



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 927**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02784827 .4**
86 Fecha de presentación : **22.06.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1410040**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Método para la identificación de sustancias que modulan la señalización de la interleucina (IL-4).**

30 Prioridad: **13.07.2001 EP 01117097**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es:
Boehringer Ingelheim International GmbH
55216 Ingelheim, DE

72 Inventor/es: **Pfitzner, Edith y**
Litterst, Claudia

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 275 927 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

Método para la identificación de sustancias que modulan la señalización de la interleucina (IL-4).

5 **Introducción**

La presente invención pertenece al ámbito de la identificación de sustancias farmacéuticamente activas y al uso de tales sustancias para la terapia en particular de enfermedades tumorales y con preferencia de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias.

10 La señalización dependiente de la IL-4 desempeña un papel importante en las enfermedades tumorales y en la regulación de las respuestas inmune y/o antiinflamatoria de las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias, por ejemplo del asma. La IL-4 regula las respuestas inmune y antiinflamatoria. Favorece la diferenciación de los precursores de auxiliar T (T helper) hacia el linaje Th2, al tiempo que inhibe el desarrollo del Th1. Además, la estimulación de células B por parte de la IL-4 dispara la clasificación de la inmunoglobulina, dirigiéndola al isotipo IgE. Se cree que esta recombinación se inicia después de la activación transcritiva del promotor ϵ de línea germinal, que conduce a la generación del transcrito ϵ estéril. La mayor parte de las funciones reguladas por la IL-4 están mediadas por el transductor de señales y activador de transcripción 6 (STAT6).

20 El STAT6 pertenece al grupo de proteínas STAT, que transmite señales de receptores de citocina activada al núcleo. Después de su fosforilación de tirosina, inducida por citocina, ejercida por las quinasas de Janus (JAK). Los STAT se dimerizan y se trasladan al núcleo, donde modulan la transcripción mediante elementos de secuencia de DNA específicos (Darnell 1997; Darnell y col., 1994; Ihle, 1996). Hasta el momento se han identificado siete STAT de mamífero (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6). Comparten la misma estructura de dominios funcionales. La porción N-terminal media en la fijación cooperativa de múltiples posiciones de DNA (Vinkmeier y col., 1996; Xu y col., 1996). La región que determina la especificidad de la posición de fijación del DNA está situada entre los aminoácidos 400 y 500 (Horvath y col., 1995). El dominio SH2 media en la asociación con el receptor activado (Greenlund y col., 1994; Stahl y col., 1995) y en la dimerización a través de la interacción recíproca con la SH2-fosfotirosina (Schindler y col., 1995; Shuai y col., 1994). La parte C terminal constituye el dominio de transactivación (Darnell, 1997; Hoey y Schindler, 1998). Los STAT3 y STAT5 se expresan en la mayoría de tipos de células y se activan por parte de una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento, mientras que otras proteínas STAT desempeñan papeles específicos en defensas de hospedantes (Darnell, 1997). El STAT6 se activa en respuesta a la IL-4 (Hou y col., 1994) y a la IL-13.

35 Los ratones deficientes en STAT6 tienen defectos en las funciones mediadas por la IL-4, incluido el desarrollo de Th2, la inducción de expresión de clase II de CD23 y MHC, la dirección de la clase de las inmunoglobulinas a la IgE, poniendo de manifiesto el papel esencial que desempeña el STAT6 en estas funciones inducidas por la respuesta a la IL-4 (Kaplan y col., 1996; Shimoda y col., 1996). Se han identificado las posiciones de fijación del STAT6 en varios genes de respuesta a la IL-4. Están perfectamente caracterizados en el promotor ϵ de línea germinal de Ig, que contiene un elemento de fijación compuesto del STAT6 y del CAAT/mejorador-proteína de fijación (C/EBP) (Delphin y Stavnezer, 1995).

45 Se ha caracterizado el dominio de transactivación del STAT6 como una región modular, rica en prolina, del extremo C de la proteína. La estructura de este dominio es totalmente diferente de la de otros miembros del grupo STAT (Lu y col., 1997; Moriggl y col., 1997). Recientemente se han mapeado dos dominios distintos de activación de transcripción del extremo C, que cooperan recíprocamente entre sí (Goenka y col., 1999). Todavía no se ha definido el mecanismo molecular de esta cooperación.

50 La activación de la transcripción en general requiere el reclutamiento de co-activadores transcripcionales, que forman parte de los complejos de remodelación de cromatina que poseen actividades de acetil-transferasa de histonas y sirven de puente para el aparato transcripcional básico (Hampsey y Reinberg, 1999). Se ha podido identificar que la proteína (CBP) que fija los co-activadores conservados funcionalmente CREB y el p300 son reclutados por el STAT6 y se requieren para la inducción transcripcional operada por al IL-4 (Gingras y col., 1999). Los p300/CBP son reclutados también por diferentes grupos de factores de transcripción, incluidos los receptores nucleares (NR), el AP-1, p53, la subunidad p65 del NF κ B y el STAT1, STAT2 y STAT5 (Goodman y col., 2000; Pfitzner y col., 1998).

60 Se ha identificado el grupo NCoA (co-activadores nucleares), también llamado grupo de coactivadores p160 o SRC (coactivador receptor de esteroides), como proteínas de fijación de NR (receptores nucleares), que mejoran la activación transcripcional de estos factores de transcripción inducidos por ligando (Xu y col., 1999). Se han identificado tres factores homólogos, llamados NCoA-1/SRC-1 (Onate y col., 1995; Kamei y col., 1996); NCoA-2/TIF2/GRIP1 (Voegel y col., 1996; Hong y col., 1997) y p/CIP/ACTR/AIB1 (Torchia y col., 1997; Chen y col., 1997; Anzick y col., 1997). Los factores NCoA pueden asociarse también con el p300/CBP (Kamei y col., 1996; Yao y col., 1996).

65 Existe una demanda constante de desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades tumorales y de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias. Las enfermedades tumorales y los síntomas de las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias pueden atribuirse a la señalización de la IL-4. Existe por tanto demanda de fármacos que modulen la señalización de la IL-4 con el fin de eliminar una base de dichas enfermedades y de los síntomas de los procesos inflamatorios. Por lo tanto, se han realizado los ensayos de exploración para identificar

modulares de la actividad de STAT6. Actualmente, estos ensayos de STAT6 están restringidos a la exploración de moduladores de la fijación del STAT6 a un receptor de STAT6 (WO 99/50283). Pero, la presente invención proporciona otro punto de partida para tal ensayo de exploración, ya que se ha identificado una nueva interacción proteína-proteína en la señalización del STAT6.

5

Descripción de la invención

En la presente invención se ha encontrado que la actividad biológica del STAT6, que activa la presión genética en respuesta a la IL-4, se mejora fuertemente con el NCoA-1 (coactivador nuclear 1) del que es dependiente, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, como se demuestra en el ejemplo 2.

10

De modo sorprendente, el NCoA-1 interacciona directamente con el STAT6, mientras que ningún otro miembro del grupo de coactivadores NCoA se fija al STAT6. La sobreexpresión del dominio del NCoA-1 que interacciona con el STAT6 inhibe la transactivación del STAT6 de una manera transdominante. El NCoA-1 se fija independientemente a una parte específica del dominio de transactivación del STAT6.

15

La identificación de la transactivación del NCoA-1 con el STAT6 proporciona una base para una gran variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método y/o un sistema de ensayo para determinar si una sustancia puede modular, es decir, si actúa como inhibidor o de activador de la señalización dependiente de la IL-4. Dicha sustancia puede modular, es decir, actúa como un inhibidor o un activador de una actividad biológica del STAT6.

20

El uso de la presente invención puede proporcionar una base para composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento de animales o de seres humanos que sufran una enfermedad tumoral o una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, por ejemplo el asma.

25

Una “enfermedad tumoral” es cualquier enfermedad acompañada del desarrollo de un tumor maligno o benigno, por ejemplo el linfoma de Hodgkin.

30

La expresión “actividad biológica del STAT6” empleada a continuación incluye, por ejemplo la interacción del STAT6 y la fijación del STAT6 sobre factores distintos del STAT6, que son necesarios para inducir la transcripción. El significado preferido de la expresión “actividad biológica del STAT6” en el contexto de la invención es inducir la transcripción como resultado de la señalización del IL-4, el significado más preferido es la interacción del STAT6 con el NCoA-1 y la fijación a este último, que se traduce en la formación de un complejo como requisito previo para inducir la transcripción de genes con elementos de respuesta al STAT6, con preferencia en una enfermedad tumoral o en una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias.

35

La invención se refiere además a equivalentes funcionales, por ejemplo alelos, derivados, variantes, mutantes y fragmentos de STAT6 de origen natural, que tienen la capacidad de interactuar con y de fijarse sobre el NCoA-1. En este sentido es especialmente preferido un fragmento del STAT6 que contenga por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 (SEQ ID NO: 2), con mayor preferencia un fragmento que contenga por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 (SEQ ID NO: 5). (Se describe además un fragmento que contiene por lo menos un fragmento de la secuencia SEQ ID NO: 5 que se extiende desde el aminoácido 794 a 814 (en el sistema de numeración de la SEQ ID NO: 5, esta se extiende desde el aminoácido 3 al 23), que se representa en la SEQ ID NO: 6.) Tal fragmento puede fusionarse con otra secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, tal derivado puede ser un polipéptido de fusión que contenga p.ej. una parte de la glutatióna-S-transferasa fusionada por lo menos con los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6, tal como se ilustra en la SEQ ID NO: 1.

45

La expresión “en condiciones en las que el STAT6 y el NCoA-1 son capaces de formar un complejo” empleada a continuación incluye, pero no se limita a las condiciones, que se definen en el ejemplo 1.

50

La actividad biológica del NCoA-1 según la presente invención, es decir, mejora de la actividad biológica del STAT6, con preferencia en una enfermedad tumoral o en una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, depende por ejemplo de la interacción del NCoA-1 con el STAT6, con preferencia la fijación directa de ambas proteínas.

55

La invención se refiere también a equivalentes funcionales, como son los alelos, derivados, variantes por ejemplo la secuencia homóloga de aminoácidos humana, mutantes y fragmentos de NCoA-1 de origen natural, que tienen la capacidad de interactuar y también de fijarse sobre el STAT6. En una forma preferida de ejecución, la presente invención se refiere a un fragmento del NCoA-1 que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1, representado en la SEQ ID NO: 4. Tal fragmento puede fusionarse con otra secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, tal derivado puede ser un polipéptido de fusión que contenga p.ej. una parte del sitio de rotura de trombina-proteasa, un sitio de enteroquinasa y compuesto llamado “marcador de histidina” (His tag) que contiene varios restos histidina en una fila (Janknecht y col., 1991) fusionados por lo menos con los aminoácidos de 212 a 462 del NCoA-1, representados en la SEQ ID NO: 3. En una forma preferida de ejecución, el NCoA-1 o un fragmento del mismo se marca con un marcador detectable, por ejemplo fusionado a un “marcador de histidina”.

60

65

En una forma de ejecución, la presente invención se refiere a un método que puede llevarse a cabo en un sistema celular y también en un sistema exento de células para determinar si una sustancia es capaz de modular la interacción

ES 2 275 927 T3

del STAT6 con el NCoA-1, con preferencia un método para determinar si una sustancia es un activador, es decir facilita la interacción de ambos péptidos, o bien es un inhibidor, es decir, impide dicha interacción. Este método se caracteriza porque se pone en contacto el STAT6 o fragmentos o derivados del mismo, que tienen la capacidad de fijarse sobre el NCoA-1, con el NCoA-1 o con fragmentos o derivados del NCoA-1, que tienen la capacidad de fijarse sobre el STAT6 en las condiciones en las que el STAT6 y el NCoA-1 o sus fragmentos o derivados son capaces de formar un complejo y dicho complejo puede utilizarse para inducir un resultado medible. Dicho resultado se mide en ausencia o presencia de la sustancia de interés y se comparan los resultados obtenidos. Los resultados iguales determinan que la sustancia no modula dicha interacción, mientras que un resultado que sigue un curso paralelo al de cantidades crecientes de dicho complejo, cuando se compara con el resultado obtenido en ausencia de sustancia, indica que la sustancia puede actuar como indicador según la invención. Un resultado que corre paralelo a cantidades menores indica que una sustancia puede actuar como inhibidor según la invención. En la presente invención, la medición de un resultado supone la aplicación de técnicas ya conocidas para detectar que el STAT6 y el NCoA-1 o fragmentos o derivados de los mismos según la invención han interactuado según la invención. Por ejemplo, la detección directa de un complejo formado según la invención puede realizarse p.ej. mediante métodos físicos o por fijación de otra molécula que reconozca el complejo, p.ej. anticuerpos o similares. Para dicho reconocimiento pueden utilizarse el STAT6, el NCoA-1 marcados o sin marcar, o fragmentos o derivados de los mismos, por ejemplo uno de dichos polipéptidos interaccionantes puede marcarse p.ej. con un marcador de histidina fusionado, que contiene p.ej. por lo menos cinco restos consecutivos de histidina, y puede reconocerse por una molécula que se fije específicamente sobre el marcador, es decir un anticuerpo específico de histidina. Dicho anticuerpo puede detectarse con técnicas bien conocidas, p.ej. empleando un segundo anticuerpo que esté ya fijado p.ej. sobre una enzima que es capaz de catalizar una reacción medible, por ejemplo mediante la detección de productos de reacción, como son los sustratos modificados o los productos secundarios p.ej. los que emiten luz.

