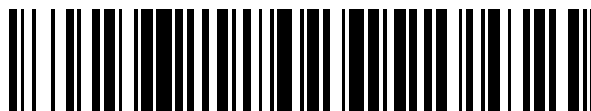


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 450**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2008 E 08291017 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2182073**

54 Título: **Proteasas específicas de ubiquitina responsables de la estabilidad de mcl 1 y su utilización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2014

73 Titular/es:

LES LABORATOIRES SERVIER (50.0%)
35, rue de Verdun
92284 Suresnes Cedex , FR y
HYBRIGENICS (50.0%)

72 Inventor/es:

GENESTE, OLIVIER;
HICKMAN, JOHN;
COLLAND, FRÉDÉRIC y
DAVIET, LAURENT

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 481 450 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

Proteasas específicas de ubiquitina responsables de la estabilidad de Mcl-1 y su utilización

La presente invención se refiere al uso de un polipéptido USP específico de Mcl-1 seleccionado de entre el grupo consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46 como una herramienta de screening (cribado) de un agente para el tratamiento del cáncer.

La leucemia de células mieloides 1 (*Myeloid cell leukemia-1* - Mcl-1), originalmente identificada en la diferenciación de células mieloides, pertenece a los miembros de la familia Bcl-2 antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, A1). La Mcl-1 actúa como una etapa precoz en la apoptosis inducida por diversos estímulos de muerte, en particular daños de ADN, y sirve como un factor de supervivencia principal. Más concretamente, la Mcl-1, que promueve la supervivencia celular interfiriendo en una cascada de eventos que conduce a la liberación de citocromo-c desde las mitocondrias, es una proteína de vida media corta. Por consiguiente, los procesos que regulan la Mcl-1 tienen una importancia crítica en situaciones patológicas tales como el cáncer.

La degradación de Mcl-1 se puede bloquear mediante inhibidores de proteosoma, lo que sugiere un papel de la vía ubiquitina-proteosoma en la apoptosis.

La degradación inducida por ubiquitina es un proceso regulado estrictamente en el que se marcan proteínas con fracciones de ubiquitina mediante una serie de reacciones enzimáticas que implican una enzima activadora de E1, una enzima conjugadora de E2 y una ubiquitina-ligasa E3 que determina la especificidad de sustrato. También se produce el proceso inverso y conduce a la eliminación de la cadena de ubiquitina, es decir a una desubiquitinación. Esta última reacción es llevada a cabo, en parte, por enzimas denominadas proteasas específicas de ubiquitina (*ubiquitin specific proteases* - USP) y resulta en la restauración del sustrato a su estado normal.

Las proteasas específicas de ubiquitina (USP) pertenecen a la gran familia de las enzimas desubiquitinantes (*deubiquitinating enzymes* - DUB). El genoma humano codifica aproximadamente 95 enzimas desubiquitinantes putativas (DUB) que pertenecen a la superfamilia de las proteasas. Estas enzimas se dividen en 5 subfamilias, entre las cuales las subclases más conocidas son las USP (proteasas específicas de ubiquitina) y UCH (*Ubiquitin C-terminal hydrolases* - hidrolasas C-terminales de ubiquitina). Las 60 proteínas USP humanas son cisteína proteasas y su dominio catalítico contiene una 'caja cisteína' y una 'caja histidina'. La función principal de las USP es eliminar la ubiquitina de sustratos proteínicos específicos.

El éxito clínico obtenido con inhibidores de proteosoma refuerza la idea de que la modulación de otros pasos en las vías de ubiquitina-proteosoma, como E3s o USP, puede tener un éxito terapéutico de mayor especificidad y eficacia.

En una publicación también se ha notificado la identificación de una E3 ligasa denominada Mule/ARF-BP1/UreB1, que es necesaria y suficiente para la poliubiquitinación de Mcl-1. Es interesante que la reducción de la expresión de Mule resulte en la estabilización y acumulación de Mcl-1, haciendo a las células más resistentes a la destrucción por agentes genotóxicos.

En el documento de patente WO 03/100000 se describe el uso de USP13 como herramienta de cribado de un agente para el tratamiento del cáncer, así como el uso de células transformadas con constructos de expresión de USP13 para el mismo fin.

Los resultados dados a conocer en la presente invención indican que existen USP específicas de Mcl-1 y que, en consecuencia, éstas actuarían sobre la estabilización de Mcl-1 celular controlando la apoptosis. La inhibición de estas USP conduciría a un aumento de la degradación de Mcl-1 por el proteosoma que promueve el comienzo de la apoptosis. Esta observación ofrece un nuevo método para fijar como objetivo Mcl-1 mediante la inhibición de la proteína USP reguladora de Mcl-1 con compuestos de moléculas pequeñas.

Un primer objeto de la invención es el uso de un polipéptido USP específico de Mcl-1 seleccionado de entre el grupo consistente en

- a) un polipéptido consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46;
- b) un fragmento funcional de un polipéptido USP26, USP38, USP42 o USP46 que presenta una actividad de desubiquitinación;
- c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de un 85% o más con un polipéptido consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46 y que tiene una actividad de desubiquitinación;

como herramienta de cribado de un agente para el tratamiento del cáncer.

Las USP reguladoras de Mcl-1 dadas a conocer en la invención son USP26 (GI: 13994267), USP38 (GI: 31559774), USP42 (GI: 79750943), USP46 (GI: 31377708) y puede escindir enlaces peptídicos que unen ubiquitina como parte

de una proteína de fusión precursora, liberando fracciones de ubiquitina libre, o escindir enlaces que conjugan ubiquitina (postraducción) con proteínas.

En una realización particular, la invención proporciona el uso de USP46, un fragmento funcional o una secuencia esencialmente homóloga del mismo, como herramienta de cribado de un agente para el tratamiento del cáncer.

5 La USP46 es una pequeña proteína de 366 aa de longitud, de función desconocida, que contiene el dominio UCH, un dominio catalítico que interviene en las funciones de desubiquitinación. Se ha comprobado que la USP46 está muy extendida en tejidos humanos y que es activa *in vitro*. Recientemente se ha descrito un amplímero en el cromosoma 4q12, que contiene USP46 como gen flanqueado, en glioblastomas. Se ha detectado una amplificación del gen USP46 en diversos glioblastomas y cultivos celulares de glioblastomas. Los análisis de las secuencias de
10 USP46 han identificado un parálogo humano, USP12=UBH1 (NP_872294), que presenta un 88% de identidad en la secuencia de proteínas y un 76% de identidad en la secuencia de nucleótidos. Además, el dominio catalítico de USP46 y USP12 presenta un 100% de identidad en la secuencia de proteínas. Ensayos bioquímicos han revelado que la UBH1 de ratón, con un 98,3% de identidad de aminoácidos con la UBH1 humana, presenta actividad enzimática de desubiquitinación.

15 Un "fragmento funcional" conserva una o más de las actividades biológicas de la proteína, como la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos con ubiquitina, o comprende un dominio o motivo, por ejemplo un sitio catalítico, una signatura de USP, dominio que incluye los sitios de reconocimiento de ubiquitina de cisteína o histidina, sitios de unión de ubiquitina, o sitios importantes para la realización de las otras funciones de la proteasa.

20 Los conceptos "homología" y "esencialmente homólogo", cuando se utilizan aquí en relación con una secuencia, significan que una secuencia, al compararla con su secuencia de referencia correspondiente, tiene esencialmente la misma estructura y función. Cuando una posición en la secuencia de referencia está ocupada por el mismo aminoácido, las moléculas son homólogas en dicha posición (es decir, existe identidad en esta posición). Ventajosamente, el porcentaje de homología entre la secuencia esencialmente homóloga y la secuencia de referencia es de al menos un 85%, en especial de al menos un 88%, preferentemente al menos un 95% y de forma
25 especialmente preferente al menos un 99%.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de una célula que transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificador de un polipéptido consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46, un fragmento funcional o una secuencia esencialmente homóloga del mismo que presenta una actividad de desubiquitinación. La célula expresa el polipéptido como una herramienta de cribado de un agente para el
30 tratamiento del cáncer.

Tal como se utiliza aquí, la expresión "herramienta de cribado" significa una herramienta utilizada para el screening o cribado, más particularmente un polipéptido o una célula que expresa un polipéptido utilizado para cribado.

35 Tal como se utiliza aquí, la expresión "agente para el tratamiento del cáncer" no sólo incluye un fármaco para curar a un paciente de cáncer, sino también un fármaco para prevenir el progreso del cáncer. La expresión "tratamiento del cáncer" se refiere al tratamiento profiláctico o preferentemente terapéutico (incluyendo, de forma no exclusiva, paliativo, curativo, mitigador de síntomas, reductor de síntomas, supresor de la enfermedad o los síntomas, retrasador de la progresión) del cáncer.

40 El término "cáncer" se refiere preferentemente a diversas enfermedades proliferativas, incluyendo las mencionadas más abajo, pero no de forma exclusiva, tumores sólidos (incluyendo tipos benignos o especialmente malignos) como sarcoma (por ejemplo sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi, sarcoma de partes blandas tales como Dermatofibrosarcoma protuberans), tumores de estroma gastrointestinal (*gastrointestinal stromal tumors* - GIST), seminoma, carcinoides, tumores de mastocitos, carcinomas pulmonares como carcinoma pulmonar de células pequeñas o grandes, carcinomas bronquiales como carcinoma bronquial de células pequeñas, seminomas, disgerminomas, neoplasias intraepiteliales testiculares, melanomas, carcinomas de mama, neuroblastomas,
45 carcinoma tiroideo papilar/folicular, linfomas malignos, linfoma no Hodgkin, neoplasia endocrina múltiple de tipo 2 (*multiple endocrine neoplasia type 2* - MEN 2), feocromocitoma, carcinoma tiroideo, por ejemplo carcinoma tiroideo medular, hiperplasia/adenoma paratiroides, carcinoma de mama, cáncer de colon, adenoma colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma de próstata, glioblastoma, tumores cerebrales, carcinoma de próstata (incluyendo también adenocarcinomas y metástasis óseas), gliomas malignos (astrocitomas/ glioblastomas anaplásicos), cáncer de
50 páncreas, mesotelioma pleural maligno, hemangioblastoma, hemangioma, carcinoma de riñón, de hígado, de glándula suprarrenal, vejiga, estómago (en especial tumores gástricos), recto, vagina, cérvix, endometrio, mieloma múltiple, tumores de cabeza y cuello, por ejemplo carcinoma escamoso de cabeza y cuello, incluyendo neoplasias, en especial de carácter epitelial, por ejemplo en caso de carcinoma de mama, nefroesclerosis maligna; o adicionalmente de otras hiperplasias o enfermedades proliferativas.

