



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 770**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06771706 .6**  
96 Fecha de presentación : **30.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1885744**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54 Título: **Sustrato para la actividad enzimática de Rpn11.**

30 Prioridad: **27.05.2005 US 685426 P**  
**19.08.2005 US 709659 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.04.2011**

73 Titular/es: **PROTEOLIX, Inc.**  
**230 East Grand Avenue, Suite A**  
**South San Francisco, California 94080, US**

72 Inventor/es: **Bennett, Mark, K.;**  
**Parlati, Francesco y**  
**Aujay, Monette**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 356 770 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

**Sustrato para la actividad enzimática de Rpn 11****Antecedentes**

5 La proteólisis por el proteasoma 26S avanza mediante la unión de una proteína sustrato ubiquitinada a la partícula reguladora 19S, seguido por su desubiquitinación, desplegado y translocación a la luz del núcleo 20S, donde se degrada. En los últimos años, se ha hecho evidente que el proteasoma es una diana atractiva para la intervención terapéutica en cáncer, trastornos relacionados con el sistema inmunitario, inflamación, estados isquémicos, trastornos neurodegenerativos y otras enfermedades. Hasta la fecha, el único inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA (VELCADE™) funciona inhibiendo la actividad de las peptidasas del núcleo 20S. No obstante, la inhibición de otras actividades enzimáticas que residen dentro del complejo de proteasoma podría servir como un medio igualmente eficaz, si no mejor, de controlar la función del proteasoma.

10 Un candidato de diana es la metaloproteasa, Rpn11, que reside dentro de la partícula reguladora 19S. Es responsable de la desubiquitinación inicial de las proteínas diana (Eytan, *et al.* JBC 268(7):4668-4674 (1993); Verma, *et al.* Science 298:611-615 (2002)). El homólogo humano de esta proteína de levadura es POH1. Hasta la fecha, no se ha generado una forma recombinante de Rpn11. Sin embargo, la actividad desubiquitinante asociada con Rpn11 puede distinguirse en el contexto de un complejo de proteasoma 26S purificado por su sensibilidad a ATP- $\gamma$ S y 1,10-fenantrolina (OPA) y su insensibilidad a inhibidores de proteasa del núcleo 20S y los inhibidores de DUB clásicos (ubiquitina aldehído (UB-Al) o ubiquitina vinilsulfona (UbVS)).

15 En la carrera por aprender más acerca de Rpn11 y su actividad desubiquitinante, se han empleado varios ensayos. La mayoría utilizan extractos del proteasoma 26S purificado como fuente de la enzima y observan la degradación en presencia o ausencia de un inhibidor de DUB. La detección de la actividad de Rpn11 requirió una proteína ubiquitinada tal como Ub-sic 1 (Verma *et al.*, citado anteriormente) y la reacción se monitorizó mediante SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia o bien con  $\alpha$ -ubiquitina ( $\alpha$ -Ub) o bien con  $\alpha$ -proteína tal como  $\alpha$ -sic 1. Los sustratos que estaban radiomarcados o marcados de manera fluorescente todavía requerían una etapa que separaba el sustrato no escindido del producto escindido, tal como PAGE (Eytan *et al.*, citado anteriormente) o precipitación con TCA (Yao *et al.*, Nature 419: 403-407 (2002)), respectivamente.

20 Por tanto, es altamente deseable un ensayo de alto rendimiento (HTP) que emplee proteínas sustrato de Rpn11 novedosas con el fin de seleccionar grandes números de moléculas para identificar moduladores de la actividad de Rpn11.

**Breve descripción de la solicitud**

25 En consecuencia, esta invención proporciona péptidos que son sustratos de la actividad enzimática del proteasoma (por ejemplo, Rpn11) y diversos métodos que emplean los sustratos peptídicos, tales como ensayos que miden las actividades enzimáticas del proteasoma (por ejemplo, Rpn11) que seleccionan agentes que modulan las actividades enzimáticas del proteasoma, definiéndose dichos péptidos y métodos en las reivindicaciones. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteínas" se usan en el presente documento de manera intercambiable. El término "proteasoma" se refiere al proteasoma 26S, a la partícula reguladora 19S, a un complejo proteico que comprende la partícula reguladora 19S, o a otros complejos proteicos o componentes que comprenden una Rpn11 o una proteína de tipo Rpn11 implicada en la proteólisis mediada por la ubiquitina. El término "Rpn11" también se usa en el presente documento de manera intercambiable con "POH1" y se refiere a cualquier polipéptido que confiera una actividad enzimática de Rpn11, por ejemplo, la actividad de desubiquitinación.

30 Un primer aspecto de la invención proporciona un sustrato peptídico para una proteasa del proteasoma 26S, el proteasoma 20S, o la partícula reguladora 19S. El sustrato peptídico comprende una secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 70%, 80%, 90%, 95% o 100% a la SEQ ID NO: 1 y un resto de ubiquitina que es al menos idéntico en un 90%, 95% o 100% a la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende un resto de ubiquitina que es al menos idéntico en un 90%, 95% o 100% a la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, una primera secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 70%, 80%, 90%, 95% o 100% a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos adicional, que comienza en el extremo C-terminal de la primera secuencia de aminoácidos, que tiene al menos 3, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 500 o más aminoácidos.

35 También se describen sustratos peptídicos que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% a cualquiera de la SEQ ID NO: 3-15 y un resto de ubiquitina que es al menos idéntica en un 70%, 80%, 90%, 95% o 100% a la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende además uno o más restos de ubiquitina en el extremo N-terminal del péptido. En ciertas realizaciones, uno o más restos de ubiquitina pueden estar unidos al péptido a través de la(s) K(s) del péptido.

5 En ciertas realizaciones, un resto de ubiquitina comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 90% o 100% a la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. La unidad de repetición de ubiquitina de 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 también se denomina Ub en el presente documento. En ciertas realizaciones, un resto de ubiquitina comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100 o más repeticiones de Ub. En ciertas realizaciones, un resto de ubiquitina comprende una o más repeticiones de Ub, excepto que el aminoácido 75º de al menos una repetición de Ub es A. En ciertas realizaciones, un resto de ubiquitina comprende una o más repeticiones de Ub, excepto que el aminoácido 76º de al menos una repetición de Ub es A. En ciertas realizaciones en las que un resto de ubiquitina comprende una o más repeticiones de Ub, el aminoácido 76º de al menos una repetición de Ub es G o A.

15 En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende además un agente detectable unido al péptido. El agente detectable puede unirse al péptido usando diferentes métodos, que pueden depender de la identidad del agente detectable y/o la parte del péptido que va a unirse con el agente detectable. Por ejemplo, el agente detectable puede unirse al péptido mediante residuos(s) de C del péptido. El agente detectable puede ser un marcador fluorescente, que puede unirse al sustrato peptídico mediante enlace covalente o no covalente. Un marcador fluorescente puede comprender un péptido fluorescente que puede unirse al péptido mediante enlace covalente o no covalente, por ejemplo, un enlace peptídico. Alternativamente, el agente detectable puede ser un marcador radiactivo, por ejemplo, un aminoácido radiomarcado tal como <sup>35</sup>S-C o <sup>35</sup>S-M.

25 En otras realizaciones, el sustrato peptídico puede comprender una parte de diana, es decir, una parte N-terminal o C-terminal, que se une específicamente a un agente de selección. El agente de selección puede ser un anticuerpo, que reconoce la parte de diana del sustrato peptídico. Alternativamente, el agente de selección puede ser un ión metálico divalente, que se asocia o interacciona específicamente con la parte de diana del sustrato peptídico.

Se describen además ácidos nucleicos que codifican para las diversas proteínas y sustratos peptídicos descritos en el presente documento.

30 Ciertas realizaciones proporcionan un método tal como se define en las reivindicaciones para seleccionar un agente que modula la actividad del proteasoma, por ejemplo, la actividad enzimática del proteasoma 26S o la partícula reguladora 19S. El método incluye proporcionar un sustrato peptídico de la solicitud, por ejemplo, un sustrato peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y uno o más restos de ubiquitina, y combinar el péptido con una mezcla de reacción adecuada para medir actividad del proteasoma en presencia de un agente de prueba. Un cambio en la actividad del proteasoma en presencia del agente de prueba en comparación con la actividad del proteasoma en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula la actividad del proteasoma. La actividad del proteasoma puede determinarse, por ejemplo, midiendo el nivel de escisión del(de los) resto(s) de ubiquitina a partir del péptido. El nivel de escisión puede indicarse mediante la tasa y/o el grado de escisión. El método es útil para seleccionar un agente que potencia o inhibe la actividad del proteasoma.

45 Ciertas realizaciones proporcionan un método tal como se define en las reivindicaciones para seleccionar un agente inhibidor del proteasoma. El agente inhibidor del proteasoma puede comprender un resto o molécula de tipo ubistatina o un resto o molécula de unión a ubiquitina. El agente inhibidor del proteasoma que se une a ubiquitina puede inhibir la proteólisis del sustrato o puede inhibir la actividad del proteasoma a través de otros mecanismos. El agente inhibidor puede tener o no fluorescencia intrínseca.

50 El método puede incluir proporcionar un sustrato peptídico de la solicitud que tiene un marcador fluorescente, por ejemplo, un sustrato peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, uno o más restos de ubiquitina, y un marcador fluorescente, y determinar la polarización de fluorescencia del sustrato peptídico en presencia en comparación con en ausencia de un agente de prueba. Una diferencia en la polarización de fluorescencia en presencia del agente de prueba frente a en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba puede ser un agente inhibidor del proteasoma.

55 Alternativamente, el método puede incluir proporcionar un sustrato peptídico de la solicitud en una mezcla de reacción adecuada en presencia o ausencia de un agente de prueba y determinar si hay alguna diferencia en el peso molecular y/o el tamaño del sustrato peptídico en presencia en comparación con en ausencia del agente de prueba. Una molécula de tipo ubistatina puede producir agregación o multimerización de restos de ubiquitina unidos a un péptido, y por lo tanto, un aumento del peso molecular y/o el tamaño del sustrato peptídico en presencia en comparación con en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba puede ser una molécula de tipo ubistatina. El peso molecular y/o el

tamaño pueden determinarse mediante diversos métodos, tales como electroforesis en gel en condiciones nativas, cromatografía de exclusión por tamaño, dispersión de la luz, etc.

5 El método puede incluir proporcionar un sustrato peptídico de la solicitud, por ejemplo, un sustrato peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y uno o más restos de ubiquitina, y determinar si la fluorescencia intrínseca de un agente de prueba cambia cuando el agente de prueba se combina con el sustrato peptídico en una mezcla de reacción adecuada. Un cambio en la fluorescencia intrínseca del agente de prueba en presencia del sustrato peptídico indica que el agente de prueba puede ser un inhibidor del proteasoma.

10 En otras realizaciones, un método para seleccionar un agente inhibidor del proteasoma puede emplear una mezcla de reacción que comprende una molécula de ubistatina (por ejemplo, ubistatina A o B), además de un sustrato peptídico de la solicitud y con o sin un agente inhibidor de prueba. Un cambio en la fluorescencia intrínseca de la molécula de ubistatina (por ejemplo, ubistatina A o B) medida en presencia del agente inhibidor de prueba en comparación con en ausencia del agente inhibidor de prueba indica que el agente inhibidor de prueba es un inhibidor del proteasoma de tipo ubistatina. El propio agente inhibidor de prueba puede tener o no fluorescencia intrínseca. Este método puede ser particularmente útil para seleccionar un inhibidor del proteasoma de tipo ubistatina que puede competir con la ubistatina para unirse con restos de ubiquitina.

15 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método tal como se define en las reivindicaciones para seleccionar un agente que modula la actividad de diversos componentes del proteasoma o diversas fases del proceso de proteólisis mediado por la ubiquitina. Los diversos componentes del proteasoma y las diversas fases de la proteólisis mediada por la ubiquitina pueden incluir la entrada en el proteasoma de proteínas ubiquitinadas; la desubiquitinación de las proteínas, por ejemplo, mediante Rpn11; el desplegado de las proteínas, por ejemplo, AAA ATPasa; la degradación de las proteínas desubiquitinadas mediante la peptidasa del núcleo.

20 El método emplea al menos dos sustratos peptídicos, es decir, un primer sustrato peptídico que comprende un péptido ubiquitinado y un primer marcador fluorescente, y un segundo sustrato peptídico que comprende un péptido no ubiquitinado y un segundo marcador fluorescente, en el que el primer y el segundo marcadores fluorescentes son detectables a diferentes longitudes de onda. El péptido ubiquitinado se definió anteriormente y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y uno o más restos de ubiquitina. Un péptido no ubiquitinado puede ser cualquier péptido que pueda servir como sustrato para una peptidasa del núcleo, por ejemplo, una proteasa de tipo quimiotriptico, una proteasa de tipo triptico, o una proteasa de tipo PGPH (o caspasa). El método incluye medir la fluorescencia a la longitud de onda del primer marcador detectable en presencia de un proteasoma 26S y en presencia y ausencia de un agente de prueba, y medir la fluorescencia a la longitud de onda del segundo marcador detectable en presencia del proteasoma 26S y en presencia y ausencia de un agente de prueba. Un cambio en la fluorescencia del primer sustrato peptídico en presencia del agente de prueba en comparación con la fluorescencia en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula una actividad asociada con una partícula reguladora 19S. Un cambio en la fluorescencia del segundo sustrato peptídico en presencia del agente de prueba en comparación con la fluorescencia en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula una peptidasa de núcleo 20S.