Tal método consiste en los pasos siguientes:

(a) fijación de un primer polipéptido, que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5, sobre un soporte sólido que está presente en un recipiente o parte de tal recipiente;

(b) adición de la sustancia de interés o de un falso control, opcionalmente en un disolvente idóneo;

(c) adición de un segundo polipéptido, marcado de modo detectable, que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4, en condiciones que permitan que dichos polipéptidos se fijen uno sobre otro;

(d) eliminación del segundo polipéptido no fijado;

(e) medición de la cantidad de segundo polipéptido, marcado de modo detectable, fijado sobre el primer polipéptido;

o puede constar de los pasos siguientes:

(a) fijación de un primer polipéptido, que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4, sobre un soporte sólido que está presente en un recipiente o parte de tal recipiente;

(b) adición de la sustancia de interés o de un falso control, opcionalmente en un disolvente idóneo;

(c) adición de un segundo polipéptido, marcado de modo detectable, que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5, en condiciones que permitan que dichos polipéptidos se fijen uno sobre otro;

(d) eliminación del segundo polipéptido no fijado;

(e) medición de la cantidad de segundo polipéptido, marcado de modo detectable, fijado sobre el primer polipéptido.

La presente invención se refiere a un método de ensayo para determinar si una sustancia es un activador o un inhibidor de dicha interacción según la invención. Dado que la interacción del STAT6 con el NCoA-1 dispara la señalización de la IL-4 e interviene en una enfermedad tumoral o en una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y desempeña un papel importante en la mediación de la inflamación, se podrá emplear una sustancia que module la actividad biológica del STAT6 y/o del NCoA-1 para el tratamiento de una enfermedad tumoral, por ejemplo un linfoma de Hodgkin, o una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, por ejemplo el asma, o podrá emplearse como compuesto principal para la optimización de la función de la sustancia de manera que la sustancia optimizada sea idónea para tratar una enfermedad tumoral, por ejemplo un linfoma de Hodgkin, o una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias, por ejemplo el asma.

La presente invención se refiere además a un método de ensayo para determinar si una sustancia es un activador o un inhibidor de la interacción del STAT6 con el NCoA-1. Un sistema de ensayo útil para llevar a cabo un método de la

ES 2 275 927 T3

invención puede consistir en un sistema celular o en un sistema sin células. Por ejemplo, una forma de ejecución de la invención se refiere a un sistema de ensayo que se diseña de tal manera que permita ensayar las sustancias que actúan en la interacción del STAT6 con el NCoA-1 o fragmentos o variantes o derivados de los mismos según la invención, p.ej. empleando la expresión de un gen informante (reporter), p.ej. un gen de luciferasa o similares, como resultado medible regulado por un elemento de respuesta al STAT6.

Un método según la invención puede por un lado ser útil para ensayos de alta productividad, idóneos para determinar si una sustancia es un inhibidor o un activador de la invención, pero también p.ej. para ensayos secundarios o validaciones de una sustancia principal o un blanco (objetivo) identificado en el ensayo de alta productividad.

Para llevar a la práctica el método de la invención puede utilizarse un sistema de ensayo según la invención.

Un sistema de ensayo de la invención puede contener elementos bien conocidos de la técnica. Dicho sistema de ensayo se diseña de manera que permita medir la interacción del STAT6 con el NCoA-1 o fragmentos o derivados según la invención, que puede realizarse inmovilizando uno de los polipéptidos que interactúan sobre una superficie sólida, con preferencia sobre el fondo de un recipiente, con mayor preferencia en una placa ELISA. El otro polipéptido, con preferencia marcado de modo detectable, con mayor preferencia marcado con un marcador de histidina, así como la sustancia de interés o un falso control, opcionalmente en un disolvente idóneo, se añade en condiciones que permitan que ambos polipéptidos se fijen entre sí. Antes de detectar la interacción de dichos polipéptidos según la invención, es decir, antes de detectar el complejo formado, se podrán eliminar los polipéptidos no fijados para facilitar la detección de dicho complejo, que puede realizarse midiendo la cantidad de segundo polipéptido, marcado de modo detectable, que se ha fijado sobre el primer polipéptido. Tal sistema de ensayo para determinar si una sustancia es un activador o un inhibidor de la interacción del STAT6 con el NCoA-1 puede consistir p.ej. en:

(a) el STAT6 o fragmentos o derivados del mismo que tienen la capacidad de fijarse sobre el NCoA-1;

(b) el NCoA-1 o fragmentos o derivados del mismo que tengan la capacidad de fijarse sobre el STAT6;

(c) un recipiente, en el que dicho STAT6 o fragmentos o derivados del mismo puedan formar un complejo con dicho NCoA-1 o fragmentos o derivados del mismo;

(d) un dispositivo para medir dicho complejo.

Dicho sistema de ensayo incluye un primer polipéptido, que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos los aminoácidos del 792 al 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5; y un segundo polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4.

La presente invención puede proporcionar una base para establecer que una sustancia determinable o determinada en un método según la invención es un inhibidor o un activador de la interacción del STAT6 con el NCoA-1 según la invención. Tal sustancia puede ser cualquier compuesto que sea capaz de activar o con preferencia inhibir una función de dicha interacción según la invención. Un ejemplo del modo de activar o inhibir una función de dicha interacción es por fijación sobre uno de los polipéptidos en cuestión con una afinidad mayor y de este modo bloquear el dominio de fijación y/o un dominio funcional por lo menos de uno de dichos polipéptidos, lo cual puede realizarse de forma reversible o irreversible, en función de la naturaleza de la sustancia aplicada. Dicha sustancia puede ser un anticuerpo o un compuesto inorgánico u orgánico que se fije directamente sobre o que interfiera en dicha interacción y, de este modo, afecte la actividad biológica del STAT6. Tal sustancia puede ser un péptido 1 (SEQ ID NO: 6) o un anticuerpo dirigido contra el péptido 1.

Para ilustrar el modo con el que los expertos, aplicando las enseñanzas de esta invención y utilizando los métodos de la invención, podrán identificar fácilmente dicha sustancia se describen los ejemplos siguientes.

Como ejemplo se describe un péptido denominado "péptido 1" (SEQ ID NO: 6), del que se ha constatado que modula la interacción del STAT6 con el NCoA-1, utilizando un método de la invención y se ha determinado que es un inhibidor de dicha interacción empleando un método de la invención, que se describe en el ejemplo 1a).

En otro ejemplo de dicha sustancia de la invención se describen dos sueros de anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido 1. Dichos sueros se denominan "AB 1a" y "AB 1b" y se ha constatado que son inhibidores de la interacción del STAT6 con el NCoA-1 según la invención, en ambos casos, empleando para ello un método de la invención, que se describe en el ejemplo 1b).

Con el siguiente ejemplo 1 se pretende ilustrar la presente invención, pero no debe entenderse como una limitación de la misma. Sin embargo, en el ejemplo 1 se describen las formas de ejecución más preferidas de la invención.

ES 2 275 927 T3

Ejemplos

Ejemplo 1

5 ELISA de STAT6/NCoA-1

Lo que sigue es una ilustración del modo con que puede realizarse la interacción del STAT6 con el NCoA-1 con vistas a identificar una sustancia que pueda modular dicha interacción.

10 Soluciones

Tampón de recubrimiento: 1xPBS, pH 7,2

Tampón de bloqueo: 1xPBS, pH 7,23, 5% de BSA, 0,1% de Tween 20

15

Tampón de lavado: 1xPBS, pH 7,2, 0,1% de Tween 20

20 Solución de sustrato: se disuelve una tableta de tampón fosfato-citrato (Sigma) en 100 ml de agua para obtener un tampón 0,05 M fosfato-citrato, pH 5,5. Se disuelve una tableta del diclorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma) en 30 ml de tampón fosfato-citrato en la oscuridad. Antes del uso se añaden 30 μ l de H₂O₂ del 30%.

Proteínas recombinantes

25 Los aminoácidos 677-847 del GST-STAT6 y los aminoácidos 212-463 del NCoA-1 marcado con His se expresan en *E. coli*, se purifican por cromatografía de afinidad y se dializan frente a 1xPBS con arreglo a métodos de la técnica.

Secuencias de proteínas recombinantes

aminoácidos 677-847 del GST-STAT6: SEQ ID NO: 1;

30

aminoácidos 212-463 del NCoA-1 marcado con His: SEQ ID NO: 3;

Anticuerpos

35 1er anticuerpo: penta-His, Qiagen (nº de catálogo: 34660);

2º anticuerpo: Ig de oveja antirratón, fijada sobre HRP, Amersham-Pharmacia (nº de catálogo: NA931).

Preparación de la placa

40

- Se transfieren 500 ng de los aminoácidos 677-847 del GST-STAT6 en 100 μ l de tampón de recubrimiento a la placa ELISA. Se sella la placa y se incuba a 4°C durante una noche.

45 - Se lavan los hoyos 3 veces con tampón de lavado (200 μ l), incubando la solución de lavado durante 5 minutos. Después del último lavado se quita cualquier resto de tampón de lavado.

- Se bloquean las placas añadiendo 200 μ l de tampón de bloqueo (200 μ l). Se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas.

50 - Se lavan los hoyos 3 veces con tampón de lavado (200 μ l) (ver antes).

- Se añade la sustancia de interés o un falso control en un volumen de 100 μ l en tampón de lavado.

55 - Se añaden 250 ng de los aminoácidos 212-463 del NCoA-1, marcados con His, en un volumen de 100 μ l en tampón de lavado. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación constante.

- Se lavan los hoyos 3 veces con tampón de lavado (200 μ l) (ver antes).

60 - Se añade el anticuerpo de detección (anticuerpo Penta-His, de Qiagen, dilución = 1:2000 en tampón de bloqueo) en un volumen de 100 μ l. Se incuba durante 1 hora.

- Se lavan los hoyos 3 veces con tampón de lavado (200 μ l) (ver antes).

65 - Se añade el anticuerpo secundario (anticuerpo de oveja antirratón, conjugado con HRP, Amersham-Pharmacia, 1:2000 en tampón de bloqueo) en un volumen de 100 μ l. Se incuba durante 1 hora.

- Se lavan los hoyos 5 veces con tampón de lavado (200 μ l) (ver antes). Se añaden 100 μ l de la solución de sustrato a cada hoyo. Se incuba en la oscuridad durante 6 minutos. Se interrumpe la reacción añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ 1 N.

ES 2 275 927 T3

Se determina la densidad óptica de cada hoyo al cabo de 15 minutos, empleando un lector de ELISA ajustado a 450 nm.

La señal leída indica la cantidad de NCoA-1 que se ha fijado al STAT6. Los valores se recogen en la tabla 1.

TABLA 1

NCoA-1 (aa. 212-463) marcado con His y fijado sobre el GST-STAT6 (aa. 677-847) en un ensayo ELISA

nº	proteína recubierta	proteína añadida	1er anticuerpo	2º anticuerpo	extinción a 493 nm	desviación estándar
1	GST-STAT6 (677-847)	His-NCoA-1 (212-463)	α-Penta-His	α-ratón-HRP	0,795	0,036
2	--	His-NCoA-1 (212-463)	α-Penta-His	α-ratón-HRP	0,097	0,036
3	GST-STAT6 (677-847)	--	α-Penta-His	α-ratón-HRP	0,006	0,000
4	--	--	α-Penta-His	α-ratón-HRP	0,005	0,001
5	GST-STAT6 (677-847)	His-NCoA-1 (212-463)	--	α-ratón-HRP	0,006	0,000
6	--	His-NCoA-1 (212-463)	--	α-ratón-HRP	0,005	0,001

Descripción de la tabla 1

500 ng de GST-STAT6 TAD (aminoácidos, aa. 677-847), expresado en *E. coli* y purificado por afinidad, se recubren en placas ELISA de 96 hoyos del modo indicado. Después de la incubación con 250 ng de NCoA-1 (aa. 212-463) expresado en *E. coli*, purificado por afinidad y marcado con His, se detecta la proteína fijada con un anticuerpo de ratón anti-His y con un anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con peroxidasa del modo indicado. En las filas 2, 4 y 6 no se recubre el GST-STAT6 TAD (aa. 677-847). En las filas 3 y 4 no se añade el NCoA-1 (aa. 213-462) marcado con His. En las filas 5 y 6 no se añade el anticuerpo anti-His. La conversión de la O-fenilendiamina del sustrato de peroxidasa se mide a 492 nm. Se recoge también los valores promedio de tres ensayos independientes con la desviación estándar (d.e.).

Si el ensayo se realiza en presencia de las sustancias a ensayar, lo que se pretende determinar es la capacidad de las mismas para desbaratar la interacción entre el STAT6 y el NCoA-1, las señales en presencia de los compuestos a ensayar se comparan con los valores de control, p.ej. en ausencia de las sustancia a ensayar, del modo ilustrado en los ejemplo 1a) y 1b).

Ejemplo 1a)

Inhibidor según la invención: péptido 1

A continuación se ilustra el modo por el que las enseñanzas de esta invención conducen a una sustancia según la invención.

En la figura 8A) se representan las estructuras de i) el STAT6 humano, ii) la proteína de fusión GST-STAT6 (GST indica glutiona-S-transferasa), la posición de los aminoácidos, el dominio de fijación del DNA (DBD), el dominio

ES 2 275 927 T3

SH2, el TAD y la posición de fosforilación dependiente de citocinas (Y) del modo indicado; iii) los péptidos derivados del dominio de transactivación (TAD): el péptido 1 (aminoácidos 794-814, SEQ ID NO: 6), el péptido 2 (aminoácidos 817-830) y el péptido 3 (aminoácidos 830-847); en iv) se representa la designación de los antisueros policlonales de conejo, cultivados contra dichos péptidos, respectivamente (AB 1a, AB 1b, AB 2a, AB 2b, AB 3a, AB 3b).

5

En B) se indican los resultados de un ensayo de fijación.

Se fijan 4 μg de GST o de proteína de fusión GST-STAT6-TAD, purificada en *E. coli*, a 20 μl de glutationa-Sepharose y se incuban con 1,5 μl de NCoA-1 marcado con [S^{35}] en presencia de 100 μg de péptido 1, de péptido 2 y de péptido 3, respectivamente, del modo indicado. De la mezcla reaccionante de fijación se recupera el material fijado sobre la glutationa-Sepharose, se lava abundantemente y se analiza por SDS-PAGE y fluorografía (pistas 2-6). El material de control de entrada de la pista 1 refleja un 10% de la cantidad total de NCoA-1 marcado con S^{35} que se emplea en los ensayos. Los resultados indican menos fijación del GST-STAT6-TAD con el NCoA-1 en presencia del péptido 1 (SEQ ID NO: 6), mientras que la presencia del péptido 2 o del péptido 3 no altera significativamente la capacidad de fijación del GST-STAT6-TAD con el NCoA-1.