55 Tal como se utiliza aquí, la expresión "célula que está transformada" se refiere a una célula procariota o eucariota que contiene ADN heterólogo que ha sido introducido en la célula a través de cualquier medio, por ejemplo electroporación, precipitación de fosfato de calcio, microinyección, transformación, infección viral y similares.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico en la que se puede insertar ácido nucleico heterólogo, que después puede ser introducida en una célula huésped apropiada. Los vectores tienen preferentemente uno o más orígenes de replicación y uno o más sitios en los que se puede insertar el ADN recombinante. Los vectores habituales incluyen plásmidos, genomas virales y cromosomas artificiales.

5 Un tercer aspecto de la invención incluye un método para cribar un agente para el tratamiento del cáncer, en el que una célula que está transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificador de un polipéptido consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46, un fragmento funcional o una secuencia esencialmente homóloga o una membrana celular del mismo, se pone en contacto con un compuesto a ensayar, y se analiza si se ha estabilizado o no la Mcl-1 y se selecciona un agente desestabilizador de Mcl-1.

10 En otro aspecto, el agente para el tratamiento del cáncer consiste en un inhibidor de la actividad catalítica de USP de la invención. Preferentemente, en el método de cribado de la presente invención, el agente para el tratamiento del cáncer es un inhibidor de un polipéptido consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46, un fragmento funcional o una secuencia esencialmente homóloga del mismo.

15 Tal como se utilizan aquí, los términos "estabilización" y "desestabilización" se refieren al ensayo de vida media de Mcl-1.

20 En otro aspecto preferente, se proporciona un método para cribar un agente para el tratamiento del cáncer en el que una célula que está transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificador de un polipéptido consistente en USP26, USP38, USP42 o USP46, un fragmento funcional o una secuencia esencialmente homóloga o una membrana celular del mismo, se pone en contacto con un compuesto a ensayar, y se analiza la tasa de ubiquitinación de Mcl-1.

Preferentemente, el agente para el tratamiento del cáncer es un inhibidor de USP que induce el aumento de sustrato ubiquitinado, es decir Mcl-1 ubiquitinada.

Los sistemas basados en células en ensayos de cribado de medicamentos pueden ser nativos o implicar células huésped recombinantes que expresan las proteasas específicas de ubiquitina.

25 El agente identificado modulador de proteasas específicas de ubiquitina puede aumentar o disminuir la afinidad por los sustratos ubiquitinados, aumentar o disminuir la tasa de unión a una molécula de unión conocida a USP, competir o desplazar una molécula de unión conocida con la ubiquitina proteasa.

FIGURAS

30 Figura 1 (Figuras 1.1, 1.2, 1.3): Representación esquemática de modulación de Mcl-1 después de silenciamiento de USP en t = 0, 30 min o 1 h de tratamiento con cicloheximida en células HCT116. El aumento y la disminución de Mcl-1 se presentan en azul y verde, respectivamente, y la toxicidad de ARNsi se presenta en gris. La falta de color corresponde a la falta de cualquier efecto. Las USP seleccionadas para los experimentos de confirmación están destacadas en verde (USP5, USP13, USP19, USP21, USP22, USP26, USP28, USP38, USP42 y USP46). Los ARNsi designados para dirigirse a pares de USP están indicados a la derecha de la tabla.

35 Figura 2: Cribado de USP13 en células HCT116. *Western blot* (anti-Mcl-1) que revela la expresión de Mcl-1 endógena en presencia de diversos ARNsi dirigidos a Luc (luciferasa, control negativo), Mcl-1, (control positivo) o USP13 (ARNsi 13v1, ARNsi 13v2, ARNsi 13v3) en células HCT116. En B también se presenta una exposición más débil. Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-stat3. El curso cronológico corresponde al tiempo durante el cual las células fueron expuestas al inhibidor de síntesis de proteína (cicloheximida) antes del análisis.

40 Figura 3: Cribado de USP26 en células HCT116. *Western blot* (anti-Mcl-1) que revela la expresión de Mcl-1 endógena en presencia de diversos ARNsi dirigidos a Luc (luciferasa, control negativo), Mcl-1, (control positivo) o USP26 (ARNsi 26v1, ARNsi 26v2, ARNsi 26v3) en células HCT116. Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-stat3. El curso cronológico corresponde al tiempo durante el cual las células fueron expuestas al inhibidor de síntesis de proteína (cicloheximida) antes del análisis.

45 Figura 4: Cribado de USP38 en células HCT116. *Western blot* (anti-Mcl-1) que revela la expresión de Mcl-1 endógena en presencia de diversos ARNsi dirigidos a Luc (luciferasa, control negativo), Mcl-1, (control positivo) o USP38 (ARNsi 38v1, ARNsi 38v2, ARNsi 38v3) en células HCT116. Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-stat3. El curso cronológico corresponde al tiempo durante el cual las células fueron expuestas al inhibidor de síntesis de proteína (cicloheximida) antes del análisis.

50 Figura 5: Cribado de USP42 en células HCT116. *Western blot* (anti-Mcl-1) que revela la expresión de Mcl-1 endógena en presencia de diversos ARNsi dirigidos a Luc (luciferasa, control negativo), Mcl-1, (control positivo) o USP42 (ARNsi 42v1, ARNsi 42v2, ARNsi 42v3) en células HCT116. Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-

stat3. El curso cronológico corresponde al tiempo durante el cual las células fueron expuestas al inhibidor de síntesis de proteína (cicloheximida) antes del análisis.

Figura 6: Cribado de USP46 en células HCT116. *Western blot* (anti-Mcl-1) que revela la expresión de Mcl-1 endógena en presencia de diversos ARNsi dirigidos a Luc (luciferasa, control negativo), Mcl-1, (control positivo) o USP46 (ARNsi 46v1, ARNsi 46v2, ARNsi 46v3) en células HCT116. Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-stat3. El curso cronológico corresponde al tiempo durante el que las células fueron expuestas al inhibidor de síntesis de proteína (cicloheximida) antes del análisis.

Figura 7: Estudio de correlación fenotipo/silenciamiento en células PC3. El nivel endógeno de Mcl-1 se determinó en células PC3 en presencia de varios ARNsi dirigidos a luciferasa, Mcl-1 o USP46 (A). Como control de carga se utilizó anticuerpo antiactina. Los niveles de ARNm de Mcl-1 (B) y USP46 (C) se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa después de transfección de PC3 con ARNsi dirigido a luciferasa (Luc, control negativo), Mcl-1 o USP46. Los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por cuadruplicado.

Figura 8: Estudio de correlación fenotipo/silenciamiento en células H196. El nivel endógeno de Mcl-1 se determinó en células H196 en presencia de varios ARNsi dirigidos a luciferasa, Mcl-1 o USP46 (A). Como control de carga se utilizó anticuerpo antiactina. Los niveles de ARNm de Mcl-1 (B) y USP46 (C) se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa después de transfección de H196 con ARNsi dirigido a luciferasa (Luc, control negativo), Mcl-1 o USP46. Los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por cuadruplicado.

Figura 9: Estudio de correlación fenotipo/silenciamiento en células H1703. El nivel endógeno de Mcl-1 se determinó en células H1703 en presencia de varios ARNsi dirigidos a luciferasa, Mcl-1 o USP46 (A). Como control de carga se utilizó anticuerpo antiactina. Los niveles de ARNm de Mcl-1 (B) y USP46 (C) se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa después de transfección de H1703 con ARNsi dirigido a luciferasa (Luc, control negativo), Mcl-1 o USP46. Los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por cuadruplicado.

Figura 10: Estudio de correlación fenotipo/silenciamiento en células HEK293. El nivel endógeno de Mcl-1 se determinó en células HEK293 en presencia de varios ARNsi dirigidos a luciferasa, Mcl-1 o USP46 (A). Como control de carga se utilizó anticuerpo antiactina. Los niveles de ARNm de Mcl-1 (B) y USP46 (C) se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa después de transfección de HEK293 con ARNsi dirigido a luciferasa (Luc, control negativo), Mcl-1 o USP46. Los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por cuadruplicado.

Figura 11: Estudio de correlación fenotipo/silenciamiento en células HeLa. El nivel endógeno de Mcl-1 se determinó en células HeLa en presencia de varios ARNsi dirigidos a luciferasa, Mcl-1 o USP46 (A). Como control de carga se utilizó anticuerpo antiactina. Los niveles de ARNm de Mcl-1 (B) y USP46 (C) se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa después de transfección de HeLa con ARNsi dirigido a luciferasa (Luc, control negativo), Mcl-1 o USP46. Los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por cuadruplicado.

Figura 12: Efecto del silenciamiento de USP46 en la sensibilización de células HeLa a ABT-737. El ensayo de caspasa 3e se utilizó para controlar la actividad de caspasa 3 en células HeLa transfectadas con ARNsi dirigido a luciferasa (luc, control negativo), mcl-1 o USP-46 y tratadas con DM-SO (control negativo) o ABT-737 (3-10NM) durante 6 horas. Se analizaron lisados celulares en cuanto a la actividad de caspasa (A). Los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por triplicado y son representativos de dos experimentos independientes. También se determinaron el nivel endógeno de Mcl-1 y PARP escindido en presencia de ARNsi dirigido a luciferasa, Mcl-1 o USP46 (B). Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-stat3.