25 También se describen en el presente documento métodos y composiciones que emplean un agente seleccionado según un método de la solicitud. Por ejemplo, ciertas realizaciones proporcionan un método para tratar o prevenir en un sujeto un estado asociado con la actividad del proteasoma o la proteólisis medida por ubiquitina aberrante que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un agente que modula la actividad del proteasoma, particularmente una actividad enzimática asociada con la partícula reguladora 19S. Un ejemplo de la actividad enzimática asociada con la partícula reguladora 19S es la actividad enzimática de Rpn11.

#### **Breve descripción de los dibujos**

30 La figura 1 muestra el cambio de S14 del péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 a C14 (SEQ ID NO: 4) no altera la capacidad del sustrato para reconocerse y escindirse por Rpn11. Cada sustrato peptídico comprende además un resto de ubiquitina N-terminal que tiene 4 repeticiones de Ub (Ub4). La figura 1 muestra además que la proteólisis del sustrato Ub4-péptido(29) y Ub4-péptido-C14(29) por el proteasoma 26S se inhibe por O-fenantrolina y ATP $\gamma$ S, pero no por ubiquitina aldehído. Se incubaron 2  $\mu$ g de Ub4-péptido(29) o Ub4-péptido-C14(29) con proteasoma 26S 60 nM en tampón B [Tris 50 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 1 mM; ATP 1 mM] y cuando esté indicado ATP $\gamma$ S 5 mM, O-fenantrolina (OPA) 1 mM y ubiquitina aldehído (Ub-aldehído) 5  $\mu$ M en un volumen de 20  $\mu$ l durante 2 horas a 37°C. Se pararon las reacciones añadiendo 7,5  $\mu$ l de colorante de carga y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos. Entonces se cargaron las reacciones en un gel de SDS-PAGE gel, se separaron los productos de reacción mediante electroforesis y se visualizaron las bandas con azul brillante.

La figura 2 muestra que el cambio de S14 del péptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 15 a C14 no altera la capacidad del sustrato para reconocerse y escindir-se por Rpn11. Cada sustrato peptídico comprende además un resto de ubiquitina N-terminal que tiene 4 repeticiones de Ub (Ub4). La figura 2 muestra además que la proteólisis del sustrato Ub4- péptido-C14(14) se inhibe por O-fenantrolina y ATP $\gamma$ S usando el proteasoma 26S de la fuente A pero no de la fuente B. Se llevaron a cabo las reacciones tal como se describió anteriormente para la figura 1, excepto por las siguientes modificaciones: se incubaron 2  $\mu$ g de Ub4- péptido-C14(14) con 60 nM de 26S procedente o bien de la fuente A o bien de la fuente B.

La figura 3 es una representación esquemática de un ensayo de polarización de fluorescencia (FP) que usa un sustrato peptídico ilustrativo de la solitud que comprende un marcador fluorescente, por ejemplo fluoresceína. La figura 3 muestra que la escisión del péptido-C14(29) acoplado a fluoresceína a partir de Ub4-péptido-C14(29) acoplado a fluoresceína da como resultado una disminución en la señal de polarización de fluorescencia.

La figura 4 muestra el resultado de un ensayo de FP que usa un sustrato peptídico de la solitud y la cinética de la proteólisis de Ub4-péptido(29)-fluoresceína por el proteasoma 26S. Se incubaron diversas concentraciones (según esté indicado) de Ub4-péptido(29) acoplado a fluoresceína-5-maleimida con proteasoma 26S 10 nM en Tris 50 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 1 mM; ATP 1 mM a 28°C, y se midió la liberación de péptido(29)-fluoresceína mediante polarización de fluorescencia (excitación a 485 nm; emisión a 510 nm).

La figura 5A ilustra un ensayo de FP de alto rendimiento (HTP) que detecta inhibición por O-fenantrolina de la actividad de Rpn11. Los resultados muestran que O-fenantrolina afecta a la cinética de la proteólisis de Ub4-péptido(29)-fluoresceína por el proteasoma 26S. Se incubó Ub4-péptido 100 nM acoplado a fluoresceína-5-maleimida con proteasoma 26S 10 nM en Tris 50 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; DTT 1 mM; ATP 1 mM a 28°C y se midió la liberación de péptido mediante polarización de fluorescencia (excitación a 485 nm; emisión a 510 nm) en presencia de diversas concentraciones de O-fenantrolina (según esté indicado).

La figura 5B ilustra que la actividad enzimática de Rpn11 no resulta afectada por la presencia de un inhibidor del proteasoma 20S en el ensayo de FP de HTP usando un sustrato peptídico de la solitud. Los resultados muestran que el inhibidor del proteasoma 20S no afecta a la cinética de la proteólisis de Ub4-péptido(29)-fluoresceína por el proteasoma 26S. Se incubó Ub4-péptido 100 nM acoplado a fluoresceína-5-maleimida con proteasoma 26S 10 nM en Tris 50 mM pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM; ATP 1 mM a 28°C y se midió la liberación de péptido mediante polarización de fluorescencia (excitación a 485 nm; emisión a 510 nm) en presencia de diversas concentraciones de inhibidor del proteasoma 20S (según esté indicado).

### **Descripción detallada de la solitud**

La principal vía para la degradación de proteínas en el núcleo y el citoplasma de las células eucariotas es mediante la ruta de la ubiquitina/proteasoma 26S. El proteasoma 26S comprende dos subpartículas principales: el proteasoma 20S y la partícula reguladora 19S. El proteasoma 20S es una estructura cilíndrica con una cavidad interna que contiene los sitios activos de la peptidasa. Los sustratos del proteasoma se insertan en el cilindro, donde son susceptibles de digestión por los sitios activos de la peptidasa del proteasoma 20S. La entrada en el cilindro del proteasoma 20S está regida por la partícula reguladora 19S, que tapa los extremos del cilindro de 20S.

La partícula reguladora 19S se une a los sustratos ubiquitinados y los transloca a la cavidad interna del cilindro 20S, donde se degradan. La partícula reguladora 19S puede estar subdividida además en dos complejos multiproteicos: la base y la tapa. La base comprende un conjunto de seis ATPasas que se piensa que despliegan sustratos y los translocan al proteasoma 20S. La tapa comprende un conjunto de ocho proteínas, algunas de las cuales tienen funciones conocidas, por ejemplo, Rpn11. Los datos bioquímicos también indican que la presencia de la tapa hace que el proteasoma sea selectivo para degradar proteínas ubiquitinadas.

El subcomplejo de tapa del proteasoma 26S está relacionado evolutivamente con el complejo COP9-señalosome, pero la importancia de esta similitud sigue siendo desconocida. Hay informes en la bibliografía de que las preparaciones del proteasoma 26S contienen una variedad de actividades de ubiquitina isopeptidasa asociadas (Eytan *et al.*, citado anteriormente; Verma, *et al.*, Mol Biol Cell 11:3425 (2000)). Un informe más reciente (Verma *et al.*, Science 298:611-615 (2002)) demostró que un sustrato ubiquitinado puede desubiquitinarse completamente mediante el proteasoma 26S purificado para dar un sustrato no modificado en presencia de un inhibidor del proteasoma 20S, por ejemplo, VELCADE™.

Las proteínas que están destinadas a la degradación por la ruta de la ubiquitina/26S se marcan mediante la unión de una cadena de multiubiquitina o poliubiquitina a las cadenas laterales de residuos de lisina en la proteína diana. Estudios recientes también muestran que la ubiquitinación N-terminal también es un modo novedoso importante de modificación de proteínas y dirige la proteína para la proteólisis

mediante el proteasoma 26S (Ciechanover y Ben-Saadon, Trends in Cell Biol. 14(3): 103-106 (2004)). La proteína ubiquitinada se reconoce entonces por el proteasoma 26S mediante un mecanismo que sigue sin entenderse bien. Posteriormente, la proteína ubiquitinada se suelta de cualquier componente estrechamente unido, se desubiquitina, se despliega y se transloca a la cavidad central del complejo 20S, donde se degrada exhaustivamente por los sitios activos proteolíticos que están presentes en esta cavidad interna (peptidasa del núcleo).

Rpn11, una metaloisopeptidasa o metaloproteasa y subunidad intrínseca del subcomplejo de tapa de la partícula reguladora 19S, contiene un motivo de metaloproteasa previsto, conservado (JAMM) que es crítico para la viabilidad celular. Para el fin de esta solicitud, Rpn11 y POH1 son intercambiables. Se cree que Rpn11, al mediar o catalizar la desubiquitinación del sustrato proteico, define una etapa clave en la degradación de proteínas por el proteasoma 26S (Verma *et al.*, 2002, citado anteriormente). Rpn11 y sus ortólogos se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 20030166243. En consecuencia, los sustratos peptídicos para Rpn11 son útiles en el estudio de la actividad de Rpn11 y en la identificación de agentes que modulan la actividad de Rpn11, y por tanto que modulan la proteólisis mediada por ubiquitina.

Una secuencia de aminoácidos representativa de una Rpn11 se expone de la siguiente forma:

subunidad reguladora 14 gi|51701716|sp|O00487|PSDE\_HUMAN no ATPasa del proteasoma 26S (subunidad reguladora rpn11 del proteasoma 26S) (homólogo 1 de PAD1 asociado al proteasoma 26S)

**MDRLRLGGGMPGLGQGPPTDAPAVDTAEQVYISSLALLKMLKHGRAGVP  
MEVMGLMLGEFVDDYTVRVIDVFAMPQSGTGVSVEAVDPVFAQMLDML  
KQTGRPEMVVGWYHSHPGFGCWLXVDINTQQSFEALSERAVA VVVDPIQ  
SVKGVVIDAFRLINANMMVLGHEPRQTTSNLGHLNKPSIQALHGLNRHY  
YSITINYRKNELEQKMLLNHLKKSWMBGLTLQDYSEHCKHNESVVKEMLE  
LAKNYNKAVEBEDKMTPEQLAKNVGKQDPKRHLEEHVDVLMTSNIVQCL  
AAMLDTVVFK (SEQ ID NO:16)**

En ciertas realizaciones, una Rpn11 de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En ciertas realizaciones, una Rpn11 de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 posiciones de la SEQ ID NO: 16. En ciertas realizaciones, tales sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas.

Como informan Verma *et al.*, citado anteriormente, se requiere un motivo JAMM para la capacidad de Rpn11 de desubiquitinar y degradar Ub-Sic1. La mutación de las histidinas previstas del sitio activo en alanina (*rpn11AXA*) era letal y estabilizaba los sustratos de la ruta de la ubiquitina en levaduras. Un motivo JAMM puede representarse por la siguiente secuencia de aminoácidos:

**HSHPGFCWLSXVD (SEQ ID NO: 17)**

en la que X es S o G, preferiblemente G.

Alternativamente, un motivo JAMM puede caracterizarse por la siguiente secuencia:

**MVVGWYHSBPGFCWLSXVDINTQQSFEALSERAVA (SEQ ID NO: 18)**

en la que X es S o G, preferiblemente G; **I** es V o I, preferiblemente I; **Q** es K o Q, preferiblemente Q; **A** es Q o A, preferiblemente A; **S** es N, T o S, preferiblemente S; y **E** es S, P, D o E, preferiblemente E.

En ciertas realizaciones, una Rpn11 de la presente invención comprende un motivo JAMM que es al menos idéntico en un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. En realizaciones más preferidas, una Rpn11 de la presente invención comprende un motivo JAMM que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 3, 4 ó 5 posiciones de la SEQ ID NO: 17. En ciertas realizaciones, tales sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. En realizaciones específicas, una Rpn11 de la presente invención comprende un motivo JAMM que es al menos idéntica en un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18. En realizaciones más preferidas, una Rpn11 de la presente invención comprende un motivo JAMM que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12 ó 15 posiciones de la SEQ ID NO: 18. En ciertas realizaciones, tales sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas.

En ciertas realizaciones, una Rpn11 de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o

100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y la proteína Rpn11 comprende un motivo JAMM que es al menos idéntico en un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

5 En ciertas realizaciones, una Rpn11 de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y la proteína Rpn11 comprende un motivo JAMM que es al menos idéntico en un 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18.

10 En realizaciones más preferidas, una Rpn11 de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 posiciones de la SEQ ID NO: 16, y la Rpn11 comprende un motivo JAMM que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 3, 4 ó 5 posiciones de la SEQ ID NO: 17.

15 En realizaciones más preferidas, una Rpn11 de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 60, 75 ó 90 posiciones de la SEQ ID NO: 16, y la proteína Rpn11 comprende un motivo JAMM que tiene sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12 ó 15 posiciones de la SEQ ID NO: 18.