15

En C) se recogen los resultados de un ensayo ELISA (realizado con arreglo al ejemplo 1). Se inmovilizan 8 μl de los aminoácidos 212-262 del NCoA-1 (SEQ ID NO: 3) marcado con His, de un lisado bacteriano en bruto, que corresponde a 250 ng de proteína fijada, sobre placas ELISA recubiertas con níquel en 100 μl de tampón de recubrimiento. Se añaden 11,2 nmoles del péptido 1, del péptido 2 y del péptido 3, respectivamente, del modo indicado. Después de 1 h de incubación se añaden 500 ng de GST-STAT6-TAD purificado a cada muestra reaccionante. Se detecta el GST-STAT6-TAD fijado con un anticuerpo conjugado con HRP anti-GST. El control de incubación se realiza sin ningún péptido adicional (pista 4) o sin NCoA-1 marcado con His inmovilizado (pista 5) o con el anticuerpo conjugado con HRP anti-GST solo para controlar la fijación de base (pista 6). Los resultados son similares a los obtenidos en B).

25

Ejemplo 1b)

Inhibidor según la invención: anticuerpos AB 1a, AB 1b

30

A continuación se ilustra cómo las enseñanzas de esta invención conducen a una sustancia según la invención.

Los antisueros cultivados contra el péptido 1 inhiben la interacción del STAT6 con el NCoA-1.

35

En la figura 9 a) se presentan los resultados de un ensayo de fijación.

Se incuban 4 μg de GST o de proteína de fusión GST-STAT6-TAD, fijada sobre 20 μl de glutationa-Sepharose, con 1,5 μl de proteína de fusión NCoA-1 marcada con His y marcada con S^{35} , que contiene los restos 213-462 (SEQ ID NO: 3). En las muestras de 4 a 10, la reacción de fijación se lleva a cabo en presencia de 10 μl de antisueros policlonales de conejo contra un péptido no definido (pista 4) o cultivados contra el péptido 1 (pistas 5 y 6: AB 1a, AB 1b) o contra el péptido 2 (pistas 7 y 8: AB 2a, AB 2b) o contra el péptido 3 (pistas 9 y 10: AB 3a, AB 3b), del modo indicado. Se analizan las proteínas fijadas por SDS-PAGE y fluorografía (pistas 2-10). Como control se emplea un 10% de la proteína marcada con S^{35} que se emplea en los ensayos y se analiza de modo similar (pista 1). Los resultados indican menos fijación de dicha proteína de fusión STAT6 con dicha proteína de fusión NCoA-1 en presencia de los antisueros AB 1a o AB 1b, cultivados contra el péptido 1. Los demás sueros no producen cambios en la interacción de las proteínas.

45

En B) se recogen los resultados de un ensayo ELISA (realizado del modo indicado en el ejemplo 1): se inmovilizan 0,5 μl de proteína de fusión GST-STAT6-TAD de un material lisado bacteriano en bruto, que corresponde a 100 ng de proteína fijada, sobre placas recubiertas con anticuerpos GST. Se cultivan antisueros policlonales de conejo contra el péptido 1 (AB-1a, AB-1b) o contra el péptido 2 (AB-2a, AB-2b) o contra el péptido 3 (AB-3a, AB-3b) y se añaden en una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo. Después de una incubación de 1 h se añaden 250 ng de proteína de fusión NCoA-1 marcada con His, que contiene los aminoácidos 213-462 (SEQ ID NO: 3), purificada a partir de *E. coli*. Se detecta el NCoA-1 marcado con His fijado con el anticuerpo Penta-His y con un posterior anticuerpo secundario (anticuerpo de oveja antirratón, conjugado con HRP). Como control se realiza la fijación del anticuerpo secundario sobre placas, que se analiza en paralelo. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en A).

55

Ejemplo 1c)

Caracterización adicional de la interacción del STAT6 con el NCoA-1

60

Las mutaciones puntuales en el motivo LXXLL del STAT6-TAD eliminan la interacción con el NCoA-1 "in vitro"

En la figura 10 A) se representa la secuencia del péptido 1 (SEQ ID NO: 6) y su motivo LXXLL. Se marcan con asterisco las mutaciones de alanina introducidas en la secuencia.

65

En B) se representan los resultados del ensayo de fijación de la GST:

ES 2 275 927 T3

Se incuban 4 μg de proteínas de fusión de GST que contienen los restos 642-847 del STAT6 de tipo salvaje (WT, wild type) o del mutante STAT6 (mut; posición de aminoácidos 802 y 805, ambas L, se mutan a A) con 1,5 μl de un fragmento de NCoA-1, que contiene los restos 213-462 (SEQ ID NO: 4), marcado con S³⁵, y se incuban con 20 μl de glutationa-Sepharose. Se separa por SDS-PAGE el material fijado sobre la glutationa-Sepharose. Se detecta la proteína radiomarcada mediante fluorografía. Los resultados indican que prácticamente no hay fijación de dicha proteína STAT6 mutada con dicha proteína NCoA-1, lo cual pone de manifiesto que los aminoácidos de las posiciones 802 y 805 son esenciales para la interacción de ambas proteínas.

En C) se representan controles realizados que ponen de manifiesto que se emplean cantidades similares de dichas proteínas a las empleadas en B): un cuarto de cada mezcla reaccionante se analiza por separado por SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie para detectar la GST y las proteínas de fusión GST-STAT6 (WT y mut), del modo indicado.

Las mutaciones puntuales del motivo LXXLL disminuyen la expresión de la eotaxina-3 en células 293T.

En la figura 11 A) se representan los resultados de un ensayo de transfección y posterior análisis semicuantitativo de eotaxina-2 inducida por un tratamiento con IL-4:

Se transfectan células 293T con un vector de expresión que codifica al tipo salvaje (WT, pistas 3, 4) o al mutante STAT6 (mut; mutaciones: ver antes; pistas 4 y 5) o el vector de expresión vacía (falso control "mock", pistas 1 y 2). Se inducen las células con IL-4 durante 16 horas (+) o se dejan sin tratar (-), del modo indicado. Se prepara el RNA total y el nivel de expresión de la eotaxina-3 y se analiza por RT-PCR el GAPDH. Los resultados indican una expresión menor de la eotaxina-3 después de la estimulación con IL-4 en células transfectadas con el mutante STAT6, si se comparan con el WT-STAT6, lo cual indica que los aminoácidos de las posiciones 802 y 805 son esenciales para la expresión de la eotaxina-3 después de la estimulación con IL-4.

B) Se determinan cantidades de eotaxina-3 secretada en líquidos sobrenadantes de células cultivadas mediante ensayo ELISA después de la transfección de las células 293T del modo descrito en A), pero inducidas con IL-4 durante 48 horas (pistas 2, 4 y 6) o dejadas sin tratar (pistas 1, 3 y 5). Los valores promedio y las desviaciones estándar de tres ensayos independientes se indican en la figura. Los resultados son similares a los obtenidos en A).

En C) se realizan controles que indican cantidades comparables del WT-STAT6 y del mut-STAT6 producidas en las células transfectadas correspondientes de B): se lisan las células de B) y se analizan por SDS-PAGE y Western-Blot (WB) empleando el anticuerpo anti-STAT6 o el anticuerpo anti- β -actina.

Ejemplo 2

La señalización de IL-4, que induce la transcripción dependiente del STAT6, se mejora con el NCoA-1

Lo que sigue pone de manifiesto que el NCoA-1 es un factor importante para la señalización de la IL-4.

El NCoA-1 mejora la transcripción del STAT6 inducida por la IL-4.

Los estudios previos han caracterizado el dominio de transactivación (TAD) del STAT6 (Lu y col., 1997; Moriggl y col., 1997) e identificado agentes transactivadores autónomos (Goenka y col., 1999). Recientemente hemos encontrado que la afinidad del STAT6-TAD se amplía con los coactivadores p300/CBP y hemos observado una interacción del STAT6 con el p300/CBP "in vivo" (Gingras y col., 1999). Se ha caracterizado la reacción entre los aminoácidos 1850 y 2176 como el dominio de interacción del STAT6 con el p300/CBP. Este dominio ya media en la interacción del p300/CBP con el grupo de los NCoA de coactivadores de receptores nucleares (Yao y col., 1996), que juntos forman un complejo coactivador amplio. Con el fin de investigar si los coactivadores SRC/NCoA intervienen en la transactivación del STAT6 se realizan ensayos de transfección transitoria en la línea de células hepáticas HepG2, que reacciona con la IL-4.

Se transfectan las células con un constructo de informante (reporter) de luciferasa que posee elementos de respuesta STAT6 multimerizados y vectores de expresión que codifican al STAT6 y los coactivadores NCoA-1, NCoA-2 y p/CIP, respectivamente (figura 1). Después de la transfección se tratan las células con IL-4 o se dejan sin tratar. La inducción con la IL-4 conduce a una mejora seis veces mayor de la expresión genética del informante básica (figura 1, pistas 1 y 2). Esta inducción se amplía todavía hasta tres veces más cuando el NCoA-1 se cotransfecta (pistas 3 y 4), mientras que la cotransfección del p/CIP y del NCoA-2, respectivamente, no produce efecto alguno (pistas de 5 a 8). Estos resultados indican que el NCoA-1 es un coactivador del STAT6, mientras que los demás miembros del grupo NCoA, el NCoA-2 y el p/CIP, parece que no intervienen en la transactivación del STAT6.

El NCoA-1 mejora en gran manera el potencial de transactivación del dominio de transactivación del extremo C del STAT6.

Para ilustrar el mecanismo, por el que el NCoA-1 amplía la transactivación mediada por el STAT6, hemos investigado si el NCoA-1 se dirige directamente al STAT6-TAD. Hemos determinado la capacidad del STAT6-TAD, cuando se fusiona con el dominio de fijación del GAL-4-DNA (GAL4-DBD), para inducir un informante (reporte) de lucife-

5 10 15

rasa apropiado en presencia o en ausencia del NCoA-1 sobreexpresado. Los estudios previos ya han caracterizado la actividad del STAT6-TAD en planteamientos similares (Goenka y col., 1999; Lu y col., 1997; Moriggl y col., 1997). Se utilizan dos proteínas de fusión del GAL4, que poseen una función principal de transactivación del STAT6 (aminoácidos 677-791) o el extremo terminal C del STAT6 (aminoácidos 792-847) (figura 2A) para investigar si el NCoA-1 es reclutado por estos dominios.

10 15

Los diversos constructos de GAL4-STAT6-TAD y el constructo de informante de luciferasa, que contienen tres elementos de respuesta al GAL4 en su región de promotor, se transfectan transitoriamente en el HepG2 con o sin co-transfección del coactivador NCoA-1. La expresión del GAL4-DBD aislado no produce una mejora significativa de la actividad del gen informante de luciferasa, que no resulta afectado por la co-transfección del NCoA-1 (figura 2B, pistas 1 y 2). El GAL4-STAT6 (677-791) induce una expresión genética intensa del informante (pista 3). La co-transfección del NCoA-1 conduce a una ligera mejora (pista 4). El GAL4-STAT6 (792-847) no induce significativamente la actividad del gen informante, lo cual indica que este dominio tiene un menor potencial de transactivación cuando se fusiona con el GAL4-DBD. De modo sorprendente, la co-transfección del NCoA-1 aumenta intensamente la función de transactivación del dominio extremo terminal C del STAT6 a un nivel tan alto como el del dominio principal de transactivación del STAT6 (compárese la pista 6 con la 4).

20 25 30

Para validar estos resultados y excluir que el fuerte efecto del NCoA-1 en la actividad de transfección del GAL4-STAT6 (792-847) sea específica de tipos de células, hemos repetido los ensayos con la línea celular pre-B Ba/F3-IL-4R (figura 2C). Una vez más, el GAL4-DBD solo no tiene una actividad de transactivación significativa y esto no cambia con la coexpresión del NCoA-1 (figura 2C, pistas 1 y 2). El GAL4-STAT6 (677-791) induce intensamente la actividad del gen informante (pista 3), pero, a diferencia de nuestros resultados, en las células HepG2 esto no está acompañado de una mejora de coexpresión del NCoA-1 (pista 4). El GAL4-STAT6 (792-847) no presenta una actividad significativa de transactivación por sí mismo (pista 5). En presencia del NCoA-1 co-transfectado, el GAL4-STAT6 (792-847) aumenta intensamente la transcripción (pista 6). Los resultados de estos ensayos confirman que el NCoA-1 sirve como co-activador del dominio de transactivación del STAT6. El fuerte efecto de coactivación en el extremo terminal C del STAT6-TAD, que tiene una actividad autónoma de transactivación muy escasa, sugiere que el NCoA-1 está reclutado por este dominio. Mientras que el efecto específico del tipo de célula del NCoA-1 en el dominio principal de transactivación del STAT6 (aminoácidos 677-791) puede ser debido a un reclutamiento indirecto del NCoA-1 por este dominio debido a factores celulares específicos.

El NCoA-1 y el STAT6 interactúan "in vivo". La interacción depende de la presencia de la región terminal C del STAT6.

