para extraer las fracciones de ligando fluorescente unido y libre debidas a la aditividad lineal de sus valores de anisotropía, ponderados por sus intensidades fraccionarias respectivas (Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York, NY: Plenum Press 45 (1983)). El ajuste no lineal de curvas por mínimos cuadrados de los datos de valoración a un modelo para la unión en equilibrio simple del péptido marcado con fluoresceína a Bcl-2, fue llevado a cabo mediante ecuaciones de unión estándar programadas, resueltas en términos de unido, libre y valores observados de anisotropía, en el programa de desarrollo de modelos MINSQ (V. 4.03, Micromath Scientific Software). Para determinar las afinidades de péptidos no fluorescentes, se utilizó el procedimiento analítico para la unión por competición en equilibrio tomado de Dandliker y colaboradores, empleando de nuevo MINSQ para el ajuste de las curvas de valoración (Dandliker y col., Methods in Enzymology 74:3-28 (1981)). La confirmación de la validez de estos procedimientos experimentales y de ajuste fue obtenida comparando los resultados después de realizar la unión del péptido marcado con fluoresceína y las valoraciones de la unión competitiva a diferentes concentraciones fijadas de Bcl-2 o de los péptidos marcados con fluoresceína.

55

60

65

ES 2 330 834 T3

TABLA 2

Unión de Péptidos a Bcl-2/iso1

5	Secuencia	SEC ID N°:	K _d (nM)
	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	20	14
	ALWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	21	211
10	NAWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	22	75
	NLAAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	23	39
	AAAAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	17	74
15	NLWGAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	24	159
	NLWAGQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	25	105
	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDAFKK	26	26
20	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSAKK	27	397
	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFAK	28	123
25	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKA	29	22
	GGGAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	30	63
	NLPAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	31	54
30	NLWAAQRYARELRRMSDEFVAAFVKK	32	186
	NLWAAQRYGREARRMSDEFVDSFKK	33	7483
	NLWAAQRYGRELRRMSAEFVDSFKK	34	762
35	QRYGRELRRMSDEFVDSFKK	35	711
	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVD	36	2326

TABLA 3

Unión de Péptidos a Bcl-2/iso2

45	Secuencia	SEC ID N°:	K _d (nM)
	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	20	8
50	GQVGRQLAIIIGDDINR	37	1600

Según muestran las Tablas 2 y 3, las proteínas mutantes de la invención pueden ser utilizadas para identificar compuestos que se unan estrechamente a un miembro de la familia Bcl-2.

55

Ejemplo 3

Determinación de la Estructura de Bcl-2/iso1 y Bcl-2/iso2 por RMN

60 *Espectroscopía de RMN.* Las estructuras de Bcl-2/iso1 y Bcl-2/iso2 solubles fueron determinadas mediante espectroscopía de RMN (ver la Figura 3). Todos los experimentos de RMN fueron adquiridos a 298 K en un espectrómetro de RMN Bruker DRX500, DRX600 o DRX800. Las asignaciones de resonancia de ¹H, ¹³C y ¹⁵N del esqueleto se consiguieron con [¹⁵N, ¹³C, ²H (75%)] Bcl-2 utilizando una serie de experimentos de resonancia triple, desacoplada con deuterio (HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CB, HN(COCA)CB, HNCO y HN(CA)CO) (Yamazaki, T., Lee, W., Arrowsmith, C.H., Muhandiram, D.R. y Kay, L.E. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116, 11655-11666). Las señales de RMN de ¹H y ¹³C de las cadenas laterales fueron asignadas a partir de experimentos HCCH-TOCSY (Clare, G.M. y Gronenborn, A.M. (1994) Methods Enzymol., 239, 349-63), y las asignaciones estereoespecíficas de los grupos metilo