20 Tal como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" (o "idéntica en un %") se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos idénticos en posiciones correspondientes en dos o más secuencias cuando las secuencias se alinean para maximizar el apareamiento entre secuencias, es decir, teniendo en cuenta los huecos y las inserciones. La identidad puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed, Oxford University Press, Nueva York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993, Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994, Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991, y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Se han diseñado métodos para determinar la identidad para dar el mayor apareamiento entre las secuencias sometidas a prueba. Además, se han codificado métodos para determinar la identidad en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos en programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitarse a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) y Altschul *et al.* Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). El programa BLAST X está disponible públicamente a partir de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). El algoritmo bien conocido de Smith-Waterman también puede usarse para determinar la identidad de secuencia.

40 La frase "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a la agrupación de aminoácidos basándose en ciertas propiedades comunes. Una forma funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Según tales análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferiblemente entre sí, y por lo tanto se parecen entre sí más en su impacto sobre la estructura global de la proteína (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluyen:

- (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg e His,
- (ii) un grupo cargado positivamente, que consiste en Lys, Arg e His,
- (iii) un grupo cargado negativamente, que consiste en Glu y Asp,
- 50 (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp,
- (v) un grupo de anillo con nitrógeno, que consiste en His y Trp,
- (vi) un gran grupo no polar alifático, que consiste en Val, Leu e Ile,
- (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys,
- (viii) un grupo de pequeño residuo, que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro,
- 55 (ix) un grupo alifático que consiste en Val, Leu, Ile, Met y Cys, y

(x) un pequeño grupo hidroxilo que consiste en Ser y Thr.

Además de los grupos presentados anteriormente, cada residuo de aminoácido puede formar su propio grupo, y el grupo formado por un aminoácido individual puede denominarse simplemente mediante la abreviatura de una y/o tres letras para ese aminoácido comúnmente usada en la técnica.

5 Péptidos ilustrativos de la solicitud

10 Se describen diversos péptidos o proteínas, que pueden comprender una cualquiera de las secuencias de la SEQ ID NO: 1-15 expuestas más adelante. En ciertas realizaciones de la invención, un sustrato peptídico para la actividad enzimática del proteasoma (por ejemplo, Rpn11) comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 y 3-15 y comprende además un resto de ubiquitina. Mediante "resto de ubiquitina" se quiere decir un único resto de ubiquitina (Ub) de 76 aminoácidos o un resto de resto de poliubiquitina, tal como la poliubiquitina de 9 repeticiones (tal como se representa por los primeros 684 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2) (también denominada Ub9), o n repeticiones de Ub (también denominada Ubn, en el que n puede ser cualquier número entero). En las realizaciones preferidas, el resto de ubiquitina está en el extremo N-terminal del sustrato peptídico, por lo que el sustrato peptídico se considera modificado mediante ubiquitinación N-terminal o poliubiquitinación N-terminal. Alternativamente, el sustrato peptídico puede tener una estructura primaria "ramificada", por ejemplo, el resto de ubiquitina está unido a K6 de la SEQ ID NO: 1 en un sustrato peptídico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y un resto de ubiquitina, o el resto de ubiquitina está unido a uno cualquiera o más de K6 y K17 de la SEQ ID NO: 3 en un sustrato peptídico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y un resto de ubiquitina. Entre los primeros 14, 15 ó 16 aminoácidos (en N-terminal) de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 y 3-15, uno o más residuos (por ejemplo, tres) pueden sustituirse por A. En cualquiera de la SEQ ID NO: 3-15, uno o más de los residuos de S puede sustituirse por C.

25 En ciertas realizaciones, el aminoácido 75º de la Ub tal como se representa por los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 puede sustituirse por A. En ciertas realizaciones, el aminoácido 76º en la SEQ ID NO: 2 puede sustituirse por A. Los aminoácidos 75º y 76º pueden sustituirse ambos por A. En realizaciones preferidas, el aminoácido 76º es G o A, y preferiblemente no es V.

**SEQ ID NO: 1**

MQIFVKTLRANXXX

30 X puede ser S, C o A

**SEQ ID NO: 2** Ubiquitina (producto génico de ubiquitina C (UBC) de 9 unidades de codificación: la parte subrayada es la ubiquitina individual de 76 aminoácidos)

>gi|340068|gb|AAA36789.1| ubiquitina

MQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDG  
RTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKI  
QDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVK  
TLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDY  
NIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIP  
PDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTI  
TLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKEST  
LHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORL  
IFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTTITLEVEPS  
DTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRL  
RGGMQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQL  
EDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGMQIFVKTLTGKTTITLEVEPSDTIENVK  
AKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGGV

35 **SEQ ID NO: 3** (péptido(29))

MQIFVKTLRANSSSVXKLAALZHSHHHH

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 4** (péptido-C14(29))

MQIFVKTLRANSSCVXKLAALZHSHHHH



X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 5** (péptido-C13(29))

MQIFVKTLRANSCSVXKLAALZHHHHHH

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

5

**SEQ ID NO: 6** (péptido-C12(29))

MQIFVKTLRANCSSVXKLAALZHHHHHH

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 7** (péptido-SΔC(29))

MQIFVKTLRANCCCVXKLAALZHHHHHH

10

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 8** (péptido(28))

MQIFVKTLRANSSSVXKLAALZHHHHH

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 9** (péptido(26))

15

MQIFVKTLRANSSSVXKLAALZHHH

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 10** (péptido(24))

MQIFVKTLRANSSSVXKLAALZH

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

20

**SEQ ID NO: 11** (péptido(23))

MQIFVKTLRANSSSVXKLAALZ

X puede ser D o A; Z puede ser E o A

**SEQ ID NO: 12** (péptido(21))

MQIFVKTLRANSSSVXKLAALZ

25

X puede ser D o A

**SEQ ID NO: 13** (péptido(18))

MQIFVKTLRANSSSVXKL

X puede ser D o A

**SEQ ID NO: 14** (péptido(16))

30

MQIFVKTLRANSSSVX

X puede ser D o A

**SEQ ID NO: 15** (péptido(14))

MQIFVKTLRANSSS

35

También se describen ácidos nucleicos que codifican para las diversas proteínas y sustratos peptídicos descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden ser útiles, por ejemplo, en la obtención de los sustratos peptídicos mediante tecnología de biología molecular recombinante.

En ciertas realizaciones, los sustratos peptídicos comprenden un agente detectable y/o una parte de diana que se une o interacciona específicamente con un agente de selección.

Mediante "agente detectable" en el presente documento se quiere decir un agente que puede detectarse y/o "visualizarse" mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un marcador fluorescente o un marcador radiactivo puede usarse como agente detectable, y un sustrato peptídico que incluye tal agente detectable puede detectarse y/o "visualizarse" mediante métodos conocidos que miden/detectan la fluorescencia (por ejemplo, ensayos de polarización de fluorescencia) o la radioactividad (por ejemplo, autorradiografía o recuento por centelleo). Un marcador fluorescente puede comprender un fluoróforo o un péptido fluorescente (tal como la proteína fluorescente verde o azul). Ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitarse a, FITC, fluoresceína-5-maleimida, BODIPY 499/508 maleimida, BODIPY FL N-(2-aminoetil)maleimida, tetrametilrodamina-6-maleimida y tetrametilrodamina-5-maleimida, 5-yodoacetamidofluoresceína (5-IAF), 6-yodoacetamidofluoresceína (6-IAF), Oregon Green® 488 yodoacetamida, y Oregon Green® 488 maleimida. Un fluoróforo puede "visualizarse" en un gel mediante detección con un anticuerpo anti-fluoróforo o en una mezcla de reacción adecuada mediante detección con un ensayo de fluorescencia homogéneo tal como polarización de fluorescencia.

En ciertas realizaciones, un agente detectable es equivalente a una parte de diana que se une específicamente a un agente de selección. Por ejemplo, un marcador fluorescente con un fluoróforo puede ser una parte de diana que se une específicamente a un anticuerpo anti-fluoróforo. En ciertas realizaciones, un agente detectable es distinto de una parte de diana en la que el agente detectable puede detectarse directamente, mientras que la parte de diana requiere además un agente de selección correspondiente para ayudar en la detección y/o visualización. Por ejemplo, la parte de diana puede ser una proteína tal como GST, y un agente de selección correspondiente puede ser un anticuerpo anti-GST que puede usarse para "visualizar" la parte de diana (y de ese modo el sustrato peptídico que comprende la parte de diana) mediante, por ejemplo, ELISA o inmunotransferencia de tipo Western. Un experto en la técnica puede apreciar que diversas moléculas, por ejemplo, proteínas, ADN, ARN, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, pueden servir como la parte de diana. En realizaciones preferidas, pueden emplearse ciertos epítopos bien conocidos como la parte de diana, por ejemplo, etiqueta de HA (hemaglutinina), epítipo de FLAG, epítipo de Myc, etiqueta His6 y epítipo de T7, y sus anticuerpos correspondientes, bien conocidos, pueden emplearse para determinar su presencia o ausencia. Para una parte de diana tal como la etiqueta His6, también puede servir un ión metálico divalente (por ejemplo, Ni<sup>2+</sup>) como agente de selección.

En ciertas realizaciones preferidas, una parte de diana está ubicada en el extremo N-terminal de un sustrato peptídico de la solicitud.

#### Métodos de obtención de los péptidos

También se describen en el presente documento métodos de obtención de los sustratos peptídicos descritos en el presente documento.

Los péptidos, por ejemplo, cualquiera de la SEQ ID NO: 1 y 3-15 pueden fabricarse mediante síntesis peptídica química convencional. Alternativamente, pueden usarse técnicas de biología molecular recombinante. Pueden emplearse síntesis química y tecnología recombinante en combinación para obtener los sustratos peptídicos de la solicitud.

Un ácido nucleico que codifica para una proteína de la solicitud puede comprender un ácido nucleico o gen de fusión (por ejemplo, un ácido nucleico de fusión que codifica para un sustrato peptídico que comprende un resto de ubiquitina "fusionado" con una secuencia de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 y 3-15), conociéndose en la técnica los métodos para su obtención. Por ejemplo, la unión de diversos fragmentos génicos o de ADN (por ejemplo, un fragmento de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica para un resto de ubiquitina, y un fragmento de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica para un péptido que tiene la secuencia de cualquiera de la SEQ ID NO: 1 y 3-15) que codifican para secuencias polipeptídicas diferentes se lleva a cabo según técnicas convencionales, empleando extremos terminales con extremos romos o extremos escalonados para ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada y ligamiento enzimático. En ciertas realizaciones, puede llevarse a cabo amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden hibridarse posteriormente para generar una secuencia génica de fusión o quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992).

Los constructos de ácido nucleico recombinantes de la descripción pueden fabricarse usando metodologías de ADN recombinante convencionales bien conocidas y absolutamente documentadas en la técnica, así como usando metodologías biosintéticas y quimiosintéticas bien conocidas mediante el uso de técnicas químicas de nucleótidos o péptidos de rutina y sintetizadores de péptidos o nucleótidos automatizados. Tales metodologías de rutina se describen por ejemplo en las siguientes publicaciones, Hilvert, 1 Chem.-Biol. 201-3 (1994); Muir *et al.*, 95 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 6705-10 (1998); Wallace, 6 Cuff. Opin. Biotechnol. 40310 (1995); Miranda *et al.*, 96 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1181-86 (1999); Liu *et*

5 *al.*, 91 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 6584-88 (1994). Adecuados para su uso en la presente descripción son aminoácidos y nucleótidos que se producen de manera natural; aminoácidos y nucleótidos que no se producen de manera natural; aminoácidos modificados o inusuales; bases modificadas, secuencias de aminoácidos que contienen aminoácidos modificados tras la traducción y/ enlaces modificados, reticulaciones y extremos ocupados, enlaces no peptídicos, etc.; y, que incluyen además sin limitación, aquellos restos dados a conocer en World Intellectual Documentation. Standard St. 25 (1998) incluyendo las tablas 1 a 6 en el apéndice 2, incorporadas al presente documento como referencia. El experto en la técnica apreciará equivalentes a los anteriores basándose en la experimentación de rutina, junto con el conocimiento de la técnica.

10 Por ejemplo, los constructos de ADN contemplados pueden fabricarse mediante el ensamblaje de secuencias de nucleótidos sintéticas y/o la unión de fragmentos de restricción de ADN para producir una molécula de ADN sintética. Las moléculas de ADN entonces se ligan, se clonan o se subclonan en un vehículo de expresión, por ejemplo un plásmido de expresión (por ejemplo, pET28a o pGEX), y se transfectan en una célula huésped apropiada, por ejemplo *E. coli*. El constructo de proteína contemplado  
15 codificado por la molécula de ADN entonces se expresa, se purifica, se vuelve a plegar, se somete a prueba *in vitro* para la determinación de ciertos atributos, por ejemplo, actividad de unión con un agente de selección (por ejemplo, un anticuerpo anti-Myc) que tiene afinidad de unión por su parte de diana correspondiente (por ejemplo, el epítipo de Myc) en los sustratos peptídicos, y/o capacidad para servir como sustrato enzimático para medir la actividad del proteasoma.