Figura 13: Citometría de flujo de células cancerosas de HeLa transfectadas con ARNsi de banco (pool) luc, mcl-1, USP46v1, USP46v4 o USP46. El ciclo celular se determinó 72 horas después de transfección con ARNsi y 18 horas después de tratamiento con ABT-737 (3 μ M).

Figura 14: Transición de subG1 inducida por ABT-737 en células HeLa determinada 72 horas después de transfección con ARNsi y 24 horas después de tratamiento con ABT-737. El porcentaje de células en subG1 (<2N) son valores medios \pm DE de valores por duplicado (A). También se determinó el nivel endógeno de Mcl-1 en presencia de ARNsi dirigido a luciferasa, Mcl-1 o USP46. Como control de carga se utilizó anticuerpo anti-Stat3 (B).

Figura 15: Actividad de desubiquitinación de proteína GST-USP46 de tipo salvaje y mutante catalítica (C44A) purificada a partir de E.coli. La actividad enzimática de la proteína USP46 de tipo salvaje y mutante catalítica se evaluó *in vitro* en diversas concentraciones de enzima y con un tiempo de incubación fijo (90 minutos) utilizando UbAMC (400 nM) como sustrato (A). Ensayos cinéticos de la actividad enzimática de la proteína USP46 de tipo salvaje y mutante catalítica en una concentración fija de enzima (400 nM) y sustrato (800 nM). Todos los resultados se muestran como valores medios \pm DE de valores por triplicado.

EJEMPLOS

1. Materiales y métodos

1.1 Diseño y síntesis de ARNsi

Se adquirieron ARNsi 19-meros sintetizados químicamente utilizando fosforamiditas de Proligo. Los ARNsi se diseñaron de acuerdo con la descripción de Tuschl y col. (Elbashir y col. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8) con una atención particular a características termodinámicas (Khvorova y col. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-16). Internamente se desarrolló una herramienta destinada a estudiar la especificidad de ARNsi. En pocas palabras, se pidieron bases de datos de NCBI NR y EST con cada ARNsi y gen diana mediante el algoritmo BLAST. Los ARNsi que correspondían exactamente (19/19) o parcialmente (18/19 nucleótidos) con una entrada irrelevante de NR o EST se descartaron.

10 1.2 Cultivo celular y transfección

Se mantuvieron células HCT116 de carcinoma de colon humano en medio de McCoy 5A que contenía 10% FBS. El medio de cultivo se complementó con 100 unidades/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina, y las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% CO₂.

15 Para el cribado, las cantidades indicadas de ARNsi (40 pmol, 72 nM final) se sometieron a formación de complejos con 2 µl de Oligofectamine (Invitrogen) en Opti-MEM (Invitrogen) y se añadieron a placas de 24 pocillos antes de la siembra celular. A continuación se dispusieron en placas 150.000 células HCT116. Cinco horas después de la transfección, el Opti-MEM se sustituyó por un medio apropiado. Después de 72 horas desde la transfección y antes de la recolección, las células se trataron o no con cicloheximida (30 µg/ml) durante 30 minutos o 1 hora o se trataron con MG132 (30 µM) durante 90 minutos.

20 1.3 Preparación de lisados celulares y análisis *Western Blot*

Las células se lavaron una vez en PBS enfriado y se recolectaron por tripsinación. Las células flotantes y tripsinizadas se reunieron y recogieron por centrifugación. Las pellas celulares se resuspendieron en tampón de lisis (2% SDS que contenía 1X cóctel inhibidor de proteasa, Sigma), se dispusieron a 100°C durante 10 minutos y se sometieron a sonicación durante 5 segundos.

25 Las proteínas se cuantificaron utilizando ácido bicinonínico (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados se redujeron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (10%) (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo policlonal de conejo Mcl-1 (sc-819; SantaCruz), anticuerpo policlonal de conejo Stat3 (9132; Cell Signaling), anticuerpo monoclonal de ratón de actina (A4700; Sigma), o anticuerpo monoclonal de ratón GAPDH (Ab8245; AbCam). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anticonejo conjugados con HRP (7074; Cell Signaling) anticuerpos antirratón conjugados con HRP (115-035-003; Jackson ImmunoResearch). La señal se detectó utilizando reactivo ECL (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.4 Cultivo celular, transfección y tratamiento farmacológico

35 Todas las líneas celulares utilizadas se mantuvieron en su medio respectivo. Todos los medios de cultivo se complementaron con 100 unidades/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomina, y las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO₂. Para la transfección con ARNsi, los ARNsi (40 pmol, 72 nM final) se sometieron a formación de complejos con 2 µl de Oligofectamine (Invitrogen) en Opti-MEM (Invitrogen) y se añadieron a placas de 24 pocillos antes de la siembra de células. En todas las situaciones, el Opti-MEM se sustituyó por un medio apropiado 5 horas después de la transfección. Cuando se utilizó Hiperfect (Qiagen), los ARNsi (40 pmol, 72 nM final) se sometieron a formación de complejos con 3 ml de Hiperfect (Qiagen) en Opti-MEM (Invitrogen) y se añadieron a placas de 24 pocillos después de la siembra celular. Después de 48 horas o 72 horas desde la transfección y antes de la recolección, las células se trataron o no con ABT737 en los momentos indicados y con la concentración indicada.

45 Las células difíciles de transfectar, como las células H1703, se transfectaron utilizando el procedimiento AMAXA. Las células se suspendieron primero en una cubeta especial en presencia del ARNsi de interés. Entonces se suministró un impulso eléctrico, definido de acuerdo con la línea celular utilizada, en un dispositivo Nucleofector. A continuación, las células nucleofectadas se dispusieron en placas de 24 o 6 pocillos de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trataron con ABT737 tal como se describe más arriba.

1.5 Ensayo de desubiquitinación

50 La actividad enzimática de desubiquitinación se controló en un ensayo fluorométrico, utilizando ubiquitina-AMC o Ub-AMC (ubiquitina-7-amido-4-metilcumarina, Boston Biochem, U-550) como sustrato, tal como se describe más arriba (Dang y col. (1998) Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes. *Biochemistry*. 37(7):1868-79). El AMC liberado desde el extremo C de ubiquitina presenta una fluorescencia aumentada, que se puede controlar con un lector de fluorescencia. La enzima

y el sustrato se prepararon recientes en un tampón de reacción USP46 (50 mM Tris-HCl [pH 8,4], 0,5 mM EDTA, 0,05 mg/ml BSA, 5 mM DTT) para cada serie. La mezcla de reacción entre USP46 y Ub-AMC se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y la reacción se interrumpió añadiendo 10 µl de ácido acético (concentración final 250 mM). La intensidad de emisión de fluorescencia se midió en una máquina PHERAstar (BMG Labtech),
5 utilizando un juego de filtros de cumarina ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$).

2. Resultados

2.1 Cribado de USP en células HTC116

Para identificar las proteasas específicas de ubiquitina que intervienen en la desubiquitinación de Mcl-1 y por consiguiente en la estabilización de Mcl-1, toda la familia USP se cribó mediante interferencia de ARN en cuanto a la vida media de Mcl-1 en células cancerosas de HCT116. Entre las 60 proteínas USP cribadas se identificaron 10 USP (USP5, USP13, USP19, USP21, USP22, USP26, USP28, USP38, USP42 y USP46) con el fenotipo previsto, es decir, una disminución esencial de Mcl-1 (presentando al menos 2 de cada 3 ARNsi una disminución de Mcl-1 de más de un 50% en un momento dado). La Figura 1 muestra la representación esquemática de la modulación de Mcl-1 después del silenciamiento de USP y tratamiento con cicloheximida.
10

15 2.2 Experimentos de confirmación sobre USP seleccionadas

Para confirmar los resultados obtenidos en el cribado primario, se llevó a cabo un experimento independiente con las 10 USP seleccionadas. Los datos se confirmaron en 5 USP (USP13, USP26, USP38, USP42 y USP46) de las 10 USP de los resultados del cribado primario. Las Figuras 2 a 6 muestran los resultados *western blot* de los experimentos de confirmación. Estos resultados revelaron que se observó una disminución significativa de Mcl-1 endógeno después del tratamiento con cicloheximida (compárese ARNsi de Luc en diferente momentos) y después del silenciamiento de Mcl-1. Resulta interesante que, entre estas proteínas, tres USP diferentes mostraron tener un efecto significativo en el nivel permanente de Mcl-a con 2 de 3 ARNsi: USP13, USP42 y USP46.
20

Por consiguiente, a partir del cribado de las 60 USP humanas mediante interferencia de ARN en cuanto a la vida media de Mcl-1 en células HCT116 se ha confirmado la intervención de 5 USP (USP13, USP26, USP38, USP42 y USP46) en la estabilización de Mcl-1. Todas estas proteínas contienen aminoácidos esenciales para la actividad catalítica, lo que sugiere una actividad funcional de desubiquitinación. De hecho, USP42, USP46 y USP38 han demostrado previamente ser activas *in vitro*.
25

2.3 Efecto del silenciamiento de USP46 en ARN de Mcl-1 y niveles de proteína en células PC3, H196, H1703, HEK293 y HeLa

Se controló el efecto de ARNsi de Mcl-1 en el nivel de proteína Mcl-1 endógena en células PC3, H196, H1703, HEK293 y HeLa, mostrando una fuerte reducción del nivel de Mcl-1, lo que indica una excelente eficiencia de transfección en estas líneas celulares (Figuras 7 a 11, respectivamente). En este contexto, el nivel de proteína Mcl-1 endógena se evaluó después de silenciamiento de USP46. Se observó una disminución significativa del nivel de proteína Mcl-1 con ARNsi de USP46 independientes en células PC3, H196, H1703, HEK293 y HeLa (USP46v3, USP46v4 y banco de ARNsi de USP46 activos) (Figuras 7 a 11, respectivamente).
30
35

A continuación se determinaron los niveles de ARNm de Mcl-1 endógeno mediante PCR cuantitativo en células PC3, H196, H1703, HEK293 y HeLa para excluir una regulación de transcripción del nivel de Mcl-1 mediante USP46. No se observó ninguna disminución significativa de los niveles de ARNm de Mcl-1 después de silenciamiento de USP46 (Figuras 7 a 11, respectivamente), lo que demuestra que la regulación de Mcl-1 inducida por USP46 en células PC3, H196, H1703, HEK293 y HeLa es un evento posterior a la transcripción. Por último, como control, todos los ARNsi dirigidos a USP46 ensayados afectaron a los niveles de ARNm de USP46: se confirma
40

>68% de disminución en células PC3
>62% de disminución en células H196
>46% de disminución en células H1703
>90% de disminución en células HEK293
>80% de disminución en células HeLa (Figuras 7 a 11, respectivamente).
45

Estos resultados muestran que la USP46 interviene en la estabilización de Mcl-1 en las líneas celulares PC3, H196, H1703, HEK293 y HeLa y, por consiguiente, confirman los resultados previos obtenidos en células HCT116.

