

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 890**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/53** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 09739685 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2274324**

54 Título: **Sustancias y composiciones para potenciar la reparación de ADN y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**29.04.2008 US 48868 P**

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

**20.10.2014**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)  
Cornell Center for Technology Enterprise, And  
Commercialization (CCTEC), 395 Pine Tree Road,  
Suite 310  
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**ZHOU, PENGBO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 509 890 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

Sustancias y composiciones para potenciar la reparación de ADN y procedimientos de uso

Antecedentes de la invención

5 Las células están continuamente expuestas a factores, tales como especies reactivas intracelulares y agentes ambientales, que son capaces de causar daños en el ADN. Las consecuencias potencialmente mutagénicas del daño en el ADN se minimizan mediante las vías de reparación del ADN, que están ampliamente caracterizadas en tres formas: la reparación por escisión de base (BER), la reparación de apareamientos erróneos (MMR), y la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Wood et al., Science, 291: 1284 - 1289 (2001)). Las deficiencias en la reparación de daños en el ADN subyacen a la patogenia del cáncer, así como muchos trastornos genéticos, como el xeroderma pigmentoso, el síndrome de Cockayne y la ataxia-telangiectasia

10 La exposición a la irradiación de luz ultravioleta (UV) o a mutágenos químicos conduce a la acumulación de ADN dañado, que a su vez, da como resultado mutaciones que contribuyen al desarrollo del cáncer. Las células eucariotas responden a la irradiación de UV mediante la inducción de la vía NER, que identifica y elimina el ADN dañado, y mediante la activación del punto de control de los daños en el ADN para detener la progresión del ciclo celular, lo que da tiempo para la acción NER. La NER es la principal vía de reparación del ADN mediante la cual las células eliminan el daño en ADN que distorsiona la hélice causado por la irradiación UV y por los mutágenos químicos (Friedberg et al., Reparación de ADN y mutagénesis, 2ª edición, ASM Press, Washington, DC (2006))

15 La NER es un proceso de varias etapas que usa más de 30 proteínas para llevar a cabo las distintas etapas de reconocimiento del daño en el ADN, incisión de los extremos 5' y 3' de la lesión para eliminar el ADN dañado, rellenado del hueco con la ADN polimerasa, y la unión del ADN recién sintetizado en el ADN parental a través de la actividad de la ligasa de ADN (véase, por ejemplo, Friedberg et al., DNA Repair and Mutagenesis, 2nd Edition, ASM Press, Washington, D.C. (2006); Sancar, Annu. Rev. Biochem., 65: 43 - 81 (1996)). La NER está compuesta por dos vías distintas especificidades de hebra del ADN: la vía de reparación acoplada a la transcripción (TCR) que elimina las lesiones de las hebras del ADN transcrito por la ARN polimerasa II, y la vía de reparación genómica global (GGR), que repara los daños en la hebra no transcrita de los genes expresados, así como de la cromatina inactiva (revisado en Hanawalt, Oncogene, 21: 8949 - 8956 (2002)). El proceso NER ha sido ampliamente estudiado, y los componentes esenciales para realizar las reacciones de escisión y reparación se han definido mediante reconstitución in vitro utilizando proteínas recombinantes y los moldes del ADN dañado (Aboussekhra et al., Cell, 80: 859 - 868 (1995); Araujo et al., Genes Dev., 14: 349 - 359 (2000); Mu et al., J. Biol. Chem., 271: 8285 - 8294 (1996); Mu et al., J. Biol. Chem., 270: 2415 - 2418(1995)).

20 Factores de la NER implicados en la ruta GGR de reconocimiento de daños en el ADN incluyen XPA-RPA, XPC-HR23B, y las proteínas heterodiméricas de unión al ADN específicas del daño, que consisten en las subunidades DDB1 (p127) y DDB2 (p48). Entre estos sensores del daño en el ADN, DDB1- DDB2 