#### 20 Métodos de uso de péptidos para seleccionar agentes que modulan la actividad del proteasoma

25 La presente invención también proporciona métodos de uso de los sustratos peptídicos descritos en el presente documento, por ejemplo, seleccionando uno o más agentes que modulan la actividad del proteasoma. Tal como se describió anteriormente, la actividad del proteasoma implica diversos componentes, y puede seleccionarse un agente que module un componente particular de la actividad del proteasoma, por ejemplo, la entrada de una proteína seleccionada como diana para su degradación (por ejemplo, modificada mediante ubiquitinación) en el proteasoma, la actividad Rpn11 u otra actividad metaloproteasa de la partícula reguladora 19S, la actividad ATPasa, o la actividad peptidasa del núcleo del complejo 20S.

30 En una realización, una enzima o preparación enzimática usada en los ensayos de selección proporcionados por la presente solicitud es un complejo polipeptídico del proteasoma 26S o la partícula reguladora 19S, o un polipéptido o complejo polipeptídico que tiene actividad enzimática de Rpn11. Un complejo polipeptídico del proteasoma 26S o la partícula reguladora 19S, o un polipéptido o complejo polipeptídico que tiene actividad enzimática de Rpn11 puede obtenerse mediante cualquier metodología adecuada. Por ejemplo, el proteasoma 26S puede purificarse a partir de tejidos o células eucariotas, por  
35 ejemplo, *S. cerevisiae* o ser humano.

40 En otra realización, la incubación en presencia y ausencia de un agente de prueba, una proteína o sustrato peptídico diana, y el proteasoma 26S de los ensayos de selección proporcionados por la presente solicitud se lleva a cabo opcionalmente en presencia de un inhibidor del proteasoma 20S. Puede usarse cualquier inhibidor del proteasoma 20S o inhibidor del proceso de degradación para el fin de la presente solicitud. Por ejemplo, un inhibidor del proteasoma 20S puede ser MG132, lactacistina, epoxomicina, YU101, PS-349, PS-519, LLnL, o derivados de los mismos. En general, un inhibidor de este tipo previene o disminuye la degradación de una proteína diana que no está conjugada con ubiquitina.

45 Aún en otra realización, la incubación se realiza además en presencia de una fuente de energía, por ejemplo, ATP. Todavía en otra realización, la incubación se realiza además en presencia de un inhibidor de la desubiquitinación mediante una ubiquitina isopeptidasa convencional, por ejemplo, una ubiquitina isopeptidasa distinta de las asociadas con una subunidad JAB tal como el proteasoma 26S. Un ejemplo de un inhibidor de este tipo es la ubiquitina aldehído, por ejemplo, a 2-5  $\mu$ M.

50 En ciertas realizaciones, la detección de la actividad enzimática del proteasoma emplea un sustrato proteico ubiquitinado tal como un sustrato peptídico tal como se describe en el presente documento, y la reacción se monitorizó mediante SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia con o bien anticuerpo anti-ubiquitina o bien otro anticuerpo específico para otro componente del sustrato peptídico, por ejemplo, una parte de diana tal como Myc. Alternativamente, tras haberse expuesto a la enzima o la preparación enzimática que va a someterse a prueba, los sustratos peptídicos que comprenden un radiomarcador o marcador fluorescente pueden someterse a SDS-PAGE para separar el sustrato  
55 peptídico no escindido del producto escindido (Eytan *et al.*, citado anteriormente) o precipitación con TCA (Yao *et al.*, Nature 419: 403-407 (2002)), y la radioactividad o fluorescencia puede detectarse con medios conocidos en la técnica.

60 Ciertas realizaciones proporcionan un método para seleccionar un agente que modula la actividad enzimática del proteasoma 26S, la partícula reguladora 19S, o un polipéptido o complejo polipeptídico que tiene actividad enzimática de Rpn11. El método incluye proporcionar un sustrato peptídico de la solicitud, es decir, un sustrato peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 1 y uno o más restos de ubiquitina, y combinar el péptido con una mezcla de reacción adecuada para medir la actividad del proteasoma en presencia de un agente de prueba. Un cambio en la actividad del proteasoma en presencia del agente de prueba en comparación con la actividad del proteasoma en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula la actividad del proteasoma. La actividad del proteasoma puede determinarse, por ejemplo, midiendo el nivel de escisión del(de los) resto(s) de ubiquitina a partir del péptido. El nivel de escisión puede indicarse mediante la tasa y/o el grado de escisión. El método es útil para seleccionar un agente que potencia o inhibe la actividad del proteasoma.

Una publicación reciente (Verma *et al.*, Science 306:117-120 (2004)) identificó otro tipo de inhibidor del proteasoma, denominado "ubistatina." La ubistatina funciona mediante la unión a las cadenas de ubiquitina o poliubiquitina unidas a la proteína seleccionada como diana para su degradación, y evitando de ese modo que la molécula peptídica entre en el proteasoma. Los sustratos peptídicos de la presente solicitud pueden emplearse para seleccionar los inhibidores del proteasoma de tipo ubistatinas. Por ejemplo, un sustrato peptídico de la solicitud puede usarse para comparar un efecto del agente inhibidor de prueba sobre la actividad del proteasoma 26S (por ejemplo, midiendo la  $Cl_{50}$ ) con su efecto sobre la actividad isopeptidase T. Si los efectos son equivalentes para las diferentes enzimas o preparaciones enzimáticas, el agente inhibidor de prueba está actuando sobre el sustrato peptídico, no sobre las enzimas, y por tanto actúa como una molécula de ubistatina. También se observa que la ubistatina A, también denominada compuesto 92 (Verma *et al.*, 2004, citado anteriormente), se une a una proteína sustrato, y la fluorescencia intrínseca detectada a partir del compuesto 92 aumenta. Esta característica inherente, permite por lo tanto seleccionar moléculas de tipo ubistatina en un ensayo que mide cambios, en presencia en comparación con en ausencia de un agente de prueba, en la fluorescencia intrínseca de ubistatina y/o el agente de prueba. Puede usarse un ensayo basado en competencia en el que una molécula de ubistatina, un agente de prueba y un sustrato peptídico se combinan entre sí en un ensayo/mezcla de reacción adecuados para medir la fluorescencia intrínseca, y un cambio en la fluorescencia intrínseca de la ubistatina en presencia en comparación con en ausencia del agente de prueba en la mezcla indica que el agente de prueba puede ser de tipo ubistatina y puede competir con la ubistatina para unirse al sustrato peptídico. Puede emplearse otro ensayo en el que un agente de prueba y un sustrato peptídico se combinan entre sí en un ensayo/mezcla de reacción adecuados para medir la fluorescencia intrínseca, y un cambio en la fluorescencia intrínseca del agente de prueba en presencia del sustrato peptídico indica que el agente de prueba es un inhibidor del proteasoma de tipo ubistatina.

Un método de selección de la invención incluye proporcionar un sustrato peptídico de la solicitud que tiene un marcador fluorescente, por ejemplo, un sustrato peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, uno o más restos de ubiquitina y un marcador fluorescente, y determinar la polarización de fluorescencia del sustrato peptídico en presencia en comparación con en ausencia de un agente de prueba. Una diferencia en la polarización de fluorescencia en presencia del agente de prueba frente a en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba puede ser un agente inhibidor del proteasoma. Sin querer restringirse a ninguna teoría, el agente de prueba puede funcionar de una manera de tipo ubistatina, por ejemplo, produciendo agregación o multimerización de restos de ubiquitina de los sustratos peptídicos. Tal agregación o multimerización puede detectarse mediante cualquier metodología adecuada para detectar cambios en el peso molecular y/o el tamaño de las moléculas, por ejemplo, de los sustratos peptídicos. Una metodología adecuada puede ser electroforesis en gel en condiciones nativas, cromatografía por exclusión de tamaño (o filtración en gel), polarización de fluorescencia, dispersión de la luz, o cualquier otro medio adecuado.

Ciertas realizaciones proporcionan un método para seleccionar un agente inhibidor del proteasoma. El agente inhibidor del proteasoma puede comprender una molécula de tipo ubistatina o una molécula de unión de tipo ubiquitina. El agente inhibidor del proteasoma que se une a ubiquitina puede inhibir la proteólisis del sustrato o puede inhibir la actividad del proteasoma a través de otros mecanismos. El agente inhibidor puede tener o no fluorescencia intrínseca.

Ciertas realizaciones también proporcionan un método para seleccionar un agente inhibidor del proteasoma que modula la actividad AAA ATPasa. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, se ha observado que la actividad AAA ATPasa está acoplada con la actividad enzimática de Rpn11. En consecuencia, un agente inhibidor específico para la actividad enzimática de Rpn11 también puede modular la actividad AAA ATPasa.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para seleccionar un agente que modula la actividad de diversos componentes del proteasoma o diversas fases del proceso de proteólisis mediada por ubiquitina. Los diversos componentes del proteasoma y las diversas fases de la proteólisis mediada por la ubiquitina pueden incluir la entrada en el proteasoma de las proteínas ubiquitinadas; la desubiquitinación de las proteínas, por ejemplo, mediante Rpn11; el desplegado de las proteínas, por ejemplo, AAA ATPasa; la degradación de las proteínas desubiquitinadas mediante una peptidasa del núcleo.

El método emplea al menos dos sustratos peptídicos, es decir, un primer sustrato peptídico que comprende un péptido ubiquitinado y un primer marcador fluorescente, y un segundo sustrato peptídico que comprende un péptido no ubiquitinado y un segundo marcador fluorescente, en el que el primer y el segundo marcadores fluorescentes son detectables a diferentes longitudes de onda. Un péptido ubiquitinado se definió anteriormente y comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y restos de ubiquitina. Un péptido no ubiquitinado puede ser cualquier péptido que pueda servir como sustrato para una peptidasa del núcleo, por ejemplo, una proteasa de tipo quimiotriptico, una proteasa de tipo triptico, o una proteasa de tipo PGPH (o caspasa). El método incluye medir la fluorescencia a la longitud de onda del primer marcador detectable en presencia y ausencia de un agente de prueba, y medir la fluorescencia a la longitud de onda del segundo marcador detectable en presencia y ausencia de un agente de prueba. Un cambio en la fluorescencia del primer sustrato peptídico en presencia del agente de prueba en comparación con la fluorescencia en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula una actividad asociada con una partícula reguladora 19S. Un cambio en la fluorescencia del segundo sustrato peptídico en presencia del agente de prueba en comparación con la fluorescencia en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula una peptidasa de núcleo 20S.

Además se describen ensayos de alto rendimiento que emplean ciertos sustratos peptídicos (por ejemplo, un sustrato peptídico que comprende un marcador fluorescente) descritos en el presente documento, ensayos que pueden diseñarse basándose en los métodos descritos en el presente documento. Los ensayos de alto rendimiento son particularmente útiles para seleccionar e identificar agentes que pueden modular la actividad del proteasoma y de ese modo la degradación de proteínas mediada por la ubiquitina.

Un ensayo de alto rendimiento puede emplear un método de selección que determina si un agente de prueba produce cambios en el tamaño y/o el peso molecular de un sustrato peptídico en una mezcla de reacción adecuada. Un método de selección de este tipo puede emplear un ensayo de polarización de fluorescencia para medir cambios en el tamaño y/o el peso molecular del sustrato peptídico.

El agente de prueba usado para los métodos de selección de la presente solicitud puede ser cualquier agente de cualquier biblioteca de compuestos o moléculas. En una realización, el agente de prueba se selecciona o se deriva de compuestos que es probable que inhiban la actividad de la metaloproteinasas, por ejemplo, compuestos que tienen funcionalidad de unión a zinc. Por ejemplo, el agente de prueba puede ser cualquier compuesto que tenga un resto hidroxamato o un miembro de una biblioteca de compuestos de hidroxamato, biblioteca de compuestos de hidroxamato inverso, biblioteca de compuestos de tiol, biblioteca de compuestos de carboxilato, o biblioteca de compuestos de ácido fosfónico.

Los agentes sometidos a prueba en los métodos de selección para identificar agentes que modulan la actividad del proteasoma proporcionados en el presente documento pueden ser de cualquier tipo físico. Ejemplos de agentes incluyen, pero sin limitarse a, biomoléculas, incluyendo, pero sin limitarse a, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, nucleótidos, ácidos nucleicos (incluyendo ADN, ADNc, ARN, ARN antisentido y cualquier forma monocatenaria o bicatenaria de los ácidos nucleicos y derivados y análogos estructurales de los mismos), polinucleótidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, hidratos de carbono, lípidos, lipoproteínas y glucoproteínas. Tales biomoléculas pueden purificarse sustancialmente, o pueden estar presentes en una mezcla, tal como un extracto celular o sobrenadante. Los agentes de prueba incluyen además compuestos químicos naturales o sintéticos, tales como moléculas orgánicas sencillas o complejas, compuestos que contienen metal e iones inorgánicos (incluyendo, por ejemplo,  $Gd^{3+}$ , plomo y lantano). También se incluyen compuestos farmacológicos, que pueden someterse opcionalmente a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc., para producir análogos estructurales.

#### Usos de los agentes seleccionados

También se describen métodos y composiciones que emplean un agente seleccionado según un método de la solicitud. Por ejemplo, ciertas realizaciones proporcionan un método para tratar o prevenir en un sujeto un estado asociado con la proteólisis mediada por la ubiquitina o la actividad del proteasoma que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un agente que modula la actividad del proteasoma, particularmente, la actividad enzimática de Rpn11.