2.4 Efecto del silenciamiento de Mcl-1 y USP46 en la muerte de células HeLa inducida por ABT-737

Este ensayo se utilizó para evaluar el efecto del ARNsi de USP46 en la sensibilización de células HeLa con respecto a la apoptosis inducida por ABT-737. Nuestro control positivo, ARNsi de Mcl-1, sensibilizó las células con respecto a la apoptosis inducida por ABT-737, tal como muestran un aumento en un factor 2,7 de la actividad de caspasa 3 (Figura 12A). Fue interesante que el ARNsi de USP46v1 y USP46v4 produjo un aumento significativo de la actividad
50

de caspasa 3 después de tratamiento con ABT-737 (v1: inducción de factor 1,5; v4: inducción de factor 2 con ABT-737 3 μ M) (Figura 12A). Un aspecto importante consiste en que la inducción de actividad de caspasa 3 inducida por ABT-737 presentaba una correlación estrecha con el nivel de reducción de Mcl-1 (Figura 12B). También se controló la escisión de PARP en las mismas condiciones y se observó un aumento de la banda de PARP escindida con ARNsi de Mcl-1 y un aumento intermedio de la banda de PARP escindida con ARNsi de USP46, confirmando así los resultados para la caspasa (Figura 12B).

Para confirmar el efecto del ARNsi de USP46 en la sensibilización de células a la apoptosis inducida por ABT-737 en células HeLa, se cuantifica la cantidad de células en fase subG1, que refleja principalmente la apoptosis. De modo similar al ARNsi de Mcl-1, el ARNsi de USP46 indujo apoptosis en células cancerosas HeLa no tratadas (Figuras 13A y 14A). De hecho, células tratadas con Luc presentaban 21,4 \pm 0,6% de células subG1, mientras que células tratadas con Mcl-1 (46,2 \pm 2,2%), células tratadas con USP46v1 (34 \pm 4%), células tratadas con USP46v4 (29,3 \pm 0,3%) y células tratadas con pool de USP46 (40 \pm 11%) presentaban una mayor cantidad de células subG1 (Figuras 13A y 14A). En presencia de ABT-737 (3 μ M) se observó un ligero aumento de células subG1 en células tratadas con Luc (35% \pm 6,6% de células subG1) (Figuras 13A y 14A). En cambio, cuando las células se trataron con ARNsi de Mcl-12 en presencia de ABT-737 (63% \pm 2% de células subG1) se observó un fuerte aumento de células subG1 (Figuras 13A y 14A). De forma interesante, el ARNsi de USP46v1, USP46v4 así como un pool de USP46 activo también indujeron un aumento notable de células subG1 tratadas con ABT-737 en comparación con células transfectadas con ARNsi de control (v1: 60,7% \pm 5,4%; v4: 51,3% \pm 1,2%; pool: 62,4% \pm 0,1% de células subG1) (Figuras 13A y 14A). Se observó que el grado de inducción de subG1 en presencia de ABT-737 presentaba una correlación estrecha con el nivel de reducción de Mcl-1 (Figura 13B).

En conclusión, de modo similar al silenciamiento de Mcl-1, el silenciamiento de USP46 disminuye el nivel de Mcl-1, induce la apoptosis en células cancerosas HeLa no tratadas y sensibiliza las células HeLa con respecto a la muerte celular inducida por ABT-737. De forma interesante, estas diferencias en la sensibilización de ABT-737 siempre estaban en correlación con la eficiencia de silenciamiento a nivel de Mcl-1; cuanto más disminuye la Mcl-1 después de transfección de ARNsi de USP46, mayor es la sensibilización inducida por USP46 observada. Se comprobó que el silenciamiento de USP46 sensibiliza significativamente las células con respecto a ABT-737 en un nivel intermedio entre el control negativo (ARNsi de Luc) y el control positivo (silenciamiento de Mcl-1), de acuerdo con la evaluación mediante ensayo de caspasa 3, escisión de PARP y análisis de subG1. Tomados en conjunto, estos resultados confirman la intervención de USP46 en la regulación de Mcl-1 en células cancerosas cervicales He-La. También se han observado resultados similares en células HCT116, PC3, H1703 y H196.

2.5 Actividad proteolítica *in vitro* de USP46

La actividad de desubiquitinación de proteínas purificadas de tipo salvaje y mutantes se compara *in vitro*. Se ensayaron tanto enzimas de tipo salvaje como enzimas mutantes en reacciones dependientes de la dosis empleando el ensayo Ub-AMC (Figura 15). De forma interesante, la proteína USP46 hidrolizaba Ub-AMC de modo dependiente de la dosis. En cambio, no se observa ningún efecto dependiente de la dosis de mutante catalíticamente inactivo, lo que indica la ausencia de actividad de desubiquitinación copurificada con el mutante GST-USP46 (Figura 15A). Para confirmar estos resultados se llevaron a cabo experimentos cinéticos con GST-USP46. Con una concentración fija de enzima y sustrato se observa un aumento dependiente de la dosis de la hidrólisis de Ub-AMC con la proteína USP46 de tipo salvaje, pero no con la forma mutante (Figura 15B). Tomados en conjunto, estos resultados validan la identificación de una actividad de desubiquitinación inducida por USP46 específica con una relación señal/fondo correcta.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido USP específico de la leucemia de células mieloides 1 (Mcl-1) seleccionado de entre el grupo consistente en
- 5 a) un polipéptido consistente en USP26 (proteasa específica de la ubiquitina 26), USP38, USP42 o USP46;
b) un fragmento funcional de un polipéptido USP26, USP38, USP42 o USP46 que presenta una actividad de desubiquitinación;
c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de un 84% o más con un polipéptido consistente en USP26 (GI: 3994267), USP38 (GI: 31559774), USP42 (GI: 79750943) o USP46 (GI: 31377708) y que presenta una actividad de desubiquitinación;
- 10 como herramienta de cribado de un agente para el tratamiento del cáncer.
2. Uso de una célula transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificador de un polipéptido tal como se describe en la reivindicación 1 y que expresa el polipéptido como una herramienta de cribado de un agente para el tratamiento del cáncer.
- 15 3. Método para el cribado de un agente para el tratamiento del cáncer, que incluye los pasos de:
- a) poner en contacto una célula tal como se describe en la reivindicación 2 o una membrana celular de la misma con un compuesto a ensayar; y
b) analizar si la Mcl-1 se estabiliza o no;
c) seleccionar un agente desestabilizador de Mcl-1.
- 20 4. Método para el cribado de un agente para el tratamiento del cáncer, que incluye los pasos de:
- a) poner en contacto una célula tal como se describe en la reivindicación 2 o una membrana celular de la misma con un compuesto a ensayar; y
b) analizar la tasa de ubiquitinación de Mcl-1.