de la valina y de la leucina fueron obtenidas de un análisis de los patrones de acoplamiento ^{13}C - ^{13}C observados para la Bcl-2 marcada con ^{13}C fraccionalmente, dirigida biosintéticamente (Neri, D., Szyperski, T., Otting, G., Senn, H. y Wüthrich, K. (1989) *Biochemistry*, 28, 7510-7516). Las restricciones de la distancia NOE fueron obtenidas a partir de espectros tridimensionales NOESY editados con ^{15}N y ^{13}C (Fesik, S.W. y Zuiderweg, E.R.P. (1988) *J. Magn. Reson.* 78, 588-593, Marion, D., Driscoll, P.C., Kay, L.E., Wingfield, P.T., Bax, A., Gronenborn, A.M. y Clore, G.M. (1989) *Biochemistry*, 29, 6150-6156) adquiridos con un tiempo de mezclado de 80 ms. Los protones de amidas que se intercambiaban lentamente fueron identificados en un espectro de ^{15}N -NSQC registrado inmediatamente después del intercambio de la proteína en un tampón preparado con D_2O . Los acoplamientos dipolares residuales (NH-N y C' - C^α) fueron medidos utilizando versiones no desacopladas del experimento de HNCO en [^{15}N , ^{13}C , ^2H (75%)] Bcl-2 en presencia de 17 mg ml^{-1} del fago Pfl (Tjandra, N. (1999) *Structure*, 7, R205-R211, Hansen, M.R., Mueller, L. y Pardi, A. (1998) *Nature Struc. Biol.*, 5, 1065-1074, Clore, G.M., Starich, M.R. y Gronenborn, A.M. (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 10571-10572).

Cálculos de la Estructura: Las estructuras de Bcl-2 fueron calculadas utilizando un protocolo de hibridación simulada (Brunger, A.T. (1992) X-PLOR Versión 3.1 (Yale University Press, New Haven y London) con el programa CNX (MSI, San Diego). Se empleó un potencial de pozo cuadrado ($F_{\text{NOE}} = 50\text{ kcal mol}^{-1}$) para estrechar las distancias derivadas de NOE. Sobre la base de las intensidades máximas cruzadas, a las restricciones de las distancias derivadas de NOE se les asignaron límites superiores de 3,0, 4,0, 5,0 ó 6,0 Å. Las restricciones de los ángulos de torsión se generaron Φ , Ψ a partir del análisis de los desplazamientos químicos de N, C, C' , C^α y H^α utilizando el programa TALOS (Cornilescu, G., Delaglio, F. y Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR* 13, 289-302). Se aplicó una constante de fuerza de $200\text{ kcal mol}^{-1}\text{ rad}^{-2}$ a todas las restricciones torsionales. Se incluyeron enlaces de hidrógeno explícitos en las hélices α solamente para aquellos residuos que se observó que tenían un intercambio lento de protones de amida. Se empleó el programa PROCHECK para analizar la calidad geométrica de las estructuras calculadas en el conjunto (Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. y Thornton, J.M. (1993) *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291).

La presente invención está ilustrada por medio de la descripción y los ejemplos precedentes. La descripción precedente tiene la intención de ser una ilustración no limitante, ya que muchas variaciones serán obvias a las personas expertas en la técnica a la vista de la misma. Se tiene la intención de que tales variaciones dentro del ámbito y el espíritu de las reivindicaciones adjuntas estén abarcadas todas ellas por las mismas.

Pueden realizarse cambios en la composición, en la operación y en la disposición del método de la presente invención descritas en la presente sin alejarse del concepto y del ámbito de la invención según está definida en las reivindicaciones siguientes.

Cualquier referencia mencionada en la presente es incorporada por referencia.

REIVINDICACIONES

5 1. Una proteína mutante derivada de una proteína Bcl-2 humana de tipo salvaje y que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°:2, en la cual una secuencia de residuos de aminoácidos que codifica un bucle flexible de dicha proteína Bcl-2 humana de tipo salvaje que comprende los aminoácidos 35-91 de dicha proteína Bcl-2 humana, está sustituida por una secuencia de aminoácidos de sustitución que comprende la secuencia de la SEC ID N°:1.

10 2. La proteína mutante de la Reivindicación 1, que tiene un punto isoeléctrico menor que el de la Bcl-2 de tipo salvaje.