El término "prevenir" está reconocido en la técnica, y cuando se usa en relación con un estado, tal como una recurrencia local (por ejemplo, dolor), una enfermedad tal como cáncer, un complejo síndrome tal como insuficiencia cardíaca o cualquier otro estado médico, se entiende bien en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retrasa el comienzo de, los síntomas de un estado médico en un sujeto en relación con un sujeto que no recibe la composición. Por tanto, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, reducir el número de crecimientos cancerosos detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico en relación con una población control no tratada, y/o retrasar la aparición de crecimientos cancerosos detectables en una

población tratada frente a una población control no tratada, por ejemplo, en una cantidad estadística y/o clínicamente significativa. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, reducir el número de diagnósticos de la infección en una población tratada frente a una población control no tratada, y/o retrasar el comienzo de los síntomas de la infección en una población tratada frente a una población control no tratada. La prevención del dolor incluye, por ejemplo, reducir la magnitud de, o alternativamente retrasar, las sensaciones de dolor experimentadas por los sujetos en una población tratada frente a una población control no tratada.

El término “tratar” incluye tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. El término tratamiento “profiláctico o terapéutico” está reconocido en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más de las composiciones objeto. Si se administran antes de la manifestación clínica del estado no deseado (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) entonces el tratamiento es profiláctico, (es decir, protege al huésped frente al desarrollo del estado no deseado), mientras que si se administra tras la manifestación del estado no deseado, el tratamiento es terapéutico, (es decir, pretende disminuir, mejorar o estabilizar el estado no deseado existente o los efectos secundarios del mismo).

Cualquier agente que pueda inhibir o disminuir la actividad del proteasoma, por ejemplo, modulando la desconjugación, eliminación o separación de una molécula de ubiquitina de una proteína diana, puede usarse profilácticamente o terapéuticamente para tratar o prevenir diversos estados asociados con la regulación de proteínas mediante la degradación o la proteólisis. Por ejemplo, cualquier agente identificado por los métodos de selección de la presente solicitud que puedan disminuir la desconjugación de la ubiquitina de una proteína diana, por ejemplo, un inhibidor de la actividad isopeptidasa del proteasoma 26S, puede usarse terapéuticamente para tratar el crecimiento neoplásico, angiogénesis, infección, inflamación, enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario isquemia y lesión por reperfusion, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, estados neurodegenerativos y psoriasis. Ciertos estados o trastornos asociados con la actividad del proteasoma o la degradación de proteínas mediada por la ubiquitina aberrantes pueden caracterizarse por la acumulación de proteínas ubiquitinadas.

Muchas enfermedades y estados están asociados con la regulación de proteína mediante la proteólisis o la actividad del proteasoma. Tales enfermedades y estados incluyen reestenosis, inflamación, artritis reumatoide, lesión tisular debida a inflamación, enfermedades hiperproliferativas, psoriasis grave o artrítica, enfermedades de atrofia muscular progresiva, enfermedades infecciosas crónicas, respuesta inmunitaria anómala, estados que implican placas vulnerables, lesiones relacionadas con estados isquémicos, e infección y proliferación viral. Los agentes identificados o seleccionados mediante la presente solicitud pueden ser útiles para el tratamiento de estados asociados con inflamación crónica, incluyendo, pero sin limitarse a EPOC, psoriasis, bronquitis, enfisema y fibrosis quística.

Los agentes identificados en el presente documento pueden usarse para tratar estados mediados directamente por la función proteolítica del proteasoma tal como atrofia muscular progresiva, o mediados indirectamente por proteínas que se procesan por el proteasoma, tal como NF- $\kappa$ B. El proteasoma participa en la eliminación rápida y el procesamiento tras la traducción de las proteínas (por ejemplo, enzimas) implicadas en la regulación celular (por ejemplo, ciclo celular, transcripción génica y rutas metabólicas), la comunicación intercelular, y la respuesta inmunitaria (por ejemplo, presentación de antígenos). Ejemplos específicos tratados más adelante incluyen la proteína  $\beta$ -amiloide y las proteínas reguladoras tales como ciclinas, TGF- $\beta$  y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

También se describe el uso de agentes identificados en el presente documento para el tratamiento de enfermedades y estados neurodegenerativos, incluyendo, pero sin limitarse a, accidente cerebrovascular, lesión isquémica en el sistema nervioso, traumatismo neural (por ejemplo, daño cerebral por percusión, lesión en la médula espinal y daño por traumatismo en el sistema nervioso), esclerosis múltiple y otras neuropatías mediadas por el sistema inmunitario (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barre y sus variantes, neuropatía axonal motora aguda, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y síndrome de Fisher), complejo de demencia asociado a VIH/SIDA, axonomía, neuropatía diabética, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, meningitis bacteriana, parasitaria, fúngica y vírica, encefalitis, demencia vascular, demencia por infarto múltiple, demencia por cuerpos de Lewy, demencia del lóbulo frontal tal como enfermedad de Pick, demencias subcorticales (tales como enfermedad de Huntington o parálisis supranuclear progresiva), síndromes de atrofia cortical focal (tales como afasia primaria), demencias metabólicas tóxicas (tales como hipotiroidismo crónico o deficiencia de B12), y demencias producidas por infecciones (tales como meningitis crónica o por sífilis).

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por depósitos extracelulares de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ -AP) en placas seniles y vasos cerebrales. La  $\beta$ -AP es un fragmento peptídico de 39 a 42 aminoácidos derivados de un precursor de proteína amiloide (APP). Se conocen al menos tres isoformas de APP (de 695, 751 y 770 aminoácidos). El corte y empalme alternativo del ARNm genera las isoformas; el procesamiento normal afecta a una parte de la secuencia de la  $\beta$ -AP, evitando de ese modo la generación de  $\beta$ -AP. Se cree que el procesamiento anómalo de la proteína por el proteasoma contribuye a la abundancia de  $\beta$ -AP en el cerebro con Alzheimer. La enzima que procesa la APP en ratas contiene

aproximadamente diez subunidades diferentes (22 kDa-32 kDa). La subunidad de 25 kDa tiene una secuencia N-terminal de X-Gln-Asn-Pro-Met-X-Thr-Gly-Thr-Ser, que es idéntica a la subunidad  $\beta$  de la macropaína humana (Kojima, S. *et al.*, Fed. Eur. Biochem. Soc., (1992) 304:57-60). La enzima que procesa la APP escinde en el enlace Gln15-Lys16; en presencia del ión calcio, la enzima también escinde en el enlace Met-1-Asp1 y en el enlace Asp1- Ala2 para liberar el dominio extracelular de  $\beta$ -AP.

Un ejemplo, por lo tanto, es un método de tratar la enfermedad de Alzheimer, que incluye administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) dado a conocer en el presente documento. Un tratamiento de este tipo incluye reducir la tasa de procesamiento de la  $\beta$ -AP, reducir la tasa de formación de placas de  $\beta$ -AP, reducir la tasa de generación de  $\beta$ -AP y reducir los signos clínicos de la enfermedad de Alzheimer.

Otros ejemplos están relacionados con las enfermedades de caquexia y atrofia muscular progresiva. El proteasoma degrada muchas proteínas en los reticulocitos en fase de maduración y fibroblastos en crecimiento. En células privadas de insulina o suero, casi se duplica la tasa de proteólisis. La inhibición del proteasoma reduce la proteólisis, reduciendo de ese modo tanto la pérdida de proteína muscular como la carga nitrogenada en los riñones o el hígado. Los agentes inhibidores de la actividad son útiles para tratar estados tales como cáncer, enfermedades infecciosas crónicas, fiebre, denervación e inactividad muscular (atrofia), lesión nerviosa, ayunas, insuficiencia renal asociada con acidosis, diabetes e insuficiencia hepática. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.340.736. Las realizaciones de la descripción engloban por lo tanto métodos para: reducir la tasa de degradación de proteínas musculares en una célula; reducir la tasa de degradación intracelular de proteínas; reducir la tasa de degradación de la proteína p53 en una célula; e inhibir el crecimiento de cánceres relacionados con p53. Cada uno de estos métodos incluye poner en contacto una célula (*in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, un músculo en un sujeto) con una cantidad eficaz de un agente o composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) dada a conocer en el presente documento.

La fibrosis es la formación en exceso y persistente de tejido cicatricial que resulta del crecimiento hiperproliferativo de fibroblastos y está asociada con la activación de la ruta de señalización del TGF- $\beta$ . La fibrosis implica la amplia deposición de la matriz extracelular y puede producirse dentro de prácticamente cualquier tejido o a través de varios tejidos diferentes. Normalmente, el nivel de proteína de señalización intracelular (Smad) que activa la transcripción de los genes diana con la estimulación del TGF- $\beta$  se regula por la actividad del proteasoma. Sin embargo, se ha observado una degradación acelerada de los componentes de señalización del TGF- $\beta$  en cánceres y otros estados hiperproliferativos. Por tanto, ciertos aspectos de la descripción se refieren a un método para tratar estados hiperproliferativos tales como retinopatía diabética, degeneración macular, neuropatía diabética, glomeruloesclerosis, neuropatía por IgA, cirrosis, atresia biliar, insuficiencia cardíaca congestiva, esclerodermia, fibrosis inducida por radiación y fibrosis pulmonar (fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad vascular del colágeno, sarcoidosis, enfermedades pulmonares intersticiales y trastornos pulmonares extrínsecos). El tratamiento de las víctimas de quemaduras a menudo resulta dificultado por la fibrosis, por tanto, una realización adicional de la solicitud es la administración tópica o sistémica de los inhibidores para tratar quemaduras. El cierre de heridas tras la cirugía a menudo está asociado con cicatrices que desfiguran, lo que puede evitarse mediante la inhibición de la fibrosis. Por tanto, en ciertos aspectos, la descripción se refiere a un método para la prevención o la reducción de la cicatrización.

Otra proteína procesada por el proteasoma es NF- $\kappa$ B, un miembro de la familia de proteínas Rel. La familia Rel de proteínas activadoras de la transcripción puede dividirse en dos grupos. El primer grupo requiere el procesamiento proteolítico e incluye p50 (NF- $\kappa$ B1, 105 kDa) y p52 (NF- $\kappa$ 2, 100 kDa). El segundo grupo no requiere el procesamiento proteolítico e incluye p65 (RelA, Rel (c-Rel) y RelB). Los miembros de la familia Rel pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros; NF- $\kappa$ B, por ejemplo, es un heterodímero p50-p65. Tras la fosforilación y la ubiquitinación de I $\kappa$ B y p105, las dos proteínas se degradan y se procesan, respectivamente, para producir NF- $\kappa$ B activo que se transloca desde el citoplasma hasta el núcleo. p105 ubiquitinada también se procesa mediante proteasomas purificados (Palombella *et al.*, Cell (1994) 78:773-785). NF- $\kappa$ B activo forma un complejo potenciador estereoespecífico con otros activadores de la transcripción y, por ejemplo, HMG I(Y), que induce la expresión selectiva de un gen particular.

NF- $\kappa$ B regula genes implicados en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, y acontecimientos mitóticos. Por ejemplo, NF- $\kappa$ B se requiere para la expresión del gen de la cadena ligera  $\kappa$  de las inmunoglobulinas, el gen de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, el gen del complejo mayor de histocompatibilidad y varios genes de citosina que codifican para, por ejemplo, IL-2, IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos e IFN- $\beta$  (Palombella *et al.*, Cell (1994) 78:773-785). Algunas realizaciones de la solicitud incluyen métodos para afectar al nivel de expresión de IL-2, MHC-I, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN- $\beta$  o cualquiera de las otras proteínas mencionadas anteriormente, incluyendo cada método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente identificado en el presente documento. Los complejos, incluyendo p50, son mediadores rápidos de las respuestas inmunitaria e inflamatoria agudas (Thanos, D. y Maniatis, T., Cell (1995) 80:529-532).

NF- $\kappa$ B también participa en la expresión de los genes de adhesión celular que codifican para E-selectina, P-selectina, ICAM y VCAM-1 (Collins, T., Lab. Invest. (1993) 68:499-508). Una realización de la solicitud es un método para inhibir la adhesión celular (por ejemplo, la adhesión celular mediada por E-selectina, P-selectina, ICAM o VCAM-1), que incluye poner en contacto una célula con (o administrar a un sujeto) una cantidad eficaz de un agente (o una composición farmacéutica) identificado en el presente documento.

La isquemia y la lesión por reperfusión dan como resultado hipoxia, un estado en el que hay una deficiencia del oxígeno que alcanza los tejidos del organismo. Este estado produce un aumento de la degradación de I $\kappa$ -B $\alpha$ , dando como resultado de ese modo la activación de NF- $\kappa$ B. Se ha demostrado que la gravedad de la lesión que da como resultado hipoxia puede reducirse con la administración de un inhibidor del proteasoma. Por lo tanto, ciertos aspectos de la descripción se refieren a un método de tratar un estado isquémico o lesión por reperfusión que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de un agente identificado en el presente documento. Ejemplos de tales estados o lesiones incluyen, pero sin limitarse a, síndrome coronario agudo (placas vulnerables), enfermedad oclusiva arterial (oclusiones cardiacas, cerebrales, arteriales periféricas y vasculares), aterosclerosis (esclerosis coronaria, coronariopatía), infartos, insuficiencia cardiaca, pancreatitis, hipertrofia miocárdica, estenosis y reestenosis.