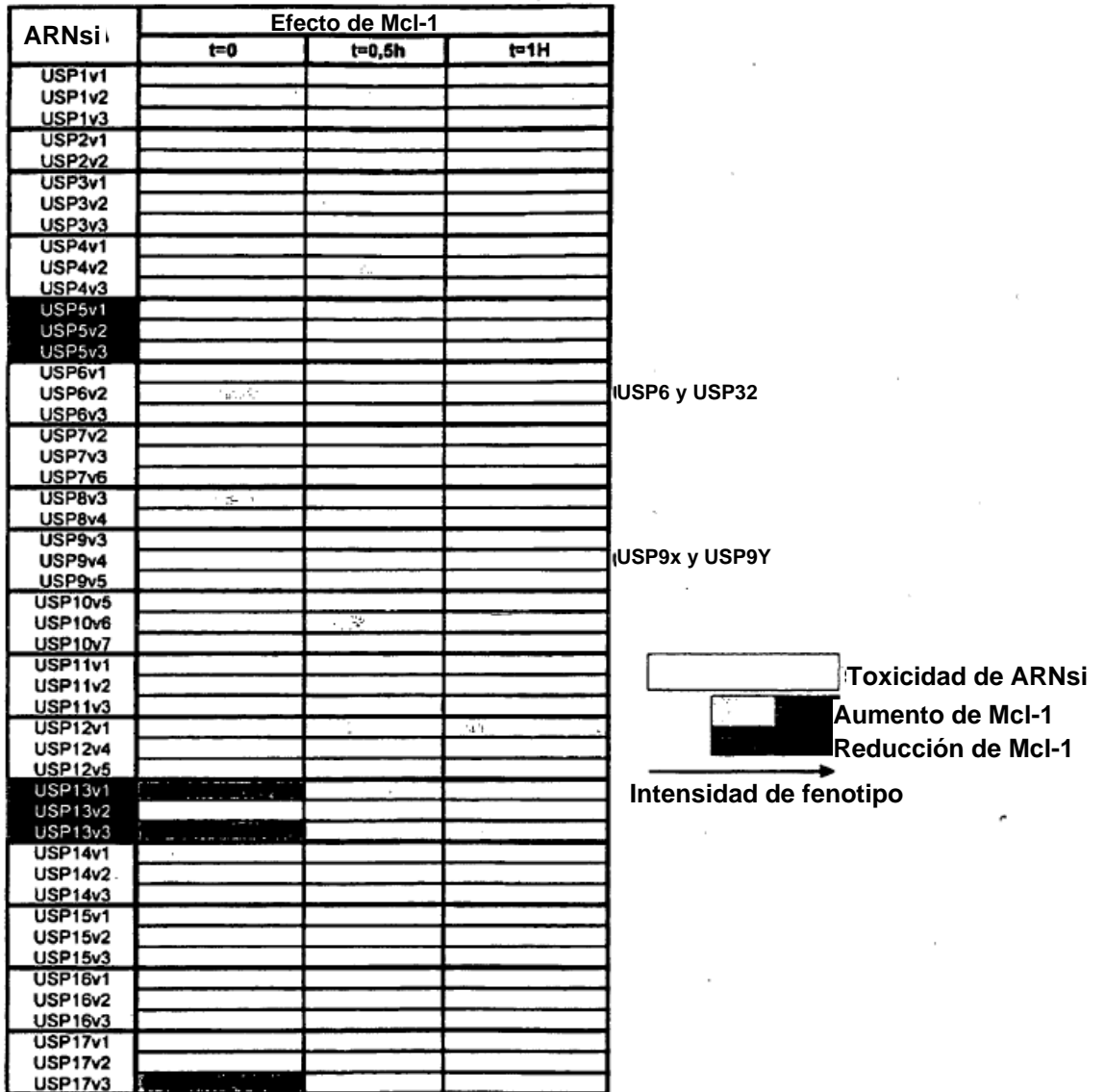


Figura 1.1

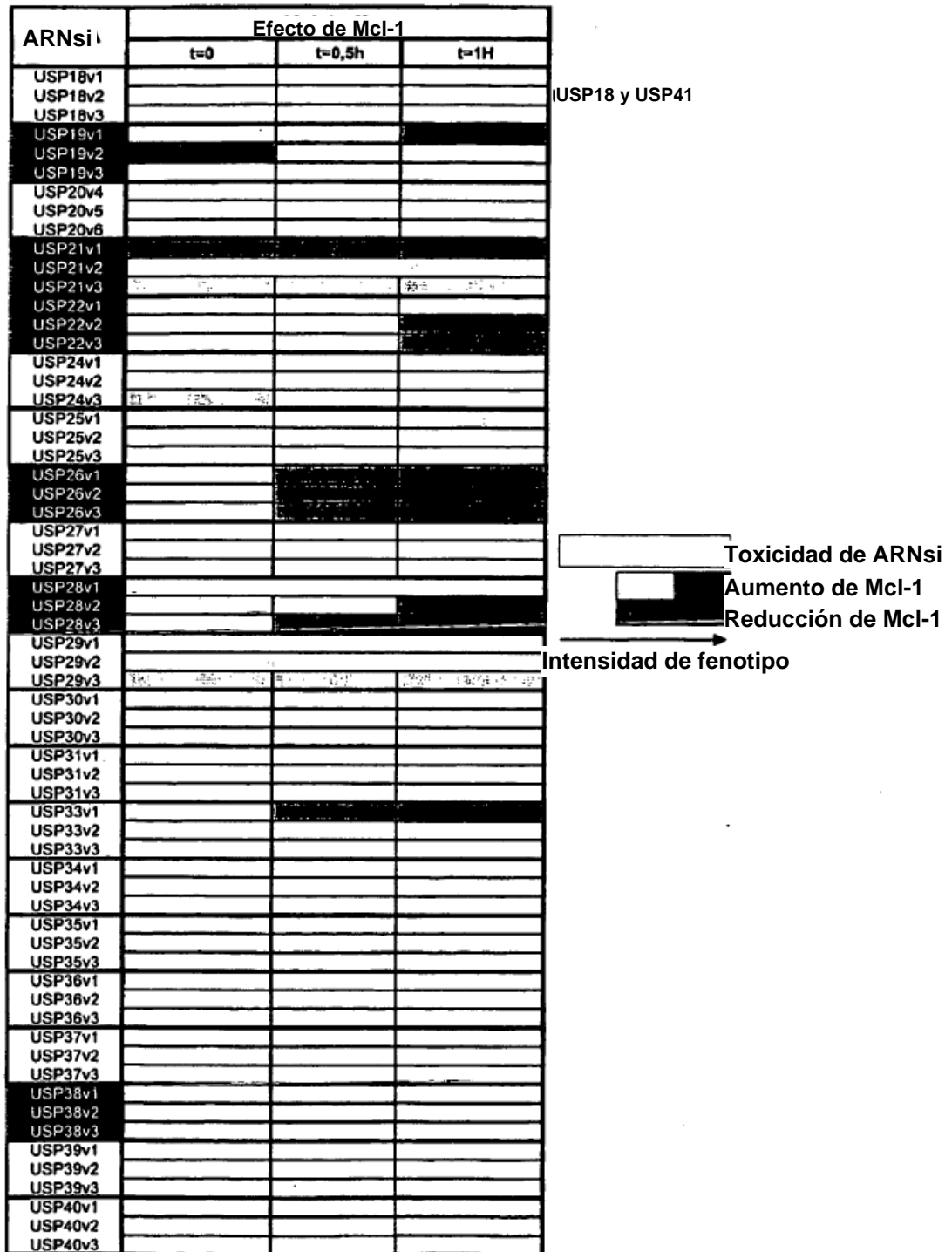


Figura 1.2

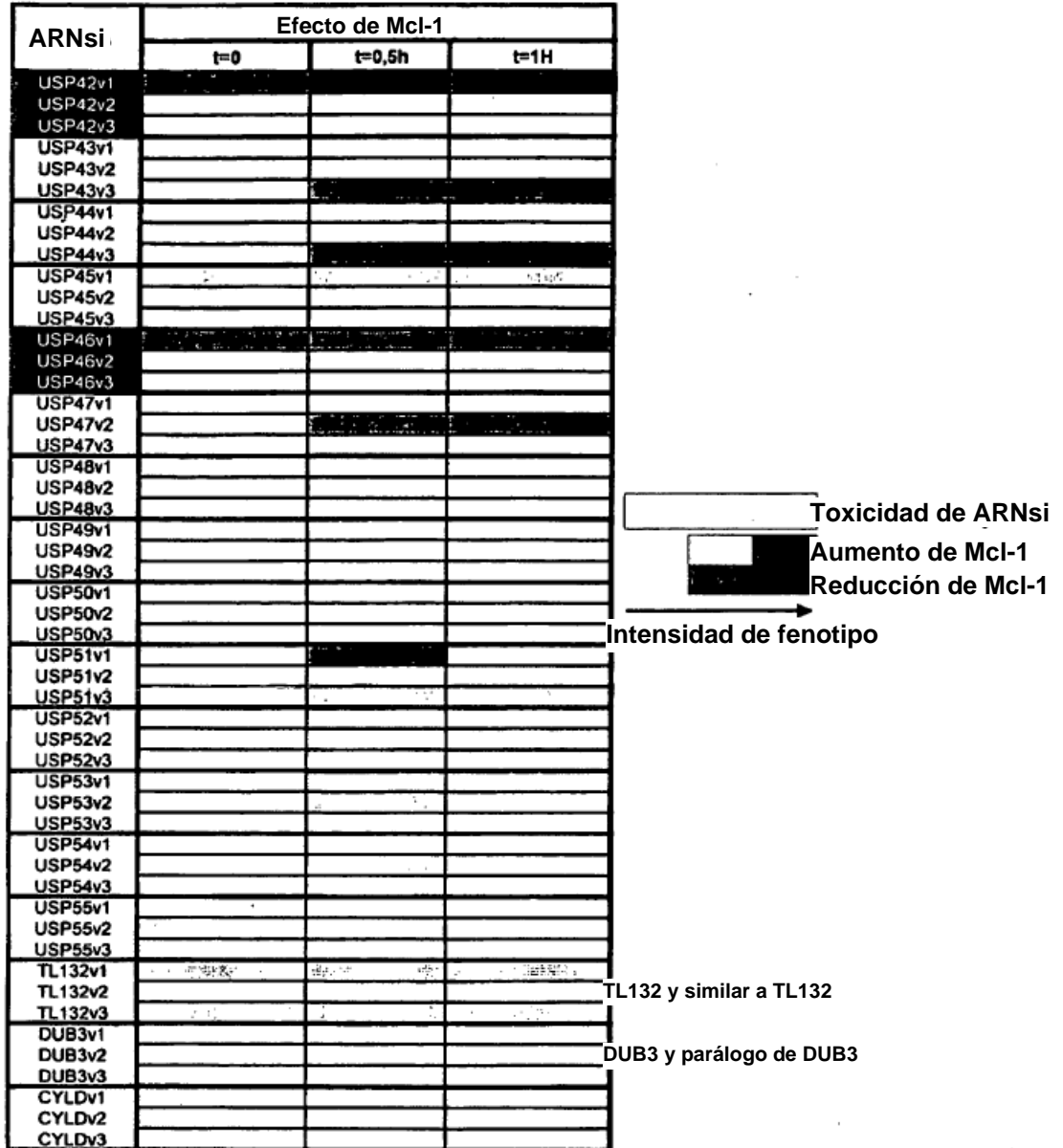


Figura 1.3

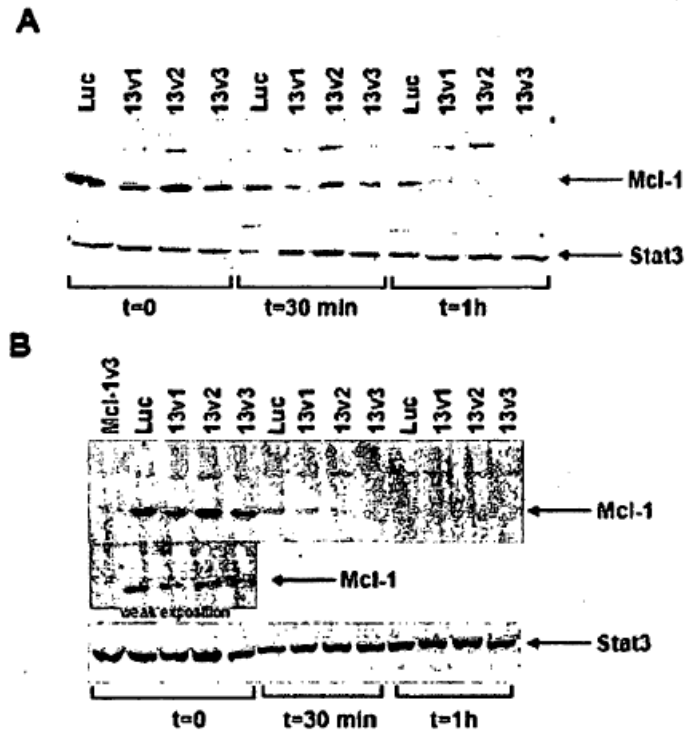


Figura 2

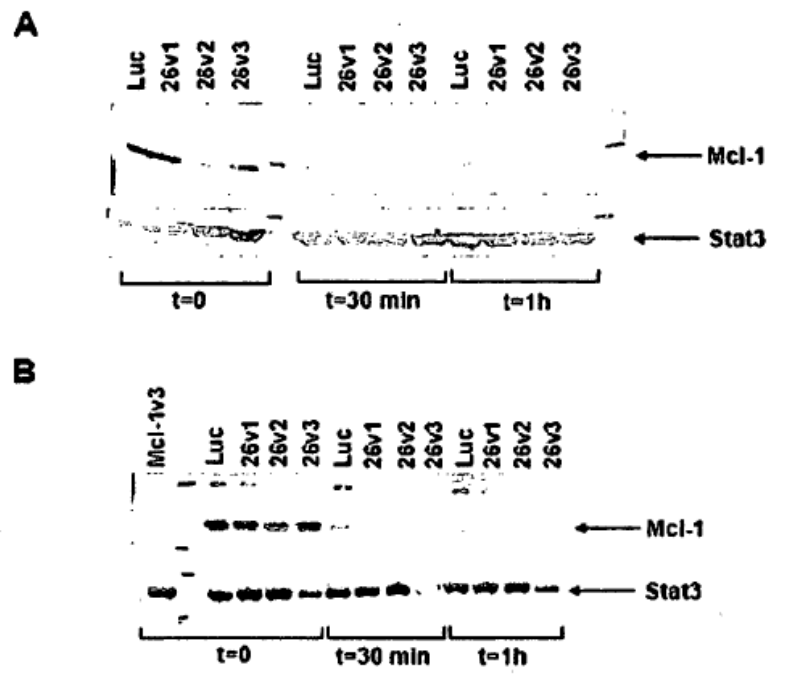