3. Un ensayo para identificar sustancias que se unan a una proteína Bcl-2, comprendiendo dicho ensayo las etapas de:

- 15 (a) la provisión de una sustancia candidato para ser analizada;
- (b) la provisión de un péptido marcado que es capaz de unirse estrechamente a dicha proteína mutante de la Reivindicación 1;
- 20 (c) la formación de un complejo del péptido marcado con dicha proteína mutante;
- (d) la formación de una mezcla de reacción mediante la puesta en contacto de la sustancia candidato con el complejo péptido marcado/proteína mutante;
- 25 (e) la incubación de la mezcla de reacción bajo condiciones suficientes para permitir que la sustancia candidato reaccione y desplace al péptido marcado; y
- (f) la determinación de la cantidad de péptido marcado que ha sido desplazado de la unión con dicha proteína mutante.
- 30

4. El ensayo de la Reivindicación 3, en el que el péptido está marcado con radioisótopos, restos fluorescentes, enzimas, moléculas de unión específica o partículas.

35

40

45

50

55

60

65

Bc1-2/iso1	1	MAHAGRTGYD	NREIVMKYIH	YKLSQRGYEW	DAGDVGAAPP	GAAPAPGIFS	50
Bc1-2/iso2		MAHAGRTGYD	NREIVMKYIH	YKLSQRGYEW	DAGDVGAAPP	GAAPAPGIFS	
Bc1-2/iso3		MAHAGRTGYD	NREIVMKYIH	YKLSQRGYEW	DAGDVGAAPP	GAAPAPGFFS	
Bc1-xL		MSMAMSQS	NRELVVDFLS	YKLSQKGYSW	<u>SQFS</u> <u>DVEENR</u>	<u>TEAPEETESE</u>	
Bc1-2/iso1	51	SQPGHTPHPA	ASRDPVARTS	PLQTPAAPGA	AAGPALSPPV	PVVHLALRQA	100
Bc1-2/iso2		SQPGHTPHPA	ASRDPVARTS	PLQTPAAPGA	AAGPALSPPV	PVVHLTLRQA	
Bc1-2/iso3		SQPGHTPHPA	ASRDPVARTS	PLQTPAAPGA	AAGPALSPPV	PVVHLTLRQA	
Bc1-xL		<u>METPSA</u> <u>INGN</u>	<u>PSWHLADSPA</u>	<u>VNGAIGHSSS</u>	<u>LDAREVIP-M</u>	<u>AAVKQALREA</u>	
Bc1-2/iso1	101	GDDFSRRYRG	DFAEMSSQLH	LTPFTARGRF	ATVVEELFRD	GVNWGRIVAF	150
Bc1-2/iso2		GDDFSRRYRR	DFAEMSSQLH	LTPFTARGRF	ATVVEELFRD	GVNWGRIVAF	
Bc1-2/iso3		GDDFSRRYRR	DFAEMSSQLH	LTPFTARGRF	ATVVEELFRD	GVNWGRIVAF	
Bc1-xL		GDEFELRYRR	AFSDLTSQLH	ITPGTAYQSF	EQVWNELEFRD	GVNWGRIVAF	
Bc1-2/iso1	151	FEFGGVMCVE	SVNREMSPLV	DNIALWMTEY	LNRHLHTWIIQ	DNGGWDADFVE	200
Bc1-2/iso2		FEFGGVMCVE	SVNREMSPLV	DNIALWMTEY	LNRHLHTWIIQ	DNGGWDADFVE	
Bc1-2/iso3		FEFGGVMCVE	SVNREMSPLV	DNIALWMTEY	LNRHLHTWIIQ	DNGGWDADFVE	
Bc1-xL		FSFGGALCVE	SVDKEMQVLV	SRIAAMMATY	LNDHLEPWIIQ	ENGGWDTFVE	
Bc1-2/iso1	201	LYGPSMRPLF	DFSWLSLKTLL	LSLALVGACI	TLGAYLGHK		239
Bc1-2/iso2		LYGPSMRPLF	DFSWLSLKTLL	LSLALVGACI	TLGAYLGHK		
Bc1-2/iso3		LYGPSMRPLF	DFSWLSLKTLL	LSLALVGACI	TLGAYLGHK		
Bc1-xL		LYGNNAAAES	RKQGERFNRW	FLTGMTVAGV	VLLGSLFSRK		