35 40 45 50

Los ensayos de transfección ilustran que el NCoA-1 aumenta intensamente el potencial de transactivación del extremo terminal C del STAT6-TAD, sugiriendo que existe una interacción directa entre el NCoA-1 y esta región. Para probar la interacción probable entre el STAT6 y el NCoA-1 "in vivo" se realizan ensayos de co-inmunoprecipitación. Se transfectan células 293T con vectores de expresión que codifican al STAT6 de longitud completa, el STAT6 carente de los aminoácidos 792-847 y el NCoA-1, respectivamente. Se preparan extractos celulares y se realizan ensayos de co-inmunoprecipitación con los anticuerpos indicados. Se analizan los inmunoprecipitados por Western Blot con antiseros específicos de NCoA-1 y STAT6. Se precipitan grandes cantidades de NCoA-1 con anticuerpos específicos del NCoA-1 (figura 3, pistas 3 y 7). Los anticuerpos no afines no precipitan el NCoA-1 en absoluto (pistas 4 y 8). Los anticuerpos específicos del STAT6 co-inmunoprecipitan casi tanto NCoA-1 como los anticuerpos específicos del NCoA-1. Esto se observa únicamente cuando se cotransfecta el STAT6 de longitud completa en las células. Cuando está presente en las células una forma truncada del STAT6 Δ 792, entonces no co-inmunoprecipita nada del NCoA-1 (compárese la pista 2 con la 6), a pesar de que en ambas reacciones precipitan cantidades iguales del STAT6 de tipo salvaje y del STAT6 truncado (compárese la pista 10 con la 12). En resumen, estos ensayos indican claramente que el NCoA-1 y el STAT6 interactúan fuertemente "in vivo" y que esta interacción tiene lugar presumiblemente a través de la región terminal C del STAT6.

El dominio de transactivación del STAT6 interactúa "in vitro" con el NCoA-1, pero no con NCoA-2 ni con p/CIP.

55 60

Para caracterizar mejor la interacción del STAT6 con el NCoA-1 y determinar su especificidad se realizan ensayos de fijación de GST. Se ensaya la interacción de los tres miembros mencionados del grupo NCoA/SRC-1 con el STAT6-TAD. Para ello se fusiona el dominio de transactivación del STAT6 con GST y se incuban cantidades iguales de GST y de GST-STAT6-TAD con coactivadores sintetizados "in vitro" y marcados con S³⁵. El NCoA-1 se fija fuertemente sobre el GST-STAT6-TAD (figura 4, pista 7). En cambio, ni el NCoA-2 ni el p/CIP consiguen interactuar con el STAT6-TAD (pistas 8 y 9). No se observa fijación en el caso del GST solo (pistas 4, 5 y 6). Estos resultados son consistentes con los ensayos de transfección transitoria, mostrados en la figura 1, en los que el NCoA-1, pero no el NCoA-2 ni el p/CIP, aumenta la transactivación causada por el STAT6. En resumen, el NCoA-1 interactúa específicamente con el STAT6 y actúa de coactivador del STAT6.

La parte terminal C del dominio de transactivación del STAT6 interactúa "in vitro" con el NCoA-1.

65

Hemos seguido caracterizando la región del dominio de transactivación STAT6, que provoca la interacción. Para ello se investiga la interacción de diversos constructos de fusión GST-STAT6, que representan el TAD completo (aminoácidos 677-847), el extremo N principal del TAD (aminoácidos 677-791) y la región extrema termina C

(aminoácidos 792-847), que responden intensamente al NCoA-1, con el NCoA-1 (figura 5A). Se aplican cantidades similares de diferentes proteínas de fusión GST-STAT6, extremo confirmado con la tinción de Coomassie (figura 5C). Como era de esperar, el NCoA-1 interacciona intensamente con el GST-STAT6 que contiene el TAD completo (figura 5B, pista 2). Se observa la misma interacción intensa en la proteína de fusión GST que representa únicamente la parte C terminal del STAT6-TAD (pista 4), mientras que la fusión GST representada en el extremo N del STAT6-TAD no consigue fijarse sobre el NCoA-1 (pista 3). Este resultado confirma nuestra hipótesis de que la interacción directa entre el NCoA-1 y la parte C terminal del STAT6-TAD es la causa de la potente función de coactivador del NCoA-1.

10 *El dominio de transactivación del STAT6 interacciona directamente con los aminoácidos 212-462 del NCoA-1.*

El NCoA-1 contiene diversos dominios estructurales y funcionales (figura 6A). Para investigar, qué dominio de NCoA-1 media en la interacción con el STAT6, hemos ensayado la interacción de varios fragmentos del NCoA-1 con el STAT6 en ensayos de fijación (figura 6A). Hemos empleado proteínas de fusión GST-STAT6, que contienen los restos 677-847, para analizar la fijación de varios fragmentos de NCoA-1 marcado y traducido “*in vitro*”. Hemos observado la interacción específica del fragmento N-terminal que abarca los aminoácidos 1-781 (figura 6B, pista 11) y la proteína NCoA-1 de longitud completa (pista 15) con el GST-STAT6-TAD, pero no hay interacción con la GST sola (pistas 6-10). Los fragmentos que contienen el dominio de interacción de receptor nuclear (pista 12), el dominio de interacción CBP/p300 (pista 13) y el dominio de transactivación del extremo C (pista 14) no consiguen interaccionar. Para seguir delimitando la posición de fijación con STAT6 en el NCoA-1, hemos diseccionado la región N terminal del NCoA-1 y hemos ensayado diferentes fragmentos en ensayos de fijación (figura 6A). Las partes divididas (1-361 y 361-571) del fragmento interaccionante más corto del extremo N (1-571) no consiguen interaccionar con el STAT6-TAD (figura 6C, pistas 6 y 9), lo cual indica que la posición de fijación se halla intercalada en otro punto. El fragmento mínimo del NCoA-1, que todavía es capaz de interaccionar con el GST-STAT6 posee una región de los aminoácidos 213-462, que abarca el dominio B Per-Arnt-Sim (PAS) y parte del dominio rico en serina/treonina (pista 18). La ulterior delección del extremo N (313-462, pista 21) o del extremo C (1-361, pista 6) elimina la fijación. Se observa también una interacción intensa cuando se incubaba el GST-STAT6 con NCoA-1 purificado y marcado con histidina (212-462) (datos no presentados), lo cual confirma que la interacción entre el NCoA-1 y el STAT6 es directa y no depende de proteínas adicionales.

30 *La región N-terminal del NCoA-1 actúa como negativo dominante para la activación de la transcripción por el STAT6.*

Para confirmar la importancia de la interacción con el NCoA-1 para la transcripción del STAT6, hemos investigado si la sobreexpresión del dominio N-terminal de NCoA-1 (figura 7A) puede influir en la capacidad transcripcional del STAT6. Para ello hemos expresado el fragmento N-terminal o, como control, el dominio de interacción de receptor nuclear (NID) del NCoA-1 en células Ba/F3-IL-4R y hemos analizado su efecto en la actividad del gen informante de luciferasa I ϵ -TK como respuesta al STAT6. Después de la inducción con IL-4 se observa una fuerte estimulación del gen informante de luciferasa (figura 7B, pistas 1 y 2). La coexpresión del constructo NCoA-1 N-terminal, que contiene la región de interacción con el STAT6, elimina esta estimulación (pistas 3 y 4). En cambio, la coexpresión de los fragmentos que albergan el NID no despliega ningún efecto marcado en la estimulación mediada por el STAT6 (pistas 5 y 6).

Descripción de las figuras de 1 a 7

45 (La descripción de las figuras 8-11 se ha facilitado en el ejemplo 1)

Figura 1. El NCoA-1, pero no el NCoA-2 ni el pCIP, mejora la transcripción inducida por la IL-4 con el STAT6.

50 Se transfectan células HepG2 con el plásmido informante N4(STAT-RE)3-TK-LUC (2 μ g), el vector de expresión STAT6 (25 ng), NCoA-1, NCoA-2, p/CIP o vectores de expresión vacía (200 ng) junto con el plásmido de expresión SV40-LacZ (25 ng) como control de transfección, del modo que se indica. Las células transfectadas se tratan con IL-4 (10 ng/ml) durante 16 horas (columnas rayadas) o se dejan sin tratar (columnas negras). Se preparan extractos celulares y se determinan las actividades de luciferasa. Las actividades relativas de luciferasa se normalizan en actividades de β -galactosidasa. Se indican los valores promedio de 3 ensayos independientes así como las desviaciones estándar.

Figura 2. El potencial de transactivación del dominio de transactivación del extremo C-terminal del STAT6 se amplía en gran manera con el NCoA-1.

60 (A) Se representan la estructura del STAT6 humano y de las proteínas de fusión del dominio de fijación (DBD) del GAL4-DNA con el dominio de transactivación (TAD) del STAT6. El GAL4-DBD (aminoácidos 1-147) está fusionado con diferentes regiones del STAT6-TAD. Se indica la posición de los aminoácidos (aa), el DBD, el dominio SH2, el TAD y la posición de fosforilación dependiente de citocina (Y). Se transfecta el plásmido informante (GAL4-RE) 3TK-LUC (2 μ g), los plásmidos de expresión que codifican al GAL4-DBD o a las proteínas de fusión GAL4-DBD-STAT6-TAD (50 ng), el NCoA-1 o el plásmido vacío (400 ng) y el plásmido de expresión SV40-LacZ (25 ng) en células HepG2 del modo indicado. (C) Se transfectan células Ba/F3 con el plásmido informante (GAL4-RE)3TK-LUC (5 μ g), los plásmidos que codifican al GAL4-DBD o a las proteínas de fusión GAL4-DBD-STAT6-TAD (50 ng), el NCoA-1 (500 ng) o un plásmido de expresión vacía y el plásmido de expresión SV40-LacZ (1 μ g), del modo

ES 2 275 927 T3

indicado. (B y C) Se determinan las actividades relativas de luciferasa y se normalizan frente a las actividades de β -galactosidasa. Se indican el promedio y desviación estándar de tres ensayos independientes.

Figura 3. El NCoA-1 coimmunoprecipita con el STAT6.

Se transfectan células 293T con el vector de expresión que codifica al STAT6 de longitud completa o truncado junto con el vector de expresión de NCoA-1. Se preparan extractos celulares completos y se inmunoprecipitan con el anticuerpo específico del STAT6, el anticuerpo específico del NCoA-1 o un anticuerpo no afín. Se analizan todas las muestras por SDS-PAGE y Western Blotting con antisuero contra el NCoA-1 (recuadro superior) y contra el STAT6 (recuadro inferior). Se analiza en paralelo una parte alícuota del lisado celular correspondiente al 1% del material empleado para el ensayo (pistas 1, 5, 9 y 11).

Figura 4. El dominio de transactivación del STAT6 interacciona específicamente con el NCoA-1 “*in vitro*”

Se purifican en *E. coli* la GST o las proteínas de fusión GST-STAT6-TAD, se fijan a glutationa-Sepharose y se incuban con NCoA-1, NCoA-2 y p/CIP, respectivamente, se transcriben y se traducen “*in vitro*” en presencia de metionina- S^{35} . Se recupera de la reacción de fijación el material fijado sobre la glutationa-Sepharose, se lava abundantemente y se analiza por SDS-PAGE y fluorografía (pistas 4-9). El control de entrada de las pistas 1-3 refleja un 10% de la cantidad total de la proteína marcada con metionina- S^{35} que se ha empleado en los ensayos.

Figura 5. El STAT6 contacta con el NCoA-1 mediante la parte terminal extrema C de su dominio de transactivación.

(A) Estructura del STAT6 humano y las proteínas de fusión GST-STAT6-TAD. (B) Se marca el NCoA-1 con metionina- S^{35} mediante traducción “*in vitro*” y se incuba con glutationa-Sepharose fijada sobre GST o sobre proteínas de fusión GST-STAT6, tal como se indica. Se eluye específicamente el material fijado de la glutationa-Sepharose y se resuelve con un SDS-PAGE. Se analiza en paralelo (pista 1) una parte alícuota del lisado de reticulocito correspondiente al 10% del material empleado en el ensayo. Se visualiza la proteína marcada radiactivamente por fluorografía. (C) Para controlar la cantidad de proteínas de fusión de la GST en la reacción se efectúa una tinción con Coomassie.

Figura 6. La parte N-terminal del NCoA-1 media en la interacción con el STAT6.

(A) Representación esquemática de constructos del NCoA-1. Se representan el NCoA-1 y una serie de mutantes de delección del NCoA-1. Se indican la hélice-bucle-hélice básica (bHLH), el dominio Per-Arnt-Sim (PAS), el dominio de interacción de receptor nuclear (NID), el dominio de interacción CBP (CID)/dominio de activación 1 (AD1), el dominio de activación 2 (AD2). Se representan los números de aminoácidos de cada constructo. Los fragmentos de NCoA-1 que se fijan sobre el STAT6 se representan con rectángulos rayados, los fragmentos que no se fijan se representan con rectángulos blancos. (B) y (C) Se traducen “*in vitro*” el NCoA-1 y una serie de fragmentos de NCoA-1 en presencia de metionina- S^{35} y se incuban con la GST sola o con proteínas de fusión GST-STAT6-TAD sobre glutationa-Sepharose, del modo que se indica. Se lavan las proteínas precipitadas, se eluyen y se resuelven por SDS-PAGE. Se analizan en paralelo partes alícuotas los mutantes de delección del NCoA-1 traducidos “*in vitro*”, correspondientes al 10% del material empleado para el ensayo de interacción (B, pistas 1-5; C, pistas 1, 4, 7, 10, 16, 19). Se visualiza por fluorografía la proteína marcada radiactivamente.

Figura 7. La región N-terminal del NCoA-1 tiene un efecto negativo dominante en la activación de la transcripción con el STAT6.

(A) Estructura del NCoA-1. Se representan los dominios funcional y estructural de la hélice-bucle-hélice básica (bHLH), el dominio Per-Arnt-Sim (PAS) y el dominio de interacción del receptor nuclear (NID). (B) Se transfectan células Ba/F3 con 200 ng de vector de expresión de STAT6, 3 μ g de vector de expresión que codifica a los fragmentos indicados del NCoA-1 o un vector vacío, junto con 5 μ g de plásmido informante I γ E-TK-LUC y 1 μ g del vector de expresión SV40-LacZ. 4 horas después de la transfección se tratan las células con IL-4 o se dejan sin tratar. 20 horas después de la transfección se recogen las células y se determinan las actividades de luciferasa y se normalizan frente a las actividades de β -galactosidasa. Los valores son promedios de tres ensayos independientes.

Bibliografía técnica

Anziok, S. L., J. Kononen, R. L. Waker, D. O. Azorsa, M. M. Tanner, X. Y. Guan, G. Sauter, O. P. Kallioniemi, J. M. Trent, and P. S. Meltzer. 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277:965-8.

Chen, H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nokatani, and R. M. Evans. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90:569-80.