Figura 3

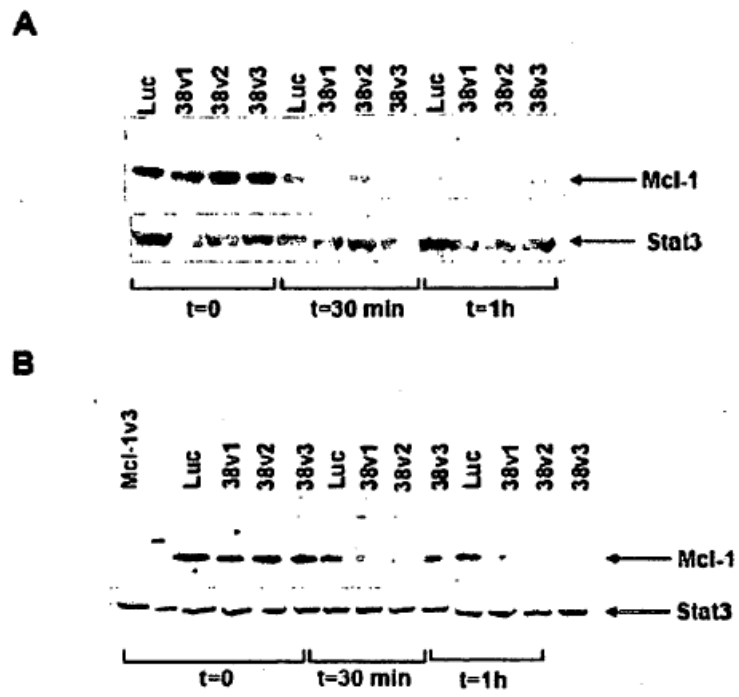


Figura 4

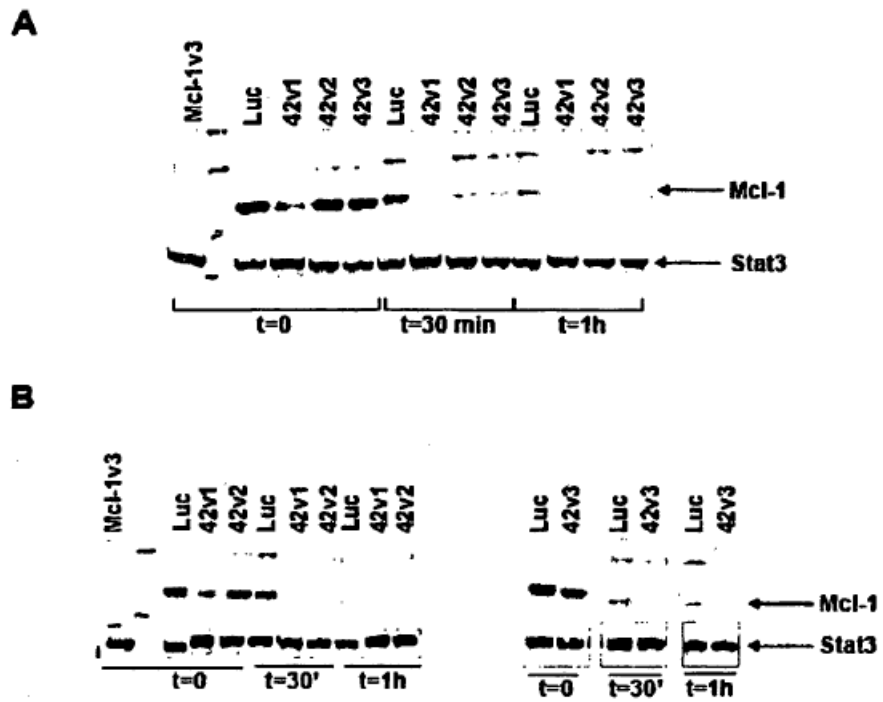


Figura 5

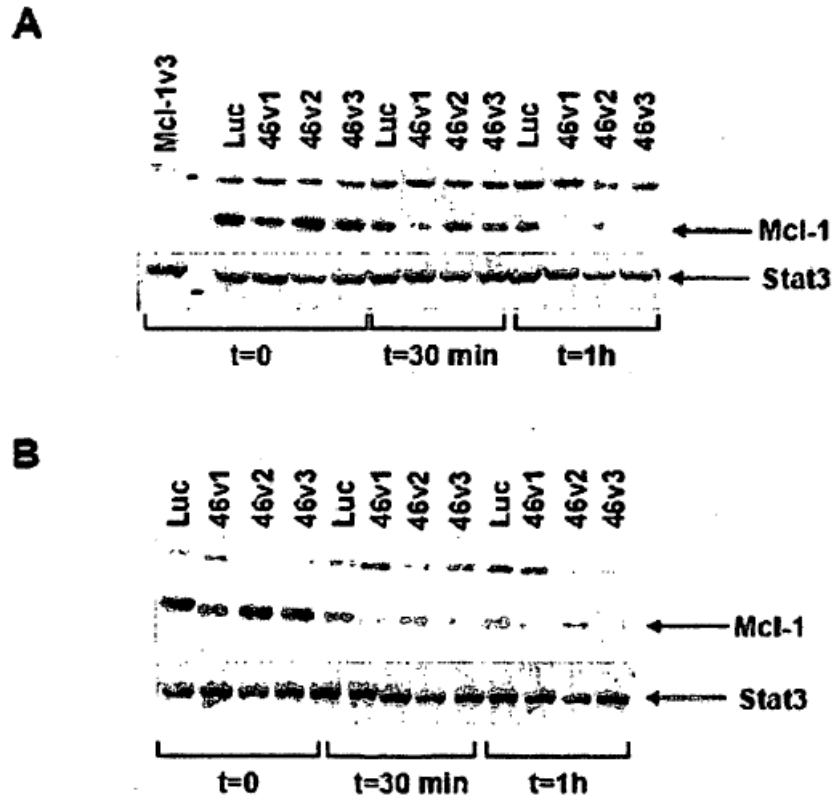
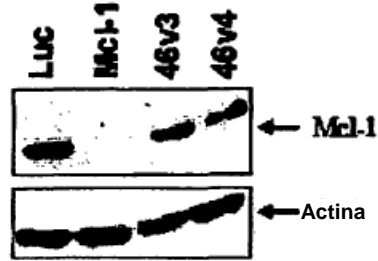
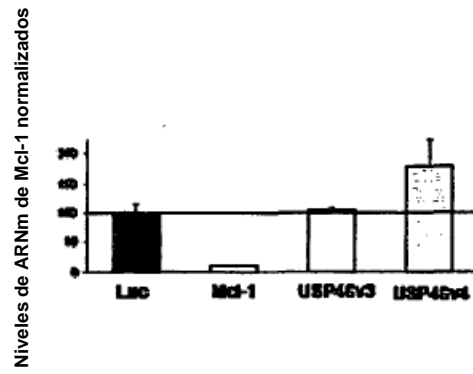