Figura 1

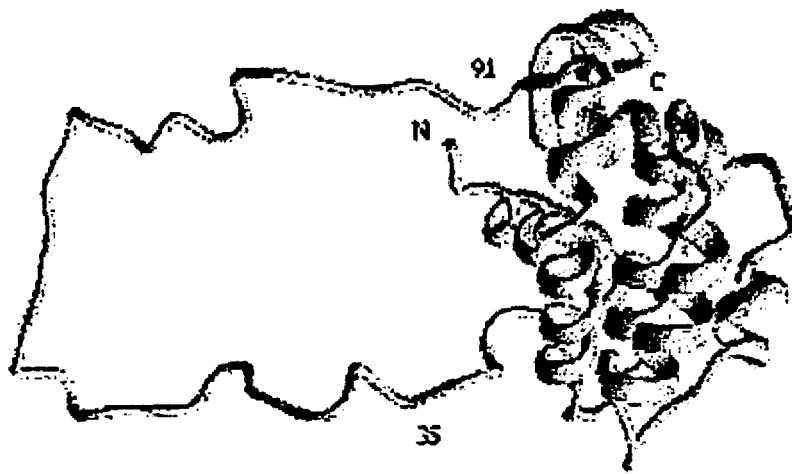


Figura 2

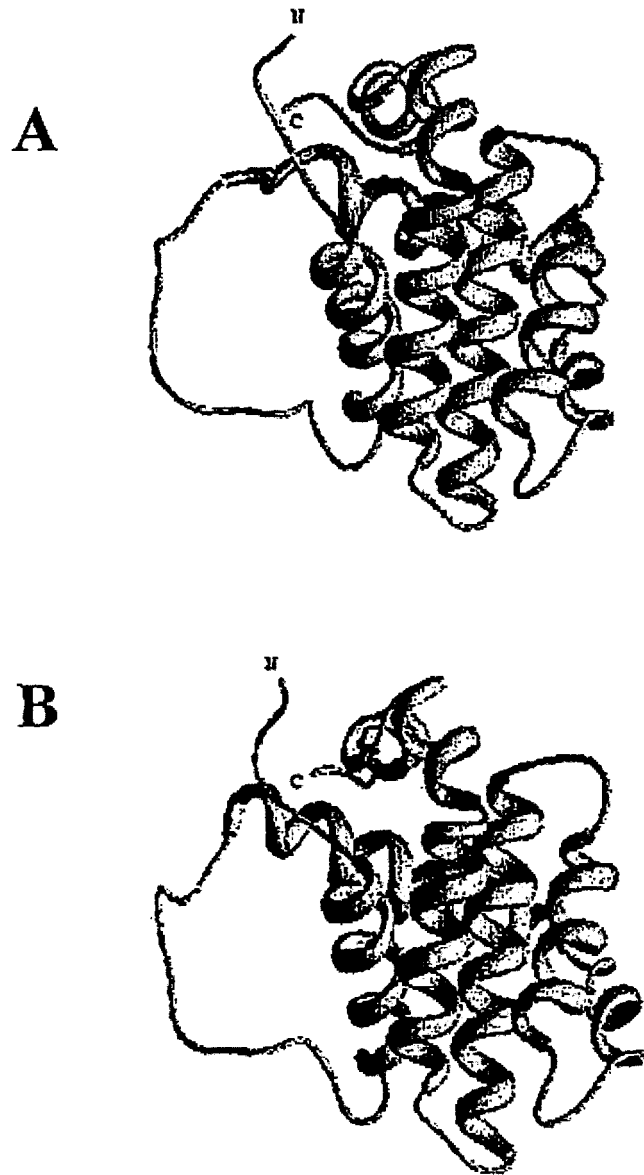


Figura 3

ES 2 330 834 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Abbott Laboratories
Fesik, Steven W
5 Petros, Andrew M.
Yoon, Ho Sup
Nettesheim, David G.