Darnell, J. E. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-5.

Darnell, J. E. I M. Kerr, and G. R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-21.

- Delphin, S.** and **J. Stavnezer.** 1995. Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/950. *J. Exp. Med* 181:181-92.
- 5 **Gingras, S., J. Simard, B. Groner, and E. Pfitzner.** 1999. p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res* 27:2722-9.
- Goenka, S., J. Youn, L. M. Dzurek, U. Schindler, L. Y. Yu-Lee, and M. Boothby.** 1999. Paired Stat6 C-terminal transcription activation domains required both for inhibition of an IFN-responsive promoter and trans-activation. *J Immunol* 163:4663-72.
- 10 **Goodman, R. H. and S. Smolik.** 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development, *Genes Dev* 14: 1553-77.
- 15 **Greenlund, A. C., M. A. Farrar, B. L. Vivano and R. D. Schreiber** 1994. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *Embo J* 13:1591-600.
- Hampsey, M. and D. Reinberg.** 1999. RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev* 9:132-9.
- 20 **Hoey, T. and U. Schindler.** 1998. STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:582-7.
- Hong, H., K. Kohli, M. J. Garabedian, and M. R. Stallcup.** 1997. GRIP1. a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17:2735-44.
- 25 **Horvath, C. M., Z. Wen, and J. E. Darnell.** 1995 A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9:984-94.
- Hou, J., U. Schindler, W. J. Henzel, T. C. Ho, M. Brasseur, and S. L. McKnight.** 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265:1701-6.
- 30 **Ihle, J. N.** 1996. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84:331-4.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, A., Nordheim., and Stunnenberg H.G.** (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8972.
- 35 **Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403-14.
- 40 **Kaplan, M. H., U. Schinder, S. T. Smiley, and M. J. Grusby.** 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4:313-9.
- 45 **Lu, B., M. Reichel, D. A. Fisher, J. F. Smith, and P. Rothman.** 1997. Identification of a STAT6 domain required for IL-4-induced activation of transcription. *J. Immunol* 159:1255-64.
- Moriggl, R., S. Berchtold, K. Friedrich, G. J. Standke, W. Kammer, M. Heim, M. Wissler, E. Stocklin, F. Guilleux, and B. Groner.** 1997. Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 17:3663-78.
- 50 **Onate, S.A., S.Y. Tsai, and B. W. O'Malley.** 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-7.
- 55 **Pfitzner, E., R. Jahne, M. Wissler, E. Stoecklin, and B. Groner.** 1998. p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* 12:1582-93.
- Schindler, U., P. Wu, M. Rothe, M. Brasseur, and S. L. McKnight.** 1995. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity* 2:689-97.
- 60 **Shimoda, K., J. van Deursen, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. Grosveld, W. E. Paul, and J. N. Ihle.** 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-3.
- 65 **Shuai, K., C. M. Horvath, L. H. Huang, S. A. Qureshi, D. Cowburn, and J.E. Darnell.** 1994 Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76:821-8.

ES 2 275 927 T3

Stahl, N., T. J. Farruggella, T. G. Boulton, Z. Zhong, J. E. Darnell and G. D. Yancopoulos. 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267:1349-53.

5 **Torchia, J., D. W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. K. Glaas, and M. G. Rosenfeld.** 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function [see comments] *Nature* 387:677-84.

10 **Vinkemeier, U., S. L. Cohen, I. Moarefi, B. T. Chait, J. Kuriyan, and J. E. Darnell.** 1996. DNA binding of *in vitro* activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *Embo J* 15:5616-26.

Voegel, J. J., M. J. Heine, C. Zechel, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1996. TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* 15:3667-75.

15 **Xu, L., C.K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function, *Curr Opin Genet Dev* 9:140-7.

20 **Xu, X., Y. L. Sun, and T. Hoey.** 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273:794-7.

Yao, T. P., G. Ku, N. Zhou, R. Scully, and D. M. Livingston. 1996. The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p380. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10626-31.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 275 927 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar si una sustancia puede modular la interacción del STAT6 con el NCoA-1, **caracterizado** porque
 - a) el STAT6 o fragmentos o derivados del mismo, que tienen la capacidad de fijarse sobre el NCoA-1, se ponen en contacto con el NCoA-1 o fragmentos o derivados del NCoA-1 que tienen la capacidad de fijarse sobre el STAT6 en condiciones en las que el STAT6 y el NCoA-1 o dichos fragmentos o derivados son capaces de formar un complejo y dicho complejo puede utilizarse para inducir una lectura medible;
 - 10 b) se efectúa la lectura en ausencia o en presencia de la sustancia de interés;
 - c) se compara la lectura en ausencia de la sustancia de interés con la lectura en presencia de la sustancia de interés.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la sustancia puede activar la interacción.
3. Un método según la reivindicación 1, en el que la sustancia puede inhibir la interacción.
- 20 4. Un método según la reivindicación 1, en el que el análisis se realiza empleando un sistema celular.
5. Un método según la reivindicación 1, en el que el análisis se realiza empleando un sistema sin células.
- 25 6. Un método según las reivindicaciones de 1 a 5, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, opcionalmente fusionados con otra secuencia de aminoácidos.
- 30 7. Un método según la reivindicación 6, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, fusionados con otra secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1.
- 35 8. Un método según las reivindicaciones de 1 a 5, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2.
9. Un método según las reivindicaciones de 1 a 5, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5.
- 40 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4, opcionalmente fusionados con otra secuencia de aminoácidos.
- 45 11. Un método según la reivindicación 10, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4, fusionados con otra secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 3.
- 50 12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en el que se emplea un polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4.
13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, en el que el STAT6 o un fragmento o un derivado del mismo está unido a un marcador detectable.
- 55 14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 12, en el que el NCoA-1 o un fragmento o un derivado del mismo está unido a un marcador detectable.
15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que el marcador es un marcador de histidina, que contiene por lo menos cinco restos histidina consecutivos.
- 60 16. Un método según las reivindicaciones de 1 a 15, que consta de los pasos siguientes:
 - a) fijación de un primer polipéptido, que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5, sobre un soporte sólido que está presente en un recipiente o parte de tal recipiente;
 - b) adición de la sustancia de interés o de un falso control, opcionalmente en un disolvente idóneo;
 - 65 c) adición de un segundo polipéptido, marcado de modo detectable, que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4, en condiciones que permitan que dichos polipéptidos se fijen uno sobre otro;

ES 2 275 927 T3

(d) eliminación del segundo polipéptido no fijado;

(e) medición de la cantidad de segundo polipéptido, marcado de modo detectable, fijado sobre el primer polipéptido.

5

17. Un método según las reivindicaciones de 1 a 15, que consta de los pasos siguientes:

(a) fijación de un primer polipéptido, que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4, sobre un soporte sólido que está presente en un recipiente o parte de tal recipiente;

10

(b) adición de la sustancia de interés o de un falso control, opcionalmente en un disolvente idóneo;

(c) adición de un segundo polipéptido, marcado de modo detectable, que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5, en condiciones que permitan que dichos polipéptidos se fijen uno sobre otro;

15

(d) eliminación del segundo polipéptido no fijado;

(e) medición de la cantidad de segundo polipéptido, marcado de modo detectable, fijado sobre el primer polipéptido.

20

18. El método según la reivindicación 16 ó 17, en el que el marcador se detecta por fijación de un anticuerpo específico de tal marcador.

19. El método según la reivindicación 16 ó 17, en el que el marcador es un marcador de histidina que contiene por lo menos 5 restos histidina consecutivos y el anticuerpo es específico del marcador de histidina.

25

20. El método de la reivindicación 18 ó 19, en el que se detecta el anticuerpo por fijación de un segundo anticuerpo sobre el primer anticuerpo, dicho segundo anticuerpo está unido a una enzima capaz de catalizar una reacción medible.

30

21. El método según las reivindicaciones de 1 a 20, empleando en una exploración de alta productividad.

22. Un sistema de ensayo para determinar si una sustancia es un activador o un inhibidor de la interacción del STAT6 con el NCoA-1, que consta de:

35

(a) el STAT6 o fragmentos o derivados del mismo que tienen la capacidad de fijarse sobre el NCoA-1;

(b) el NCoA-1 o fragmentos o derivados del mismo que tienen la capacidad de fijarse sobre el STAT6;

(c) un recipiente, en el que dicho STAT6 o fragmentos o derivados del mismo pueden formar un complejo con dicho NCoA-1 o fragmentos o derivados del mismo;

40

(d) un dispositivo para medir dicho complejo.

23. Un sistema de ensayo según la reivindicación 22, en el que se incluye un primer polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 677 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 2, con mayor preferencia por lo menos los aminoácidos de 792 a 847 del STAT6 según la SEQ ID NO: 5, y se incluye un segundo polipéptido que contiene por lo menos los aminoácidos de 212 a 463 del NCoA-1 según la SEQ ID NO: 4.

50

55

60

65

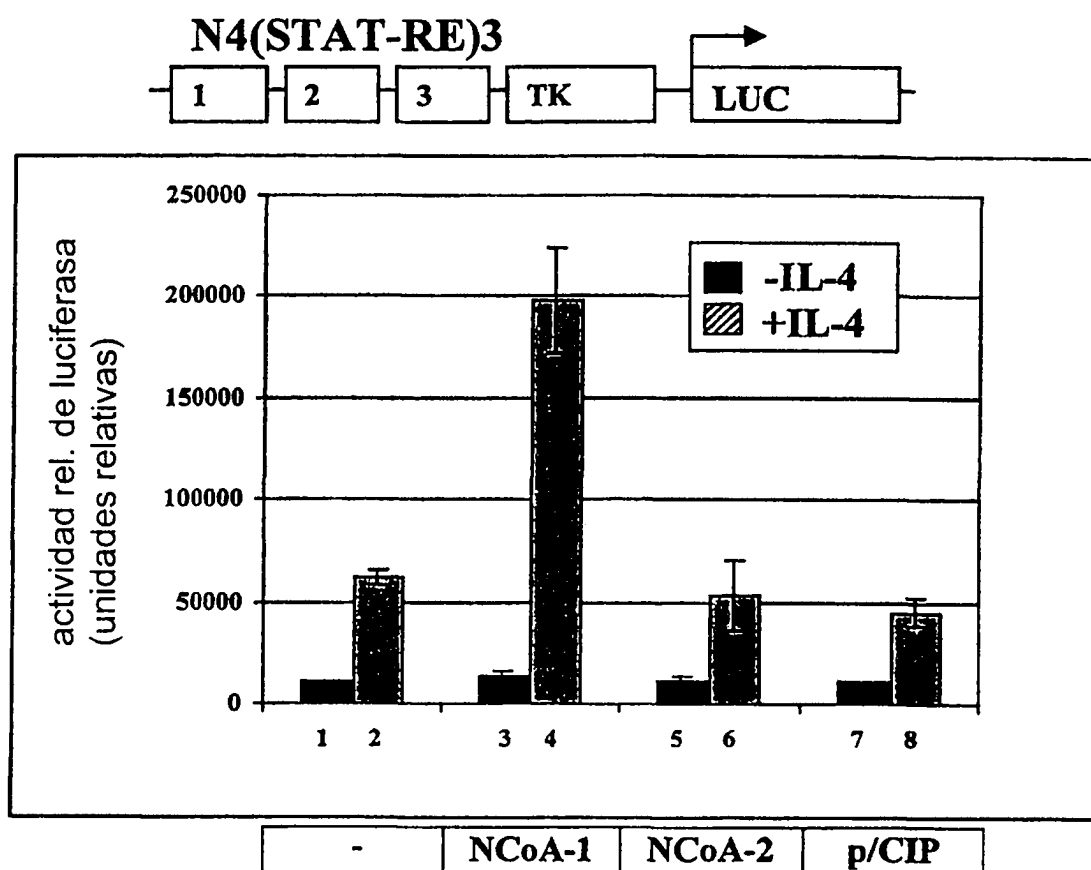


Fig. 1

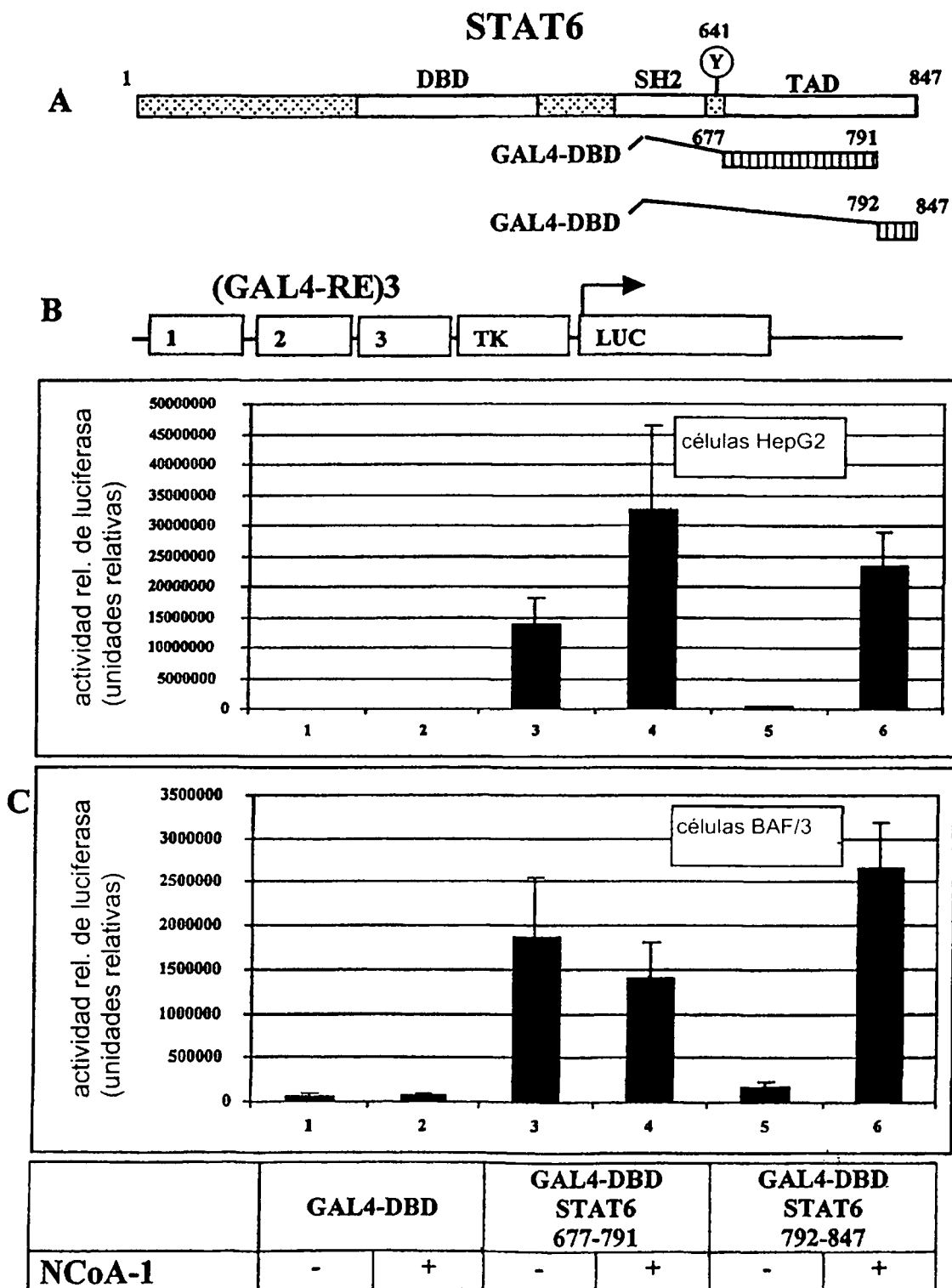


Fig. 2

células 293T transfectadas con:

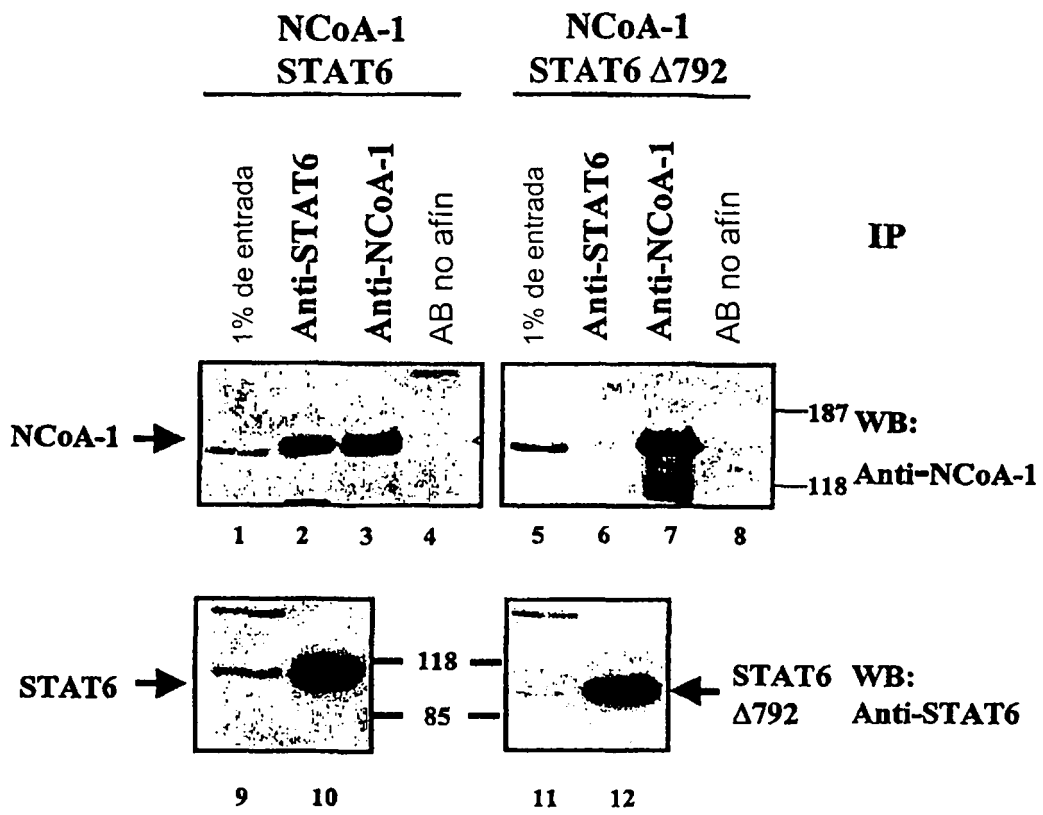


Fig. 3

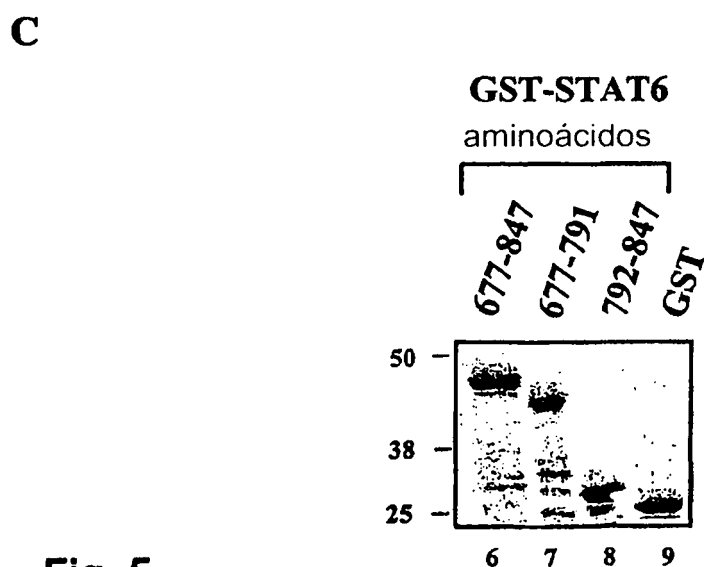
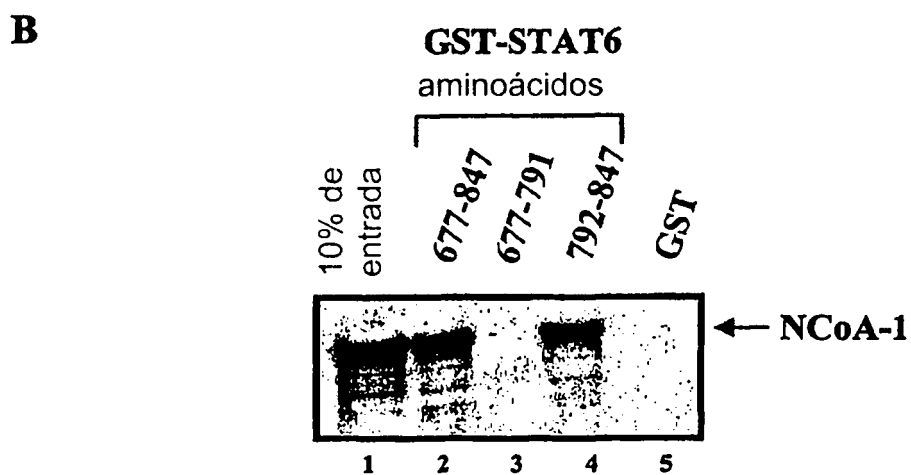
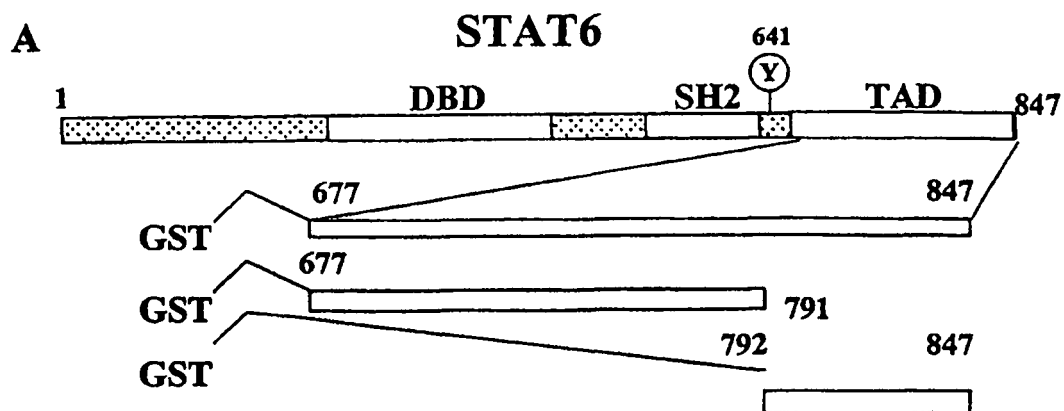