Figura 6

A



B



C

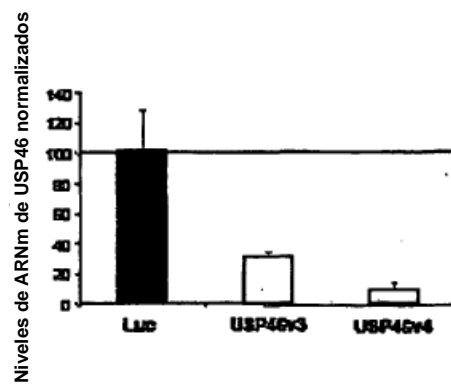


Figura 7

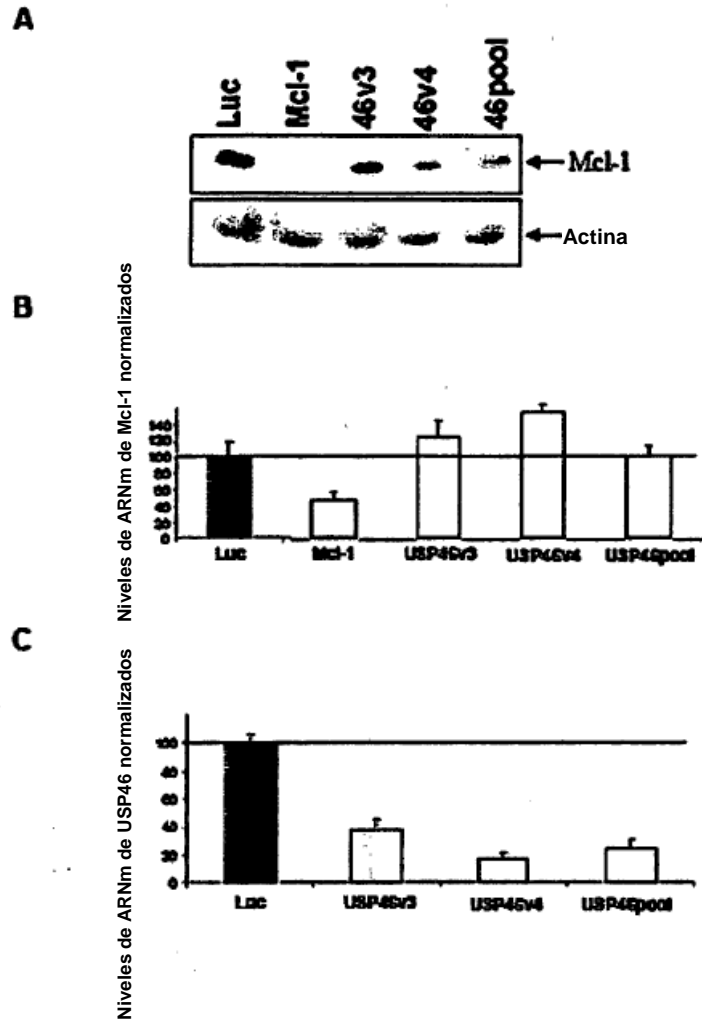


Figura 8

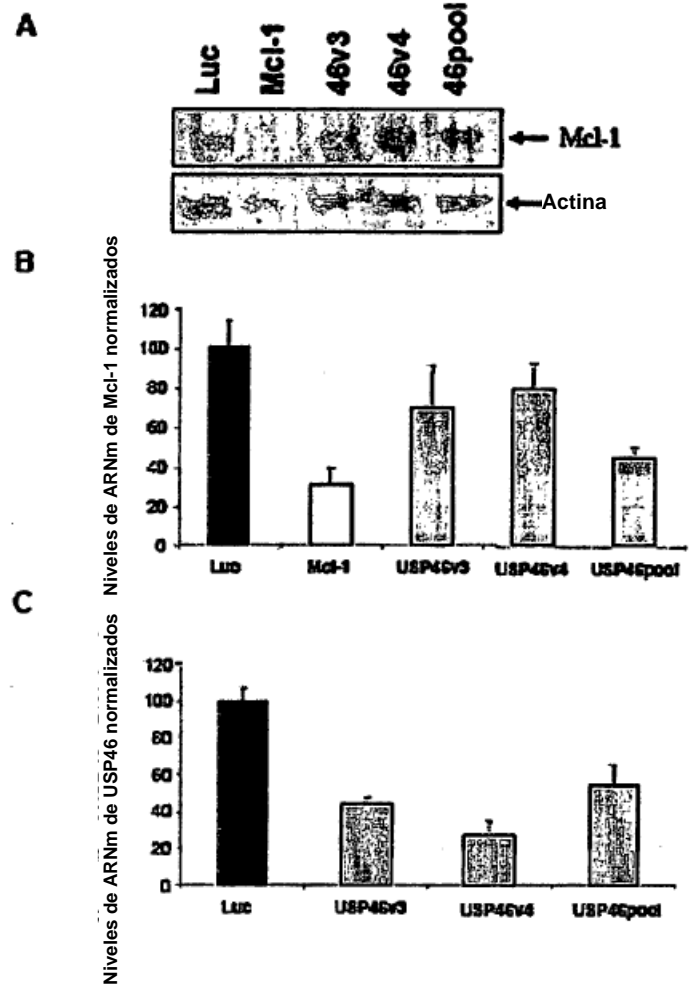


Figura 9

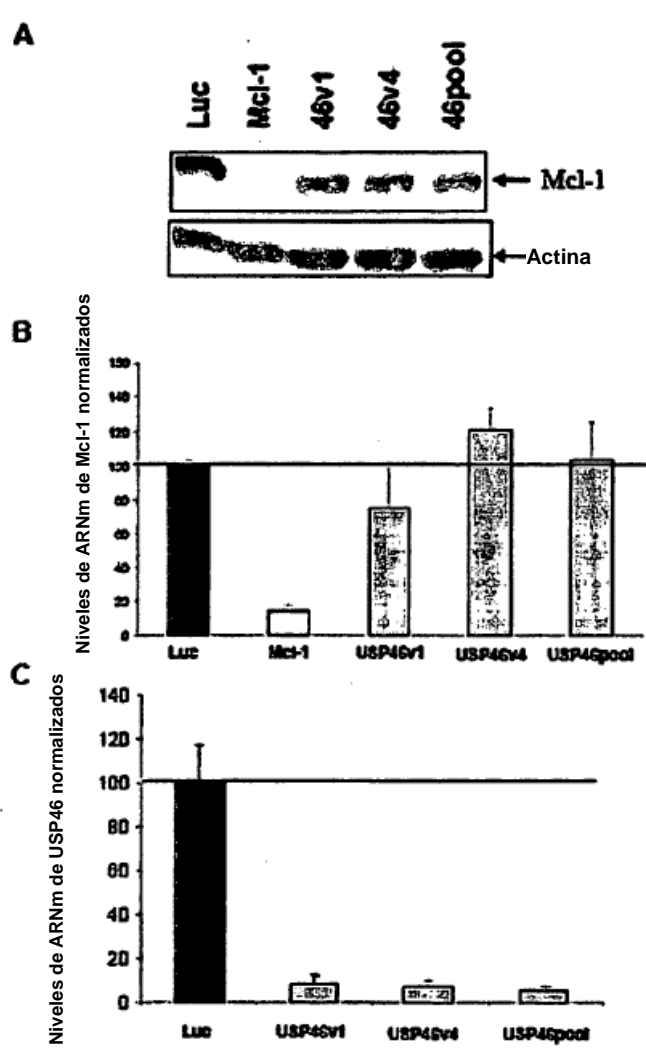


Figura 10

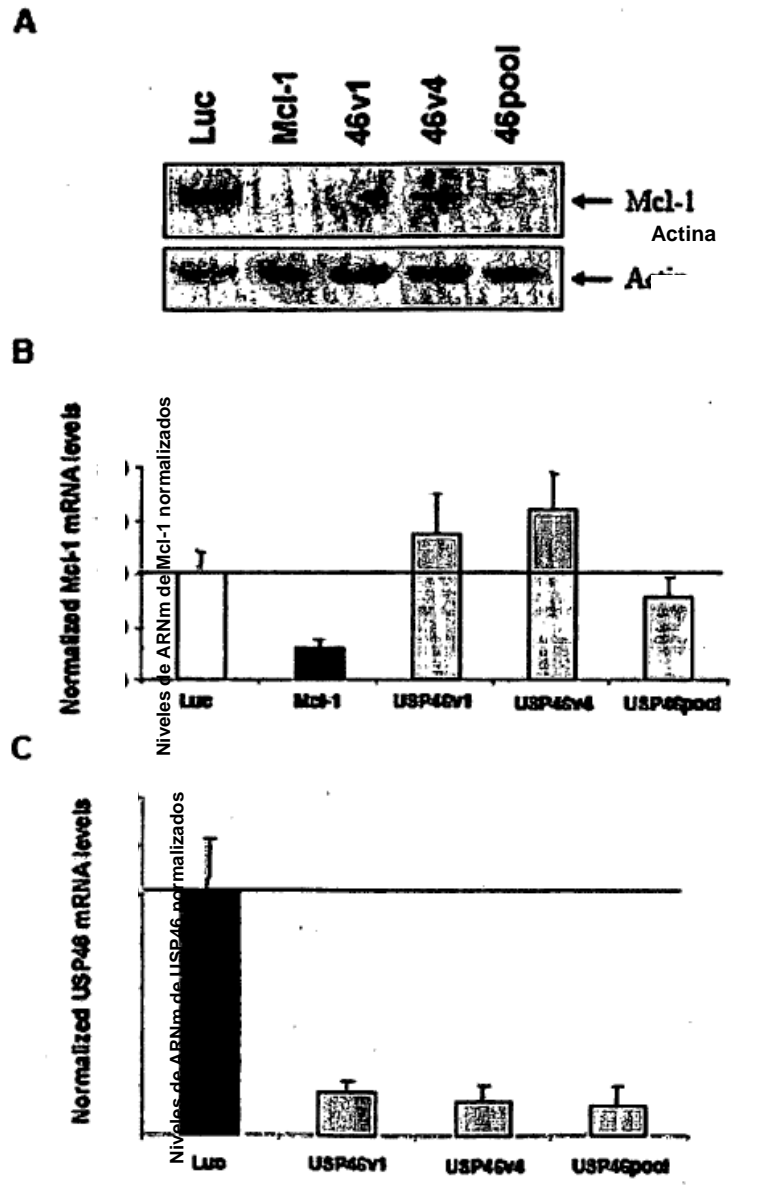
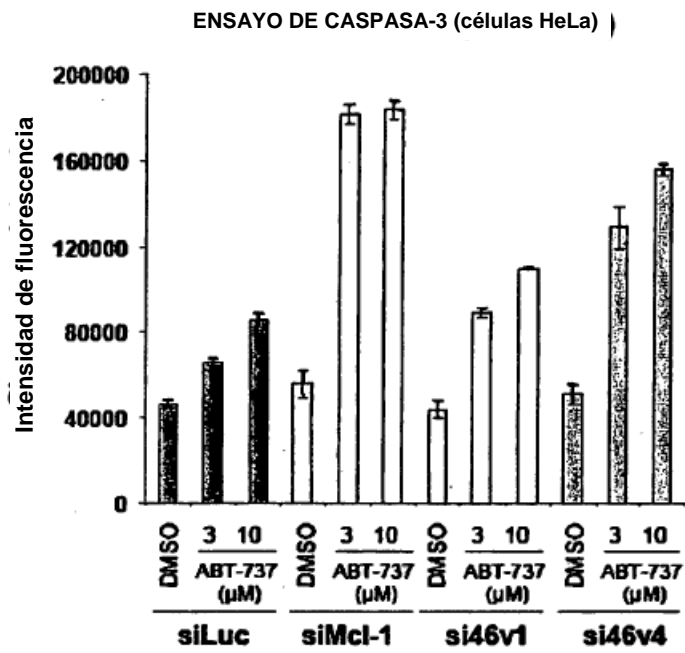