NF- $\kappa$ B también se une específicamente al potenciador/promotor del VIH. Cuando se compara con la proteína Nef de mac239, la proteína Nef reguladora del VIH de pbj 14 difiere en dos aminoácidos en la región que controla la unión a la proteína cinasa. Se cree que la proteína cinasa señala la fosforilación de I $\kappa$ B, lo que desencadena la degradación de I $\kappa$ B a través de la ruta de la ubiquitina-proteasoma. Tras la degradación, NF- $\kappa$ B se libera en el núcleo, potenciándose así la transcripción del VIH (Cohen, J., Science, (1995) 267:960). Dos realizaciones de la solicitud son un método para inhibir o reducir la infección por VIH en un sujeto, y un método para disminuir el nivel de expresión del gen vírico, incluyendo cada método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente identificado en el presente documento.

Se considera que la producción en exceso de citocinas inducidas por lipopolisacárido (LPS) tales como TNF $\alpha$  es fundamental para los procesos asociados con el choque séptico. Además, generalmente se acepta que la primera etapa en la activación de las células por LPS es la unión del LPS a receptores específicos de membrana. Se han identificado las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del complejo de proteasoma 20S como proteínas que se unen a LPS, lo que sugiere que la transducción de señales inducida por LPS puede ser una importante diana terapéutica en el tratamiento o la prevención de la septicemia (Qureshi, N. *et al.*, J. Immun. (2003) 171: 1515-1525). Por lo tanto, en ciertas realizaciones, pueden usarse los agentes identificados en la solicitud para la inhibición del TNF $\alpha$  para prevenir y/o tratar el choque séptico.

La proteólisis intracelular genera pequeños péptidos para su presentación a los linfocitos T para inducir las respuestas inmunitarias mediadas por el CMH de clase 1. El sistema inmunitario selecciona células antígenicas que están infectadas por virus o que han experimentado transformación oncogénica. Una realización es un método para inhibir la presentación de antígenos en una célula, que incluye exponer la célula a un agente descrito en el presente documento. Un agente de la solicitud puede usarse para tratar estados relacionados con el sistema inmunitario, tales como alergia, asma, rechazo de órganos/tejidos (enfermedad de injerto contra huésped), y enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, pero sin limitarse a, lupus, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple y enfermedades inflamatorias del intestino (tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn). Por tanto, una realización adicional es un método para suprimir el sistema inmunitario de un sujeto (por ejemplo, inhibiendo el rechazo a un trasplante, alergias, enfermedades autoinmunitarias y asma), que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente identificado en el presente documento.

También se describe un método para alterar el repertorio de péptidos antigénicos producidos por el proteasoma u otros Ntn con actividad multicatalítica. Por ejemplo, si se inhibe selectivamente la actividad PGPH del proteasoma 20S, el proteasoma producirá un conjunto diferentes de péptidos antigénicos y se presentará en moléculas del CMH sobre las superficies de las células del que se produciría y se presentaría o bien sin ninguna inhibición enzimática, o bien con, por ejemplo, la inhibición selectiva de la actividad de tipo quimiotripsina del proteasoma.

Ciertos inhibidores del proteasoma bloquean tanto la degradación como el procesamiento de NF- $\kappa$ B ubiquitinado *in vitro* e *in vivo*. Los inhibidores del proteasoma también bloquean la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$  y la activación de NF- $\kappa$ B (Palombella, *et al.* Cell (1994) 78:773-785; y Traenckner, *et al.*, EMBO J. (1994) 13:5433-5441). Una realización de la solicitud es un método para inhibir la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , que incluye poner en contacto la célula con un agente identificado en el presente documento. Una realización adicional es un método para reducir el contenido celular de NF- $\kappa$ B en una célula, músculo, órgano o sujeto, que incluye poner en contacto la célula, músculo, órgano o sujeto con un agente identificado en el presente documento.



Otros factores de transcripción eucariotas que requieren procesamiento proteolítico incluyen el factor de transcripción general TFIIA, la proteína accesoria VP16 del virus del herpes simple (factor celular del huésped), la proteína factor 2 regulador del IFN inducible por virus, y la proteína 1 de unión al elemento regulador de esteroides unida a la membrana.

5 También se describen métodos para afectar a los ciclos celulares eucariotas dependientes de ciclina, que incluyen exponer una célula (*in vitro* o *in vivo*) a un agente identificado en el presente documento. Las ciclinas son proteínas implicadas en el control del ciclo celular. El proteasoma participa en la degradación de las ciclinas. Ejemplos de ciclinas incluyen ciclinas mitóticas, ciclinas G1 y ciclina B. La degradación de las ciclinas permite que una célula salga de una fase del ciclo celular (por ejemplo, mitosis) y entre en otra (por ejemplo, división). Se cree que todas las ciclinas están asociadas con la proteína cinasa p34<sup>cdc2</sup> o cinasas relacionadas. La señal de selección como diana de la proteólisis se ubica en los aminoácidos 42-RAALGNISEN-50 (caja de destrucción). Existen evidencias de que la ciclina se convierte en una forma vulnerable a una ubiquitina ligasa o de que una ligasa específica de ciclina se activa durante la mitosis (Ciechanover, A., Cell, (1994) 79:13-21). La inhibición del proteasoma inhibe la degradación de ciclina, y por lo tanto inhibe la proliferación celular, por ejemplo, en cánceres relacionados con ciclina (Kumatori *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:7071-7075). Una realización de la solicitud es un método para tratar una enfermedad proliferativa en un sujeto (por ejemplo, cáncer, psoriasis o reestenosis), que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente identificado en el presente documento. La solicitud también engloba un método para tratar la inflamación relacionada con ciclina en un sujeto, que incluye administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente identificado en el presente documento.

25 Ejemplos adicionales son métodos para afectar a la regulación dependiente de proteasoma de oncoproteínas y métodos de tratamiento o inhibición del crecimiento del cáncer, incluyendo cada método exponer una célula (*in vivo*, por ejemplo, en un sujeto, o *in vitro*) a un agente identificado en el presente documento. Las proteínas E6 derivadas de VPH-16 y VPH-18 estimulan la conjugación y la degradación dependiente de ATP y ubiquitina de p53 en lisados de reticulocitos en bruto. Se ha demostrado que el oncogén recesivo p53 se acumula a la temperatura no permisiva en una línea celular con una E1 termolábil mutada. Los niveles elevados de p53 pueden conducir a apoptosis. Ejemplos de proto-oncoproteínas degradadas por el sistema de ubiquitina incluyen c-Mos, c-Fos y c-Jun. Una realización es un método para tratar la apoptosis relacionada con p53, que incluye administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un agente identificado en el presente documento.

35 Los agentes de la presente solicitud son útiles para el tratamiento de una infección parasitaria, tal como infecciones producidas por parásitos protozoarios. Se considera que el proteasoma de estos parásitos está implicado principalmente en actividades de diferenciación y replicación celular (Paugam *et al.*, Trends Parasitol. 2003, 19(2): 55-59). Además, se ha demostrado que las especies de entamoeba pierden capacidad de enquistación cuando se exponen a inhibidores del proteasoma (Gonzales, *et al.*, Arch. Med. Res. 1997, 28, Spec NO: 139-140). En ciertas realizaciones, los agentes son útiles para el tratamiento de infecciones parasitarias en seres humanos producidas por un parásito protozoario seleccionado de *Plasmodium* spp. (incluyendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, que producen malaria), *Trypanosoma* spp. (incluyendo *T. cruzi*, que produce la enfermedad de Chagas, y *T. brucei* que produce la enfermedad del sueño africana), *Leishmania* spp. (incluyendo *L. amazonensis*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana*, etc.), *Pneumocystis carinii* (un protozoo que se sabe que produce neumonía en pacientes con SIDA y otros pacientes inmunosuprimidos), *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba invadens* y *Giardia lamblia*. En ciertas realizaciones, los agentes son útiles para el tratamiento de infecciones parasitarias en animales y ganado producidas por un parásito protozoario seleccionado de *Plasmodium hermani*, *Cryptosporidium* spp., *Echinococcus granulosus*, *Eimeria tenella*, *Sarcocystis neurona* y *Neurospora crassa*. Otros compuestos útiles como inhibidores del proteasoma en el tratamiento de enfermedades parasitarias se describen en el documento WO 98/10779, que se incorpora en el presente documento en su totalidad.

50 Los agentes inhibidores pueden inhibir la actividad del proteasoma de manera irreversible en un parásito. Se ha demostrado que una inhibición irreversible de este tipo induce la paralización de la actividad enzimática sin recuperación en glóbulos rojos y glóbulos blancos. En ciertas realizaciones, la larga semivida de las células sanguíneas puede proporcionar una protección prolongada con respecto a la terapia contra exposiciones recurrentes a parásitos. En ciertas realizaciones, la larga semivida de las células sanguíneas puede proporcionar una protección prolongada con respecto a la quimioprofilaxis contra la infección futura.

60 También se ha demostrado que los inhibidores que se unen al proteasoma 20S estimulan la formación ósea en cultivos de órganos óseos. Además, cuando tales inhibidores se han administrado sistémicamente a ratones, ciertos inhibidores del proteasoma aumentaron el volumen óseo y las tasas de formación ósea en más del 70% (Garrett, I. R. *et al.*, J. Clin. Invest. (2003) 111: 1771-1782), lo que sugiere por lo tanto que la maquinaria de ubiquitina-proteasoma regula la diferenciación de osteoblastos y la formación ósea. Por lo tanto, los agentes inhibidores identificados en el presente documento pueden

ser útiles en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas con la pérdida ósea, tal como la osteoporosis.

El tejido óseo es una fuente excelente de factores que tienen capacidad para estimular a las células óseas. Por tanto, los extractos de tejido óseo bovino contienen no sólo proteínas estructurales que son responsables de mantener la integridad estructural del hueso, sino también factores de crecimiento óseo biológicamente activos que pueden estimular la proliferación de las células óseas. Entre estos últimos factores hay una familia de proteínas descrita recientemente denominadas proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Todos estos factores de crecimiento tienen efectos sobre otros tipos de células, así como sobre las células óseas, incluyendo Hardy, M. H., *et al.*, *Trans Genet* (1992) 8:55-61 describen la evidencia de que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), se expresan de manera diferencial en los folículos pilosos durante el desarrollo. Harris, S. E., *et al.*, *J Bone Miner Res* (1994) 9:855-863 describen los efectos del TGF $\beta$  sobre la expresión de BMP-2 y otras sustancias en las células óseas. También se produce la expresión de BMP-2 en los folículos pilosos durante la maduración y tras el periodo de proliferación celular (Hardy, *et al.*, citado anteriormente). Por tanto, los agentes de la descripción también pueden ser útiles para la estimulación del crecimiento de los folículos pilosos.

Los agentes identificados en el presente documento también pueden ser útiles como agentes de diagnóstico (por ejemplo, en kits de diagnóstico o para su uso en laboratorios clínicos) para seleccionar proteínas (por ejemplo, enzimas, factores de transcripción) procesadas por Ntn hidrolasas, incluyendo el proteasoma. Los agentes también son útiles como reactivos de investigación para unirse específicamente a la subunidad X/MB1 o a la cadena  $\alpha$  e inhibir las actividades proteolíticas asociadas con ella. Por ejemplo, puede determinarse la actividad de (y los inhibidores específicos de) otras subunidades del proteasoma.

La mayoría de las proteínas celulares se someten a procesamiento proteolítico durante la maduración o la activación. Los inhibidores identificados en el presente documento pueden usarse para determinar si un proceso o rendimiento fisiológico, de desarrollo o celular está regulado por la actividad proteolítica. Un método de este tipo incluye obtener un microorganismo, una preparación celular intacta, o un extracto celular; exponer el microorganismo, la preparación celular o el extracto celular a un agente identificado en el presente documento; exponer el microorganismo, la preparación celular o el extracto celular expuestos al agente a una señal, y monitorizar el proceso o rendimiento.

Los agentes de la presente descripción útiles para el tratamiento terapéutico pueden administrarse solos, en una composición con un vehículo farmacéutico adecuado, o en combinación con otros agentes terapéuticos. Una cantidad eficaz de los agentes que van a administrarse puede determinarse caso por caso. Los factores que deben considerarse normalmente incluyen la edad, el peso corporal, la fase de la dolencia, otros estados patológicos, la duración del tratamiento, y la respuesta al tratamiento inicial. Normalmente, los agentes se preparan como inyectables, o bien como una suspensión o bien como una disolución líquida. Sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. El agente también puede formularse en un comprimido recubierto entérico o cápsula de gelatina según métodos conocidos en la técnica. Los agentes de la presente descripción pueden administrarse de cualquier modo que sea médicamente aceptable que puede depender de la identidad del agente y/o del estado patológico o de la lesión que se esté tratando. Las vías de administración posibles incluyen inyecciones, vías parenterales tales como intravasculares, intravenosas, intraepidurales u otras, así como orales, nasales, oftálmicas, rectales, tópicas o pulmonares, por ejemplo, mediante inhalación, nebulización o tratamiento con aerosoles. Los agentes también pueden aplicarse directamente a las superficies tisulares, por ejemplo, durante la cirugía. En la solicitud también se incluye específicamente la administración de liberación sostenida, mediante medios tales como inyecciones de absorción lenta o implantes erosionables. Ejemplos de enfermedades y estados que se someten a un tratamiento usando dispositivos médicos recubiertos con el fármaco que liberan los compuestos identificados usando los métodos de la presente solicitud incluyen aterosclerosis, síndrome coronario agudo, enfermedad de Alzheimer, cáncer, fiebre, inactividad muscular (atrofia), denervación, oclusiones vasculares, accidente cerebrovascular, infección por VIH, lesión nerviosa, insuficiencia renal asociada con acidosis e insuficiencia hepática. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.340.736.