Fig. 5

A

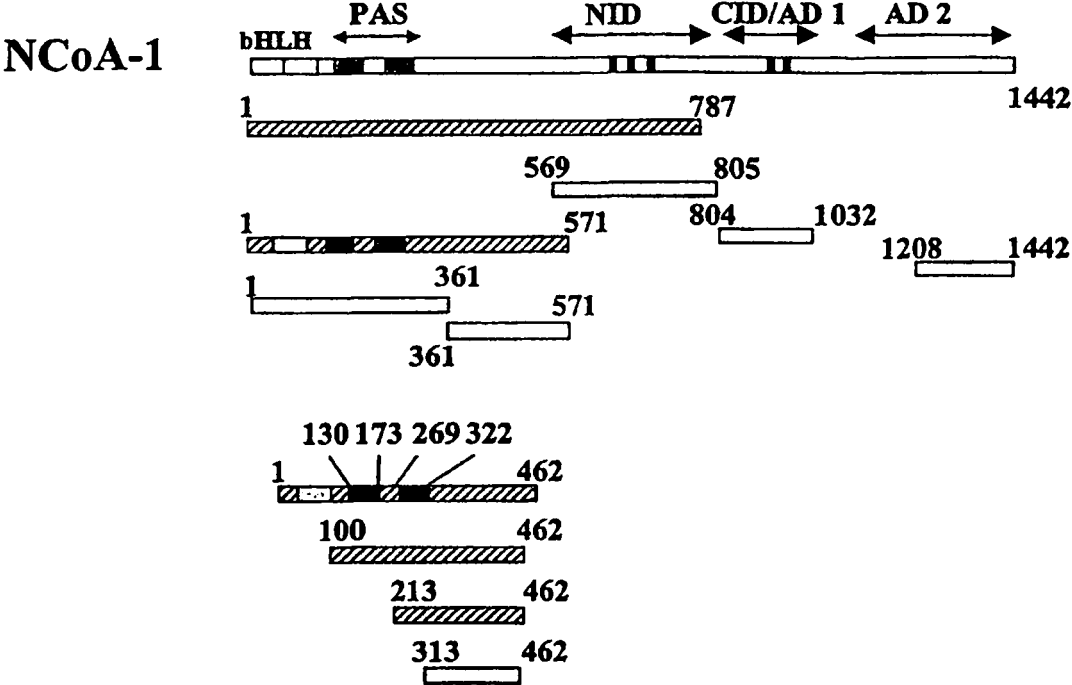


Fig. 6 A

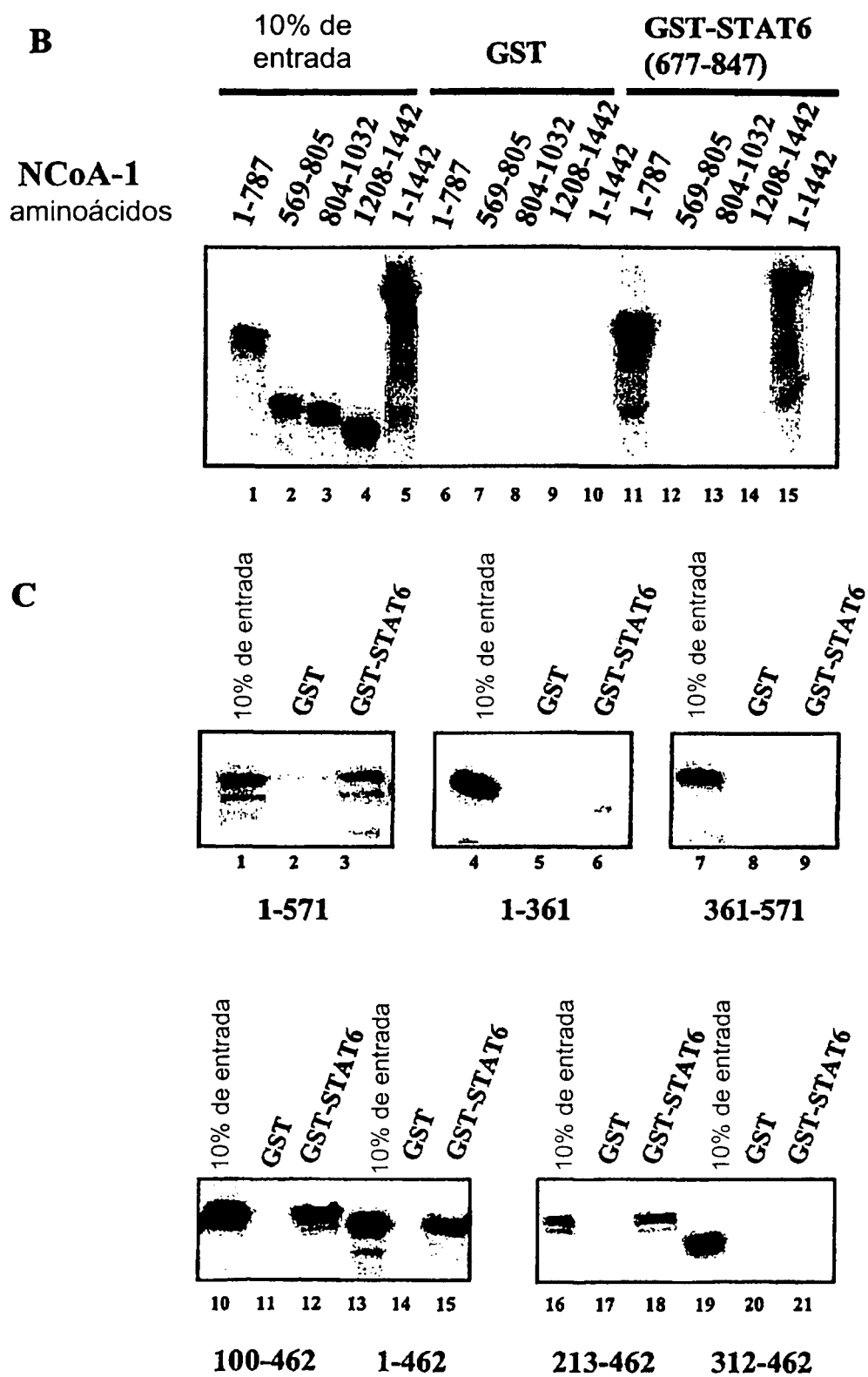


Fig. 6 BC

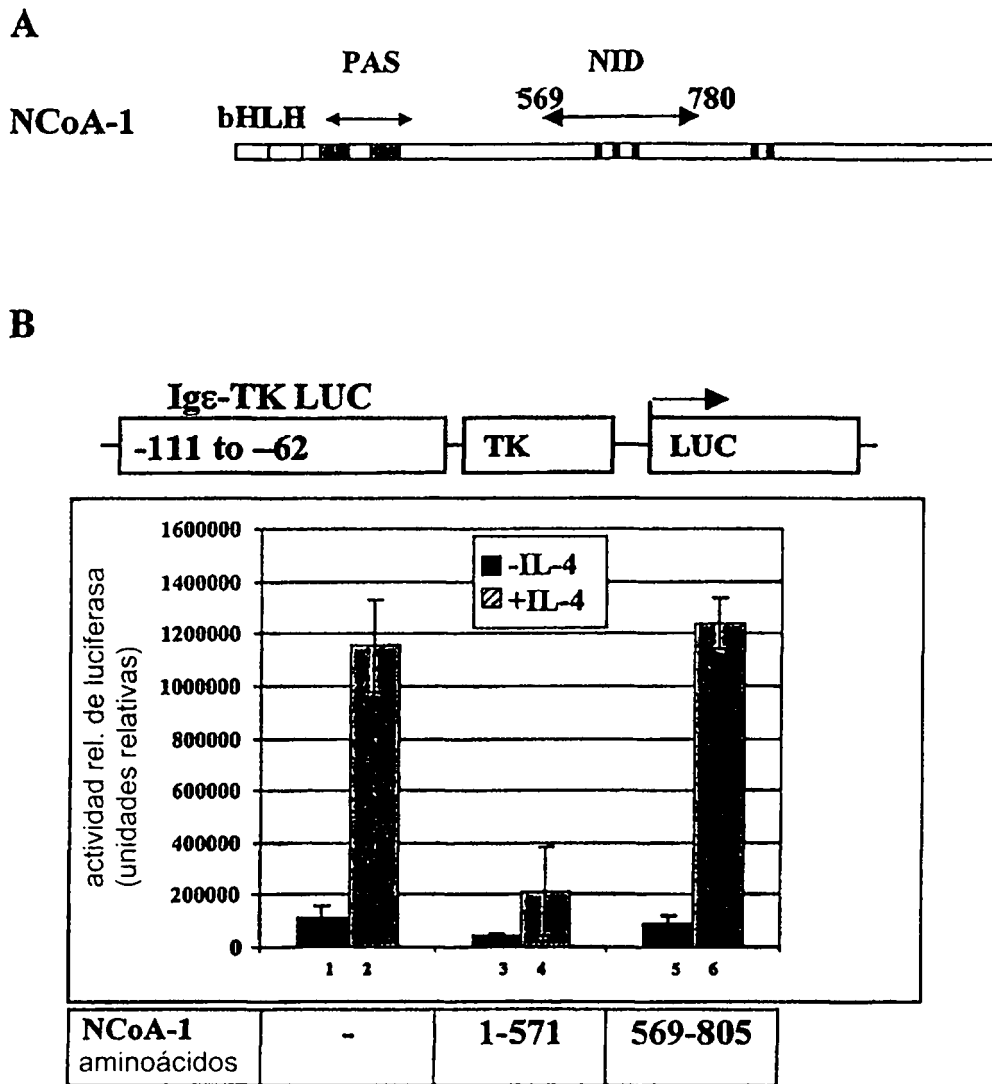


Fig. 7

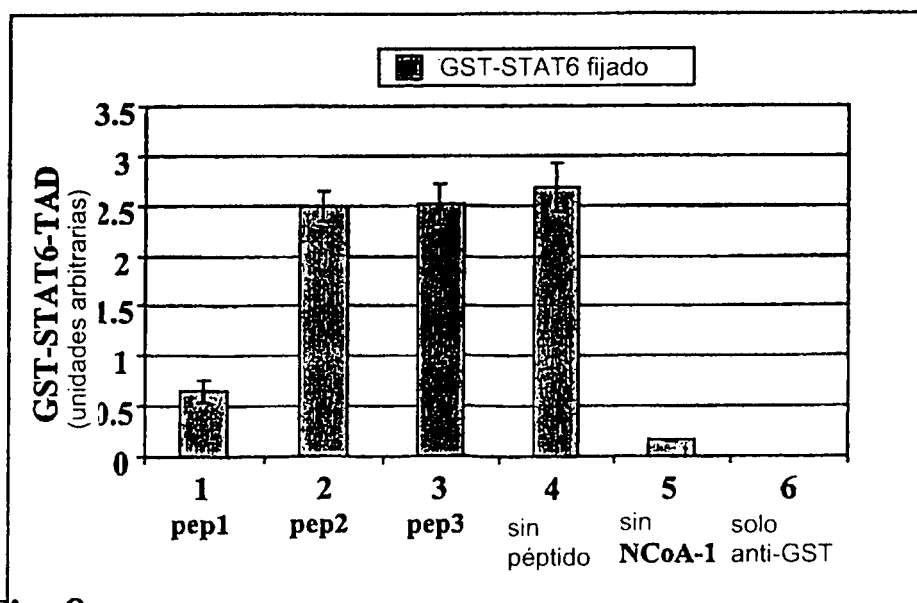
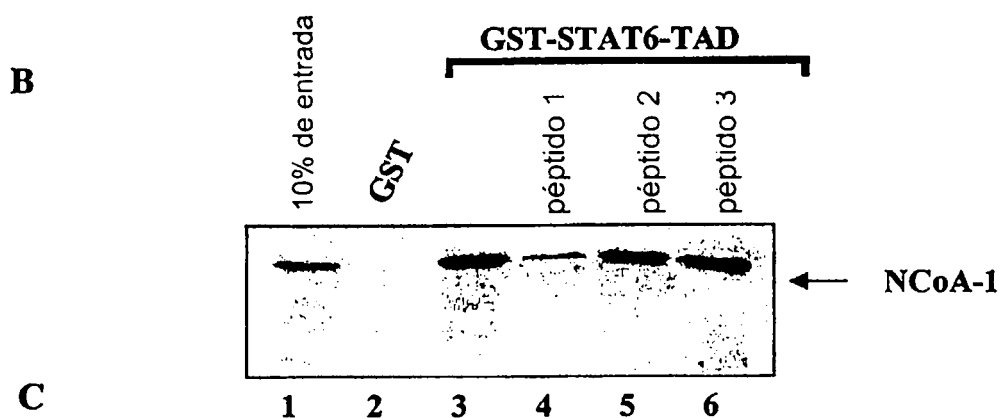
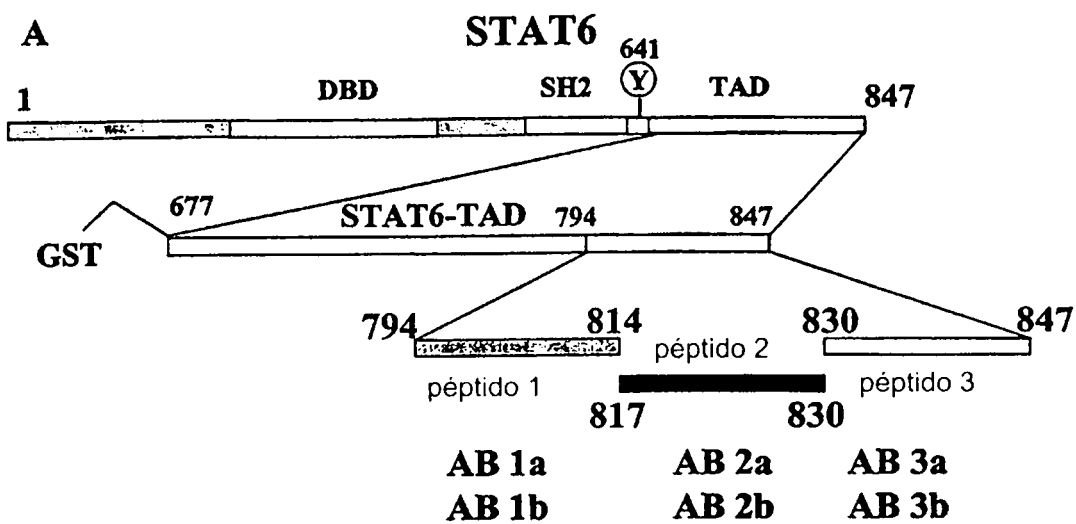


Fig. 8

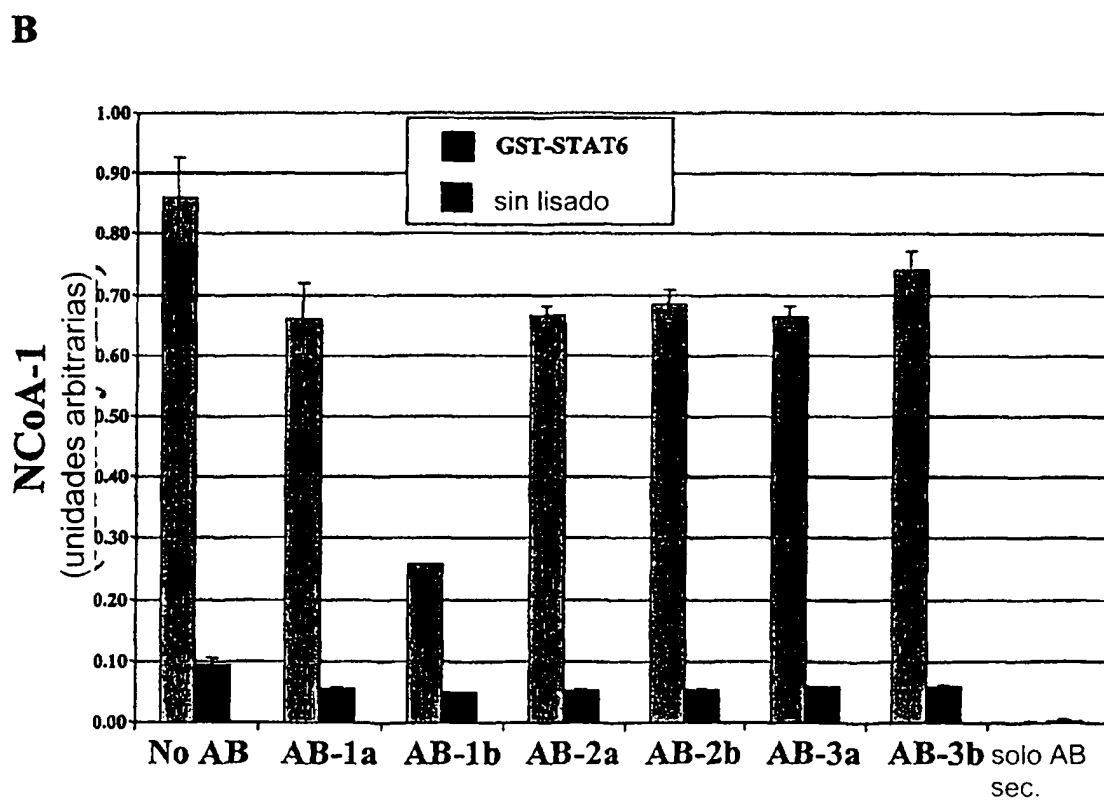
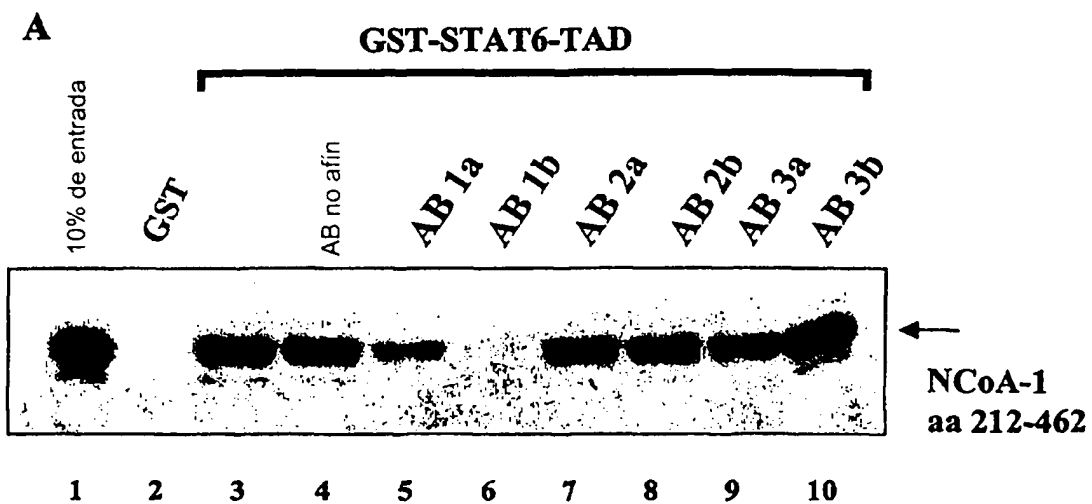