Figura 11

A



B



Figura 12

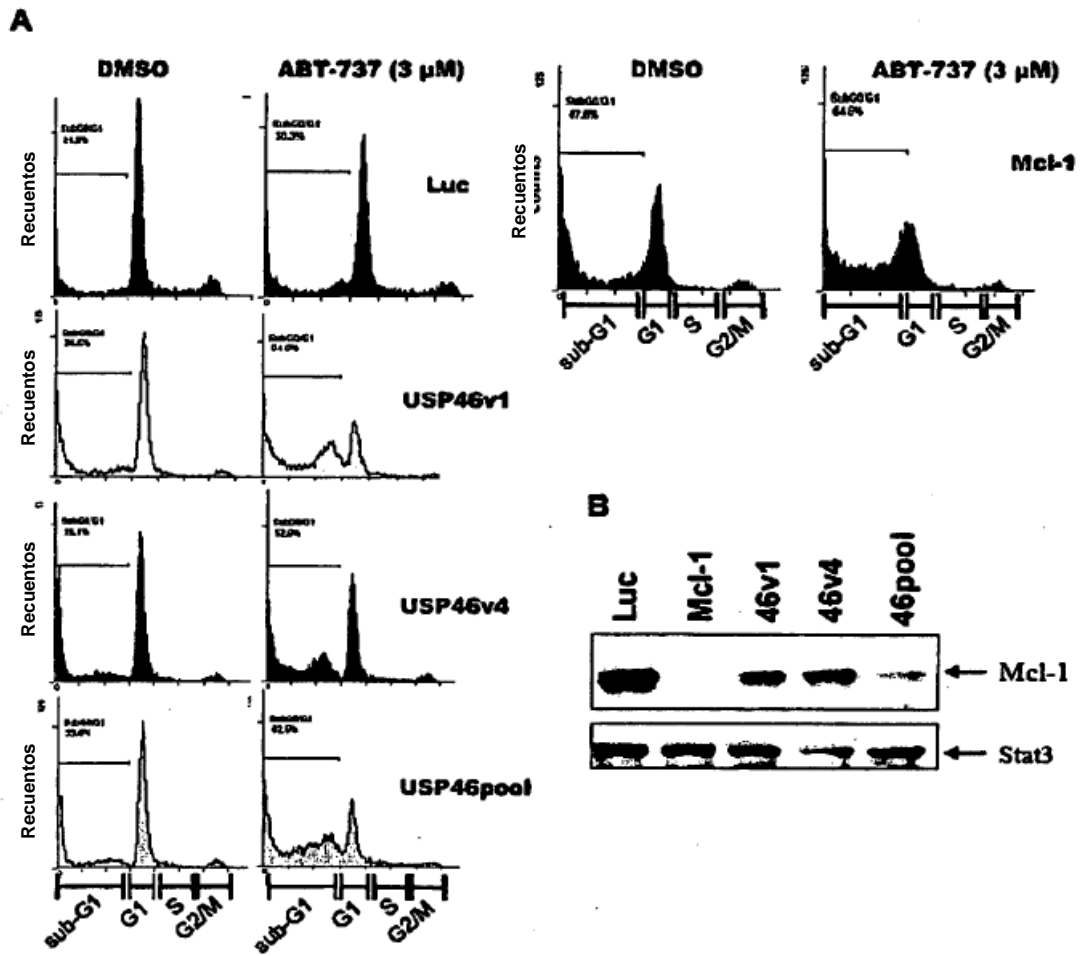


Figura 13

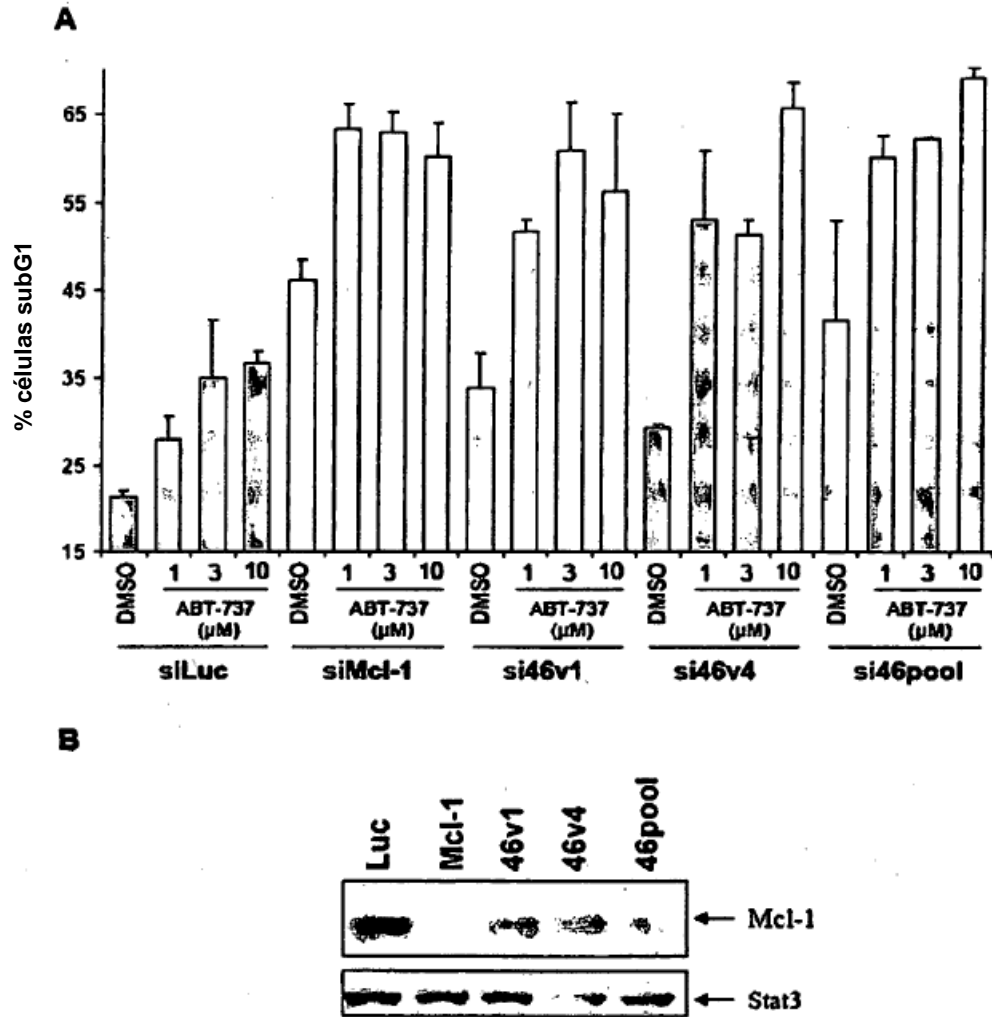
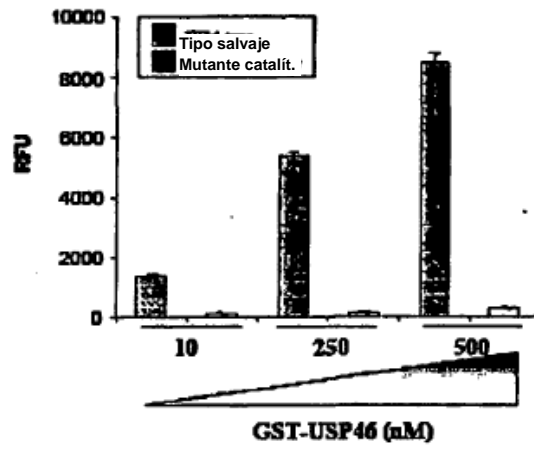


Figura 14

A

Escisión de Ub-AMC inducida por USP46



B

Escisión de Ub-AMC inducida por USP46

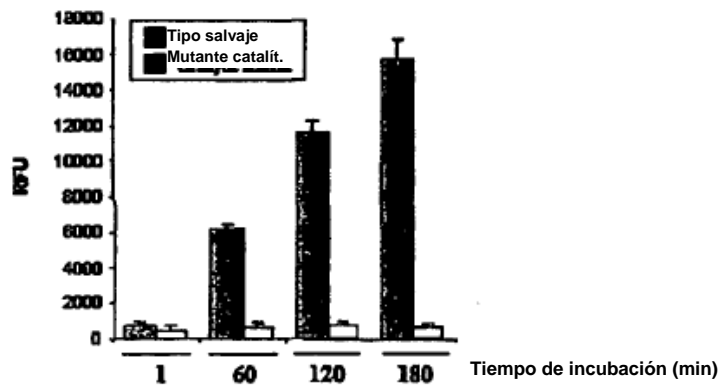


Figura 15