<120> PÉPTIDOS DE BCL-2 MUTANTES Y UTILIZACIONES DE LOS MISMOS

10 <130> 6752.US.01
<140> US 09/716.395
<141> 20-11-2000
<160> 37
15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
20 <211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1
Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu
1 5 10 15

30 <210> 2
<211> 166
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*

<400> 2
40 Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
1 5 10 15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
20 25 30
45 Gly Asp Asp Val Glu Glu Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu
35 40 45
50 Ser Glu Val Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser
50 55 60

55
60
65

ES 2 330 834 T3

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
 115 120 125
 5 Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
 130 135 140
 Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
 10 145 150 155 160
 Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
 165 170 175
 15 Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
 180 185 190
 20 Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
 195 200 205
 Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala
 25 210 215 220
 Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
 225 230 235
 30 <210> 4
 <211> 239
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 40 Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1 5 10 15
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
 45 20 25 30
 Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
 35 40 45
 50 Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
 50 55 60
 Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
 55 65 70 75 80
 Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr
 85 90 95
 60
 65

ES 2 330 834 T3

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe
 100 105 110
 5 Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
 115 120 125
 10 Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
 130 135 140
 Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
 15 145 150 155 160
 Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
 165 170 175
 20 Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
 180 185 190
 Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
 25 195 200 205
 Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala
 210 215 220
 30 Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
 225 230 235
 35 <210> 5
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 5
 Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 45 1 5 10 15
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
 20 25 30
 50 Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
 35 40 45
 Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
 55 50 55 60
 Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
 60 65 70 75 80

65

ES 2 330 834 T3

	<210> 9		
	<211> 48		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
10	<400> 9		
	gccccagaag ggactgaatc ggaggtggtc cacctggccc tccgcaa		48
15	<210> 10		
	<211> 48		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
25	<400> 10		
	ctcagtacgg ttcttcca catcatctcc cgcattccac tcgtagcc		48
30	<210> 11		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 11		
40	cactcaccat atggctcacg ctgggagaac ggggtacgac aac		43
	<210> 12		
45	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador		
	<400> 12		
55	gccaagtctc cgagctatca atcaaacaga ggccgcatgc tggggccgta		50
	<210> 13		
60	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
65	<223> Cebador		

ES 2 330 834 T3

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido

<400> 18

10 Ala Ala Ala Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
15 Asp Glu Phe Val Asp Ser Lys Lys
20

<210> 19

<211> 18

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido

<400> 19

30 Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe
1 5 10 15
Val Arg

35 <210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido

<400> 20

45 Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
50 Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

55 <210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Péptido

65

ES 2 330 834 T3

<400> 21
Ala Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

10 <210> 22
<211> 25
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido

20 <400> 22
Asn Ala Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
25 Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

30 <210> 23
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Péptido

40 <400> 23
Asn Leu Ala Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
45 Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
20 25

50 <210> 24
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> Péptido

<400> 24
Asn Leu Trp Gly Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
60 1 5 10 15
Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
65 20 25

<210> 25
<211> 25

ES 2 330 834 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido

<400> 25

```
10      Asn Leu Trp Ala Gly Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
      1           5           10           15
      Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys
15           20           25
```

<210> 26

<211> 25

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido

<400> 26

```
30      Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
      1           5           10           15
      Asp Glu Phe Val Asp Ala Phe Lys Lys
35           20           25
```

<210> 27

<211> 25

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Péptido

<400> 27

```
50      Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
      1           5           10           15
      Asp Glu Phe Val Asp Ser Ala Lys Lys
      20           25
```

55

<210> 28

<211> 25

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Péptido

ES 2 330 834 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

5

<400> 32

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Ala Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser

10

1 5 10 15

Asp Glu Phe Val Ala Ala Phe Lys Lys

20 25

15

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

25

<400> 33

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Ala Arg Arg Met Ser

30

1 5 10 15

Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys

20 25

35

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

45

<400> 34

Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser

1 5 10 15

50

Ala Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys

20 25

55

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Péptido

65

ES 2 330 834 T3

<400> 35
Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp
1 5 10 15
5 Ser Phe Lys Lys
20

10 <210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<223> Péptido

20 <400> 36
Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser
1 5 10 15
25 Asp Glu Phe Val Asp
20

<210> 37
30 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Péptido

<400> 37
40 Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg
1 5 10 15

45

50

55

60

65