Fig. 9

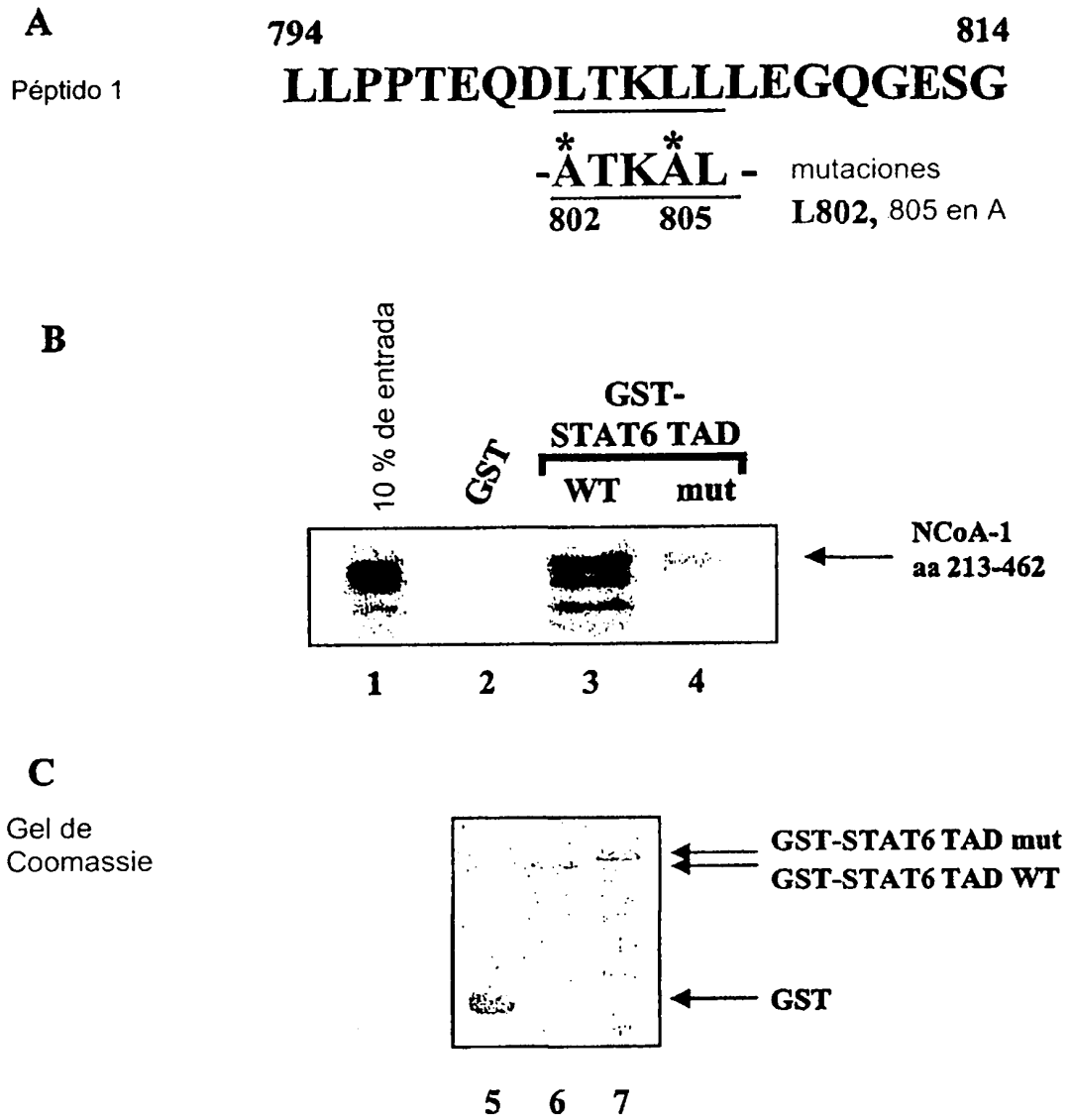


Fig. 10

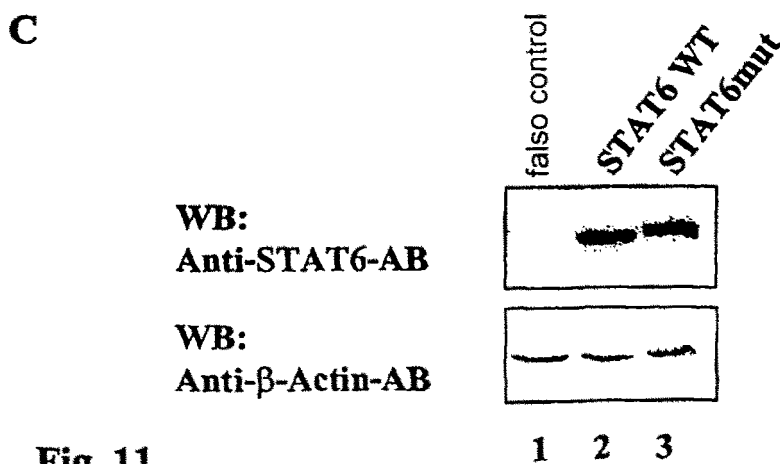
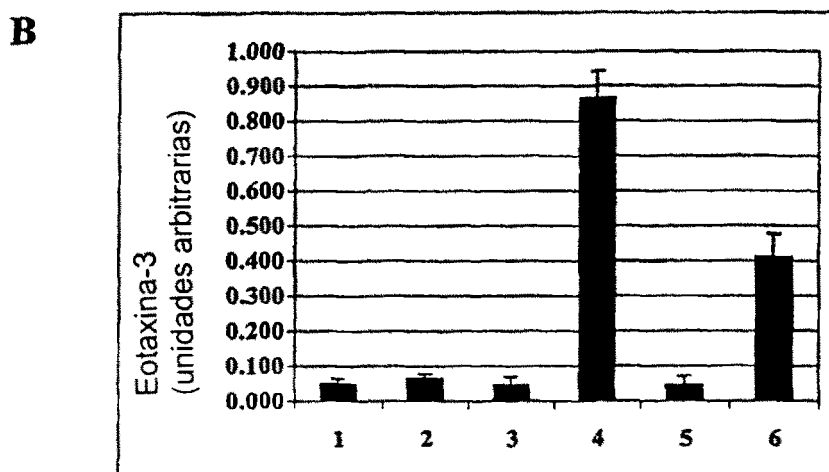
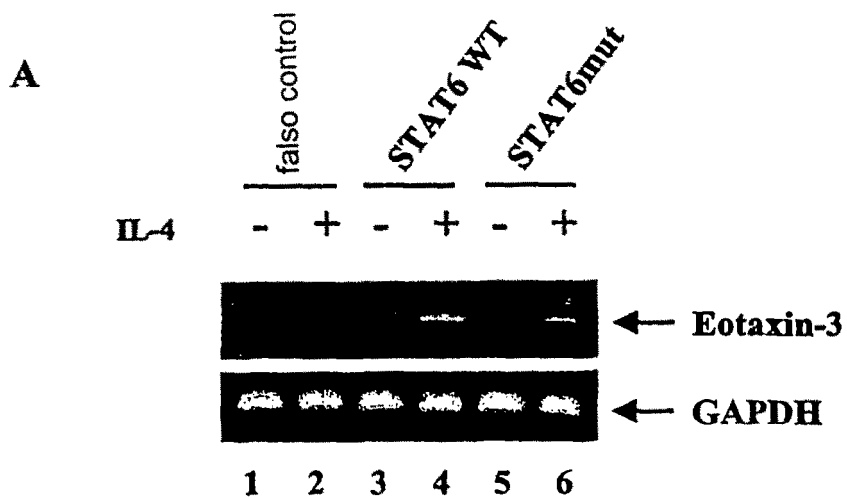


Fig. 11

ES 2 275 927 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Boeringer Ingelheim International GmbH
5 <120> Método para la identificación de sustancias que modulan la señalización de la interleucina-4
<130> STAT6 NCoA-1
<140>
<141>
10 <150> EP 01117097.4
<151> 2001-07-13 (SEQ ID NO de 1 a 5)
<160> 6
<170> PatentIn Ver. 2.1
15 <210> 1
<211> 401
<212> PRT
20 <213> secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: derivado de un fragmento de STAT6
25 <400> 1

30 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

35 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30

40 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45

45

50

55

60

65

ES 2 275 927 T3

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 5
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 10
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95
 15
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
 100 105 110
 20
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
 115 120 125
 25
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
 130 135 140
 30
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 35
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 40
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 45
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 50
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Ile Glu Gly
 210 215 220
 55
 Arg Gly Ile Pro Glu Phe Asp Ser Ser Met Ser Met Gln Leu Gly Pro
 225 230 235 240
 60
 65

ES 2 275 927 T3

5 Asp Met Val Pro Gln Val Tyr Pro Pro His Ser His Ser Ile Pro Pro
245 250 255

10 Tyr Gln Gly Leu Ser Pro Glu Glu Ser Val Asn Val Leu Ser Ala Phe
260 265 270

15 Gln Glu Pro His Leu Gln Met Pro Pro Ser Leu Gly Gln Met Ser Leu
275 280 285

20 Pro Phe Asp Gln Pro His Pro Gln Gly Leu Leu Pro Cys Gln Pro Gln
290 295 300

25 Glu His Ala Val Ser Ser Pro Asp Pro Leu Leu Cys Ser Asp Val Thr
305 310 315 320

30 Met Val Glu Asp Ser Cys Leu Ser Gln Pro Val Thr Ala Phe Pro Gln
325 330 335

35 Gly Thr Trp Ile Gly Glu Asp Ile Phe Pro Pro Leu Leu Pro Pro Thr
340 345 350

40 Glu Gln Asp Leu Thr Lys Leu Leu Leu Glu Gly Gln Gly Glu Ser Gly
355 360 365

45 Gly Gly Ser Leu Gly Ala Gln Pro Leu Leu Gln Pro Ser His Tyr Gly
370 375 380

50 Gln Ser Gly Ile Ser Met Ser His Met Asp Leu Arg Ala Asn Pro Ser
385 390 395 400

Trp

55

<210> 2

<211> 171

60 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 275 927 T3

<400> 2

5 Asp Ser Ser Met Ser Met Gln Leu Gly Pro Asp Met Val Pro Gln Val
1 5 10 15

10 Tyr Pro Pro His Ser His Ser Ile Pro Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Pro
20 25 30

15 Glu Glu Ser Val Asn Val Leu Ser Ala Phe Gln Glu Pro His Leu Gln
35 40 45

20 Met Pro Pro Ser Leu Gly Gln Met Ser Leu Pro Phe Asp Gln Pro His
50 55 60

25 Pro Gln Gly Leu Leu Pro Cys Gln Pro Gln Glu His Ala Val Ser Ser
65 70 75 80

30 Pro Asp Pro Leu Leu Cys Ser Asp Val Thr Met Val Glu Asp Ser Cys
85 90 95

35 Leu Ser Gln Pro Val Thr Ala Phe Pro Gln Gly Thr Trp Ile Gly Glu
100 105 110

40 Asp Ile Phe Pro Pro Leu Leu Pro Pro Thr Glu Gln Asp Leu Thr Lys
115 120 125

45 Leu Leu Leu Glu Gly Gln Gly Glu Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gly Ala
130 135 140

50 Gln Pro Leu Leu Gln Pro Ser His Tyr Gly Gln Ser Gly Ile Ser Met
145 150 155 160

55 Ser His Met Asp Leu Arg Ala Asn Pro Ser Trp
165 170

60

<210> 3

<211> 310

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 275 927 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: derivado de un fragmento de NCoA-1

5 <400> 3

10	Met	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser
	1					5				10					15	
15	Gly	Met	Lys	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Arg	Gln	His	Met	Asp
				20					25					30		
20	Ser	Pro	Asp	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Met	Gly	Tyr	Leu
			35					40					45			
25	Trp	Ile	Gln	Glu	Ala	Cys	Gln	Arg	Tyr	Glu	Val	Met	Gln	Cys	Phe	Thr
	50						55						60			
30	Val	Ser	Gln	Pro	Lys	Ser	Ile	Gln	Glu	Asp	Gly	Glu	Asp	Phe	Gln	Ser
	65						70				75				80	
35	Cys	Leu	Ile	Cys	Ile	Ala	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Pro	Pro	Ala	Ile	Thr
					85					90					95	
40	Gly	Val	Glu	Ser	Phe	Met	Thr	Lys	Gln	Asp	Thr	Thr	Gly	Lys	Ile	Ile
					100					105				110		
45	Ser	Ile	Asp	Thr	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Gly	Arg	Thr	Gly	Trp	Glu
50																
55																
60																
65																

ES 2 275 927 T3

Pro Phe Ile Met Gly Ile His Ile Ile Asp Arg Glu His Ser Gly Leu
 145 150 155 160

5

Ser Pro Gln Asp Asp Ser Asn Ser Gly Met Ser Ile Pro Arg Ile Asn
 165 170 175

10

Pro Ser Val Asn Pro Gly Ile Ser Pro Ala His Gly Val Thr Arg Ser
 180 185 190

15

Ser Thr Leu Pro Pro Ser Asn Asn Asn Met Val Ser Ala Arg Val Asn
 195 200 205

20

Arg Gln Gln Ser Ser Asp Leu Asn Ser Ser Ser Ser His Thr Asn Ser
 210 215 220

25

Ser Asn Asn Gln Gly Asn Phe Gly Cys Ser Pro Gly Asn Gln Ile Val
 225 230 235 240

30

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

35

<210> 5

<211> 56

<212> PRT

40

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

45

Pro Pro Leu Leu Pro Pro Thr Glu Gln Asp Leu Thr Lys Leu Leu Leu
 1 5 10 15

50

Glu Gly Gln Gly Glu Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gly Ala Gln Pro Leu
 20 25 30

55

Leu Gln Pro Ser His Tyr Gly Gln Ser Gly Ile Ser Met Ser His Met
 35 40 45

60

Asp Leu Arg Ala Asn Pro Ser Trp
 50 55

65

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 275 927 T3

<220>

<223> Parte de SEQ ID NO 5

5 <400> 6

Leu Leu Pro Pro Thr Glu Gln Asp Leu Thr Lys Leu Leu Leu Glu
1 5 10 15

10

Gly Gln Gly Glu Ser Gly
20

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65