#### Ejemplos

Ejemplo 1. Reactivos:

- 1) Tampón A (Tris 50 mM pH 7,4, NP-40 al 0,01%, DTT 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 7,5  $\mu$ M; ATP 7,5  $\mu$ M);
- 2) Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green preparado usando Ub4-pep-C14(29) acoplado covalentemente a Oregon Green 488-yodoacetamida y purificado sin el producto de partida;
- 3) LLVY-AMC, adquirido de Boston Biochem;
- 4) proteasoma 26S purificado de seres humanos y adquirido de BioMol;

- 5) placas de poliestireno de 384 pocillos adquiridas de Molecular Devices;
- 6) Ubistatina A (Compuesto 92 o C92);
- 7) isopeptidasa T de conejo adquirida de Boston Biochem

Ejemplo 2. Método:

- 5 Se mezclaron 5  $\mu$ l de compuesto [compuesto 30  $\mu$ M en tampón A + DMSO al 1%], 5  $\mu$ l de sustrato [Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green 30 nM y LLVY-AMC 15  $\mu$ M en tampón A] y 5  $\mu$ l de enzima [proteasoma 26S 1,5 nM] en placas de 384 pocillos y se incubaron a 28°C durante 75 minutos. Las reacciones se pararon con la adición de 5  $\mu$ l de inhibidor de 20S 4  $\mu$ M (PR-171) y EDTA 4 mM. Se determinó el procesamiento del sustrato de 20S LLVY-AMC para liberar AMC midiendo la fluorescencia de AMC [excitación a 340 nm; emisión a 465 nm]. Se determinó el procesamiento del sustrato de 19S Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green para liberar pep-C14(29)-Oregon Green midiendo la polarización de fluorescencia de Oregon Green [excitación a 485 nm; emisión a 535 nm].

Ejemplo 3. Diferentes categorías de moduladores o agentes de prueba:

- 15 Los moduladores de la actividad del proteasoma 20S afectan a la liberación de AMC de LLVY-AMC (segundo sustrato no ubiquitinado) y afectan a la actividad de tipo quimiotriptica del proteasoma 20S.

Los moduladores de la actividad del proteasoma 19S afectan a la liberación de pep-C14(29)-Oregon Green de Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green (primer sustrato ubiquitinado). Estos moduladores pueden actuar en una de tres formas:

- 20
- 1) Unión a ubiquitina evitando de ese modo que el sustrato Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green se procese por el proteasoma 19S.
  - 2) Inhibición de la actividad AAA ATPasa del proteasoma 19S.
  - 3) Inhibición de la actividad isopeptidasa de Rpn11 del proteasoma 19S.

25 Ejemplo 4. La unión de un agente de prueba a la ubiquitina puede determinarse mediante uno o varios de los siguientes ensayos:

- 30
- 1) La  $Cl_{50}$  para la acción de un agente de prueba en el procesamiento del sustrato Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green mediante la enzima proteasoma 26S es equivalente a la  $Cl_{50}$  para la acción de un agente de prueba en el procesamiento del sustrato Ub4-pep-C14 (29)-Oregon Green mediante una enzima desubiquitinante no relacionada (por ejemplo, isopeptidasa T). El agente de prueba está actuando sobre el sustrato Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green y evitando su procesamiento por las enzimas deubiquitinantes.

- 35
- 2) El agente de prueba actúa para multimerizar Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green evitando de ese modo la liberación de pep-C14(29)-Oregon Green. La multimerización puede detectarse mediante uno de varios métodos, por ejemplo, filtración en gel; dispersión de la luz; electroforesis en gel en condiciones nativas; polarización de fluorescencia.

3) La fluorescencia intrínseca de un agente de prueba o bien aumenta o bien disminuye con la unión a Ub4-pep-C14(29), donde el agente de prueba tiene una fluorescencia intrínseca.

- 40
- 4) Cuando se incuban 2,5  $\mu$ M de ubistatina A (C92) con 2,5  $\mu$ M de Ub4-pep-C14(29), la fluorescencia intrínseca de ubistatina A (C92) [excitación a 350 nm; emisión a 450 nm] aumenta varias veces. Un agente de prueba que se une a ubiquitina puede afectar a la unión de la ubistatina A (C92) a Ub4-pep-C14(29). Esto puede determinarse midiendo la fluorescencia intrínseca de ubistatina A (C92) [excitación a 350 nm; emisión a 450 nm] con Ub4-pep-C 14(29) en presencia o ausencia de un agente de prueba, que es un ensayo de competencia entre ubistatina A y el agente de prueba para su unión a la ubiquitina.

45 Ejemplo 5. La inhibición de la actividad AAA ATPasa del proteasoma 19S mediante un agente de prueba puede determinarse mediante uno o ambos de los siguientes ensayos:

- 50
- 1) La  $Cl_{50}$  para la acción de un agente de prueba en el procesamiento del sustrato Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green mediante la enzima proteasoma 26S en tampón A es inferior en comparación con la  $Cl_{50}$  para la acción de un agente de prueba en el procesamiento del sustrato Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green mediante la enzima proteasoma 26S en tampón A con ATP 750 mM y  $MgCl_2$  750 mM. La acción de un agente de prueba de este tipo sería competitiva con ATP y se ocuparían de ese modo los sitios de ATP en la AAA ATPasa.

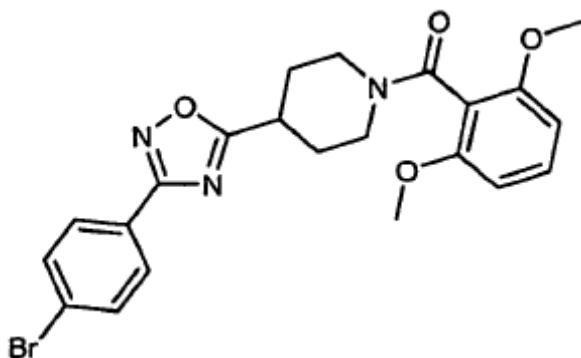
2) El agente de prueba afecta a la liberación de fosfato del ATP mediante el proteasoma 26S. Los niveles de fosfato pueden determinarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, un ensayo de unión a verde malaquita.

5 Ejemplo 6. Inhibición de la actividad de Rpn11 del proteasoma 19S mediante un agente de prueba:

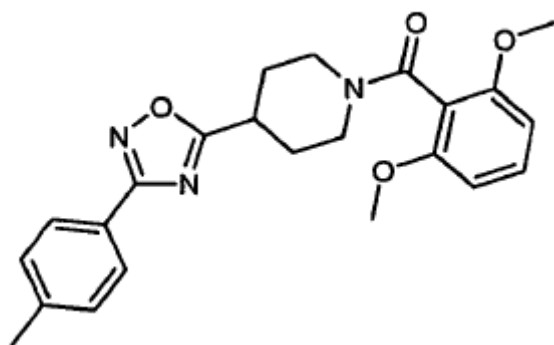
El ensayo puede diseñarse basándose en el hecho de que el agente de prueba afecta a la liberación de pep-C14(29)-Oregon Green de Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green pero no cae dentro de las categorías de los agentes inhibidores identificados mediante los ejemplos 4 y 5 tal como se describió anteriormente.

10 Ejemplo 7. Compuestos identificado como inhibidores:

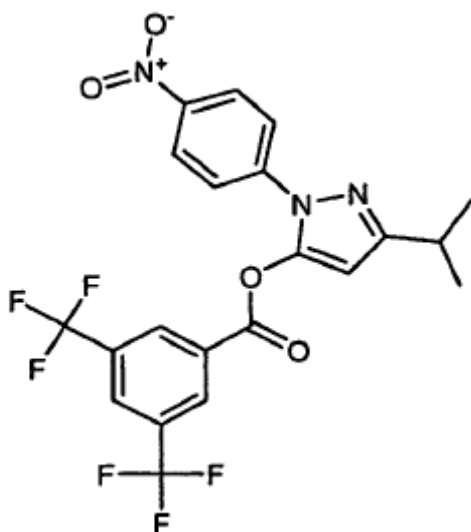
Usando el método descrito en el ejemplo 2, se identificaron los siguientes compuestos como inhibidores de la actividad del proteasoma 26S:



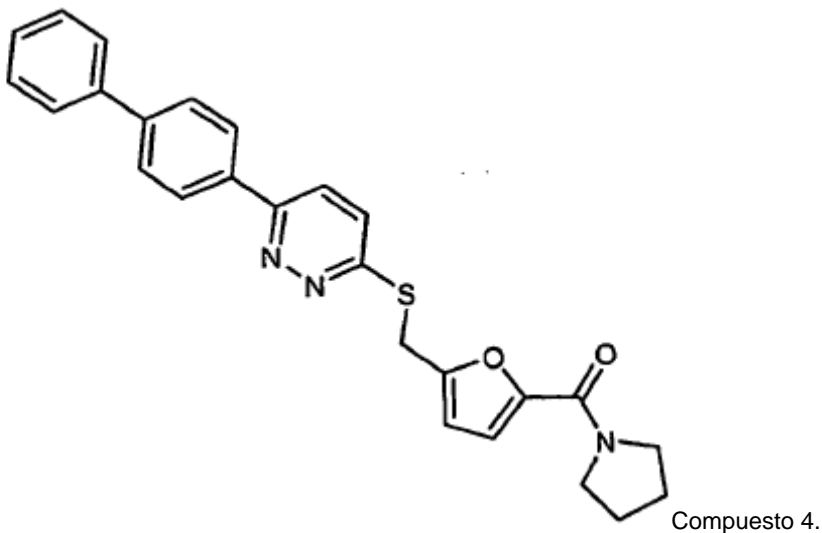
Compuesto 1;



Compuesto 2;



Compuesto 3; y



5 Las moléculas pueden clasificarse además basándose en qué sustrato se alteró, tal como se describe en el ejemplo 3. Los compuestos 1, 2 y 3 afectan a la actividad de tipo quimiopéptica del proteasoma 20S. El compuesto 4 evita que el sustrato Ub4-pep-C14(29)-Oregon Green se procese por el proteasoma 19S.

Debe reconocerse que estos compuestos pueden ser útiles para cualquier aplicación dada a conocer en el presente documento.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 70% a la SEQ ID NO: 1 y al menos un resto de ubiquitina que es al menos idéntico en un 90% a la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en el que el péptido es un sustrato para una metaloproteasa Rpn11 que comprende un motivo JAMM.
2. Péptido según la reivindicación 1, en el que el motivo JAMM es al menos idéntico en un 80% a la SEQ ID NO: 17.
3. Péptido según la reivindicación 1, en el que el motivo JAMM es al menos idéntico en un 80% a la SEQ ID NO: 18.
- 10 4. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la metaloproteasa es al menos idéntica en un 80% a la secuencia de la SEQ ID NO: 16.
5. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además al menos 3 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del péptido.
- 15 6. Péptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en el que al menos un aminoácido distinto de A se sustituye por A.
7. Péptido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en el que al menos un aminoácido distinto de A se sustituye por A.
- 20 8. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además uno o más restos de ubiquitina en el extremo N-terminal del péptido.
9. Péptido según la reivindicación 8, en el que el resto de ubiquitina consiste en dos o más repeticiones de una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 90% a la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 25 10. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el resto de ubiquitina comprende la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 modificada de manera que el aminoácido 75<sup>o</sup> es una A.
11. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el resto de ubiquitina comprende la secuencia de los primeros 76 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 modificada de manera que el aminoácido 76<sup>o</sup> es una A.
- 30 12. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un agente detectable unido al péptido.
13. Péptido según la reivindicación 12, en el que el agente detectable es un marcador fluorescente.
- 35 14. Péptido según la reivindicación 13, en el que el marcador fluorescente es un péptido fluorescente unido al extremo C-terminal del péptido mediante un enlace peptídico.
15. Péptido según la reivindicación 12, en el que el agente detectable es un marcador radiactivo.
16. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además una parte de diana N-terminal o parte de diana C-terminal que se une específicamente a un agente de selección.
- 40 17. Péptido según la reivindicación 16, en el que el agente de selección es un anticuerpo.
18. Péptido según la reivindicación 16, en el que el agente de selección es un ión metálico divalente.
19. Método para seleccionar un agente que modula la actividad del proteasoma de una metaloproteasa Rpn11, comprendiendo el método:
  - (a) proporcionar el péptido según la reivindicación 1; y
  - 45 (b) combinar el péptido con un agente de prueba en una mezcla de reacción adecuada para medir la actividad de la metaloproteasa Rpn11 en condiciones que permiten que se escinda el resto de ubiquitina, en el que la metaloproteasa Rpn11 comprende una secuencia de aminoácidos al menos idéntica en un 80% a la secuencia de la SEQ ID NO: 16 y un motivo JAMM al menos idéntico en un 80% a la secuencia de la SEQ ID NO: 17;
- 50

en el que un cambio en la tasa o el grado de escisión del resto de ubiquitina a partir del péptido en presencia del agente de prueba en comparación con la tasa o el grado de escisión del resto de ubiquitina a partir del péptido en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula la actividad del proteasoma.

- 5 20. Método según la reivindicación 19, en el que la Rpn11 está presente en una partícula reguladora 19S o un proteasoma 26S.
21. Método para seleccionar un agente que inhibe la actividad del proteasoma de una metaloproteasa Rpn11 que comprende un motivo JAMM, comprendiendo el método:
- 10 (a) proporcionar el péptido según la reivindicación 1 en una mezcla con ubistatina; y
- (b) comparar la fluorescencia intrínseca de ubistatina en presencia de un agente inhibidor de prueba en la mezcla con la fluorescencia intrínseca de ubistatina en ausencia del agente inhibidor de prueba en la mezcla,
- 15 en el que una diferencia en la fluorescencia intrínseca de ubistatina en presencia del agente inhibidor de prueba en comparación con en ausencia del agente inhibidor de prueba indica que el agente inhibidor de prueba inhibe la actividad del proteasoma.
22. Método para seleccionar un agente que inhibe la actividad del proteasoma de una metaloproteasa Rpn11 que comprende un motivo JAMM, comprendiendo el método:
- 20 (a) proporcionar el péptido según la reivindicación 1;
- (b) combinar el péptido de (a) con un agente inhibidor de prueba que tiene fluorescencia intrínseca en una mezcla; y
- (c) medir la fluorescencia de la fluorescencia intrínseca del agente inhibidor de prueba en la mezcla;
- 25 en el que un cambio en la fluorescencia medida del agente inhibidor de prueba en la mezcla con respecto a la fluorescencia intrínseca indica que el agente inhibidor de prueba inhibe la actividad del proteasoma.
23. Método para seleccionar un agente que modula la actividad del proteasoma de una metaloproteasa Rpn11 que comprende un motivo JAMM, comprendiendo el método:
- 30 (a) proporcionar el péptido según la reivindicación 1 en una mezcla de reacción; y
- (b) determinar si un agente de prueba produce un cambio en el tamaño y/o el peso molecular del péptido;
- en el que un agente de prueba que produce un cambio en el tamaño y/o el peso molecular del sustrato peptídico modula la actividad del proteasoma.
24. Método según la reivindicación 23, en el que el sustrato peptídico que comprende además un marcador fluorescente.
- 35 25. Método según la reivindicación 24, en el que el cambio en el tamaño y/o el peso molecular del sustrato peptídico se determina mediante polarización de fluorescencia.
26. Método según la reivindicación 23, en el que el cambio en el tamaño y/o el peso molecular del sustrato peptídico se determina mediante electroforesis en gel en condiciones nativas, cromatografía de filtración en gel, o dispersión de la luz.
- 40 27. Método para seleccionar un agente que modula la actividad de diversos componentes de un proteasoma 26S, que comprende:
- 45 (a) proporcionar un primer sustrato peptídico que comprende el péptido según la reivindicación 1 marcado con un primer marcador fluorescente, un segundo sustrato peptídico que comprende un péptido no ubiquitinado marcado con un segundo marcador fluorescente, en el que el primer y el segundo marcadores fluorescentes son detectables a diferentes longitudes de onda;
- (b) medir la fluorescencia a la longitud de onda del primer marcador detectable en presencia del proteasoma 26S y en presencia y ausencia de un agente de prueba; y
- 50 (c) medir la fluorescencia a la longitud de onda del segundo marcador detectable en presencia del proteasoma 26S y en presencia y ausencia de un agente de prueba; y

5

en el que un cambio en la fluorescencia del primer sustrato peptídico en presencia del agente de prueba en comparación con la fluorescencia en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula una actividad asociada con la partícula reguladora 19S, y un cambio en la fluorescencia del segundo sustrato peptídico en presencia del agente de prueba en comparación con la fluorescencia en ausencia del agente de prueba indica que el agente de prueba modula una peptidasa del núcleo 20S.

28. Método según la reivindicación 27, en el que el proteasoma 26S, el primer sustrato peptídico y el segundo sustrato peptídico se combinan en una única mezcla de reacción.



Figura 1

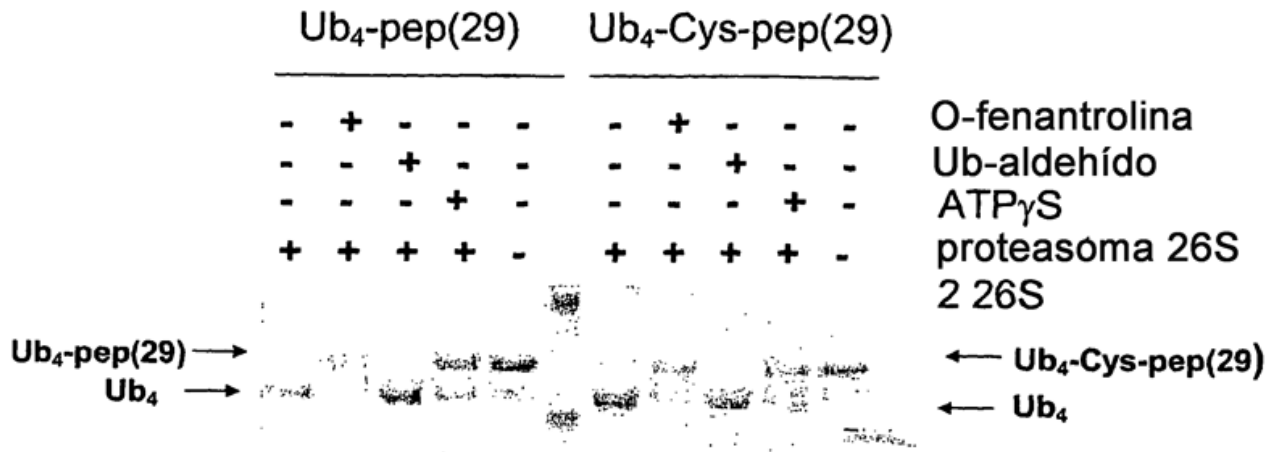


Figura 2

Ub<sub>4</sub>-C14-pep(14) es un sustrato para 26S

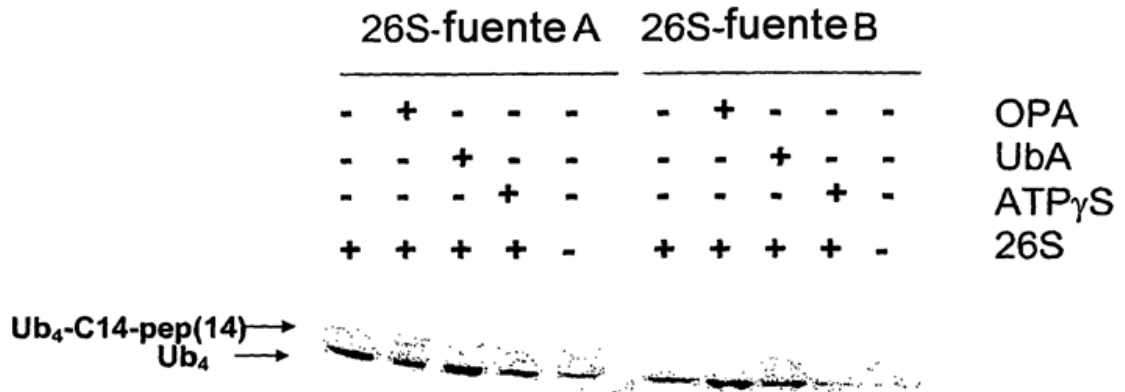


Figura 3. Proteólisis dependiente de Rpn11 de Ub4-pep(29)-fluoresceína

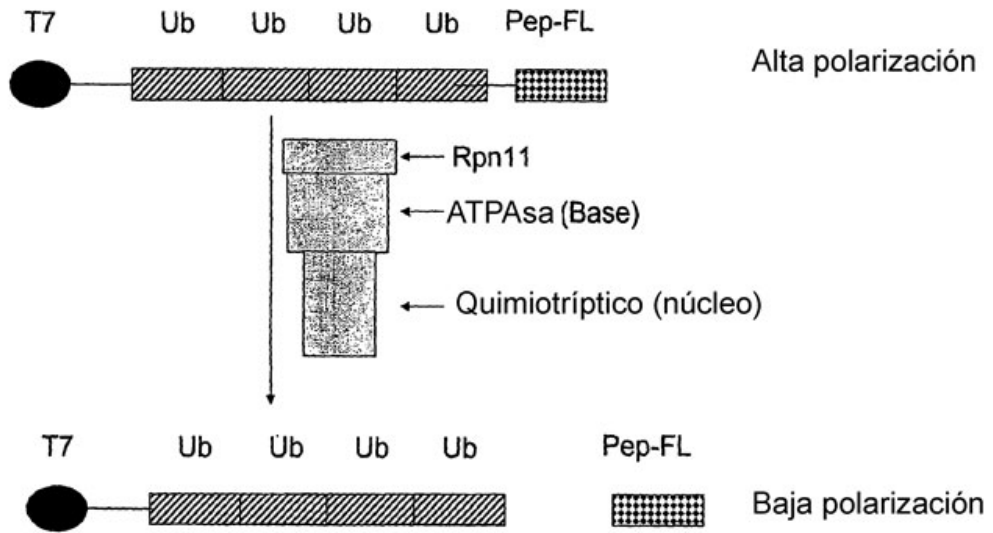
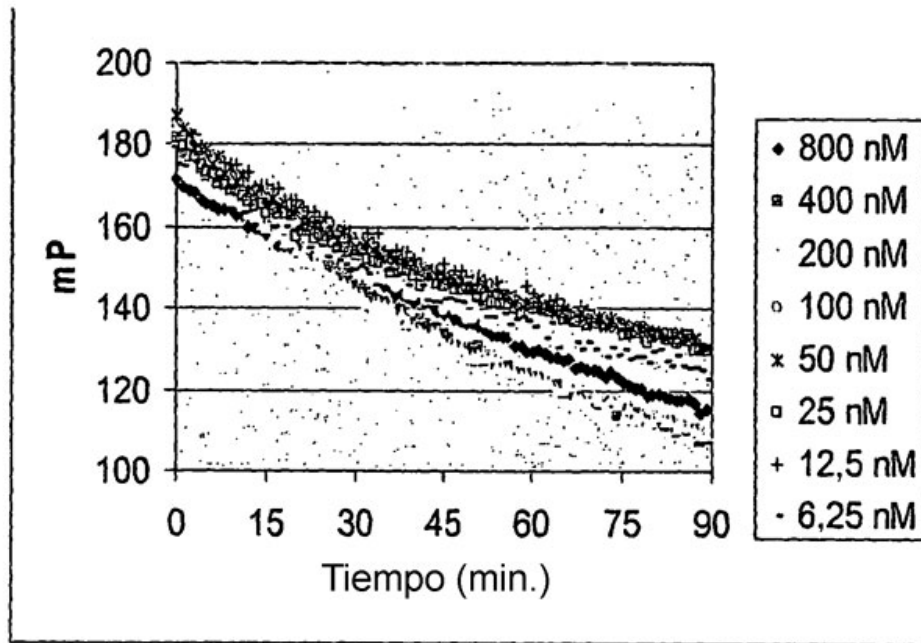


Figura 4

Valoración de Ub<sub>4</sub>-pep(29) acoplado a fluoresceína-5-maleimida



26S 10nM

Figura 5A: El ensayo de FP de HTP detecta la inhibición por O-fenatrolina de la actividad de RPN11

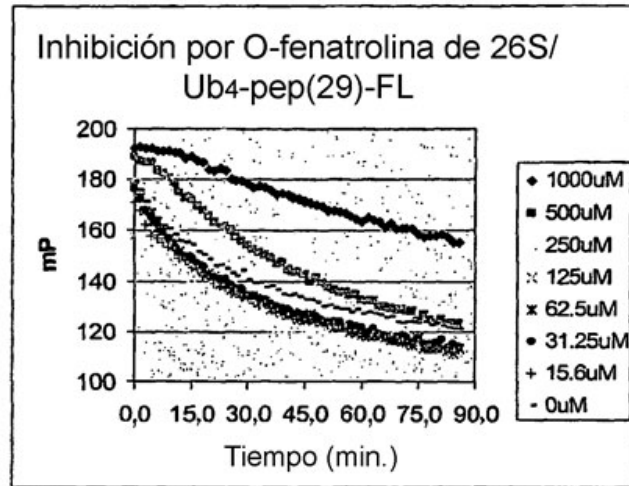


Figura 5B: La actividad de RPN11 no resulta afectada por la presencia de un inhibidor del proteasoma 20S en el ensayo de FP de HTP usando un sustrato Ub4-pep(20)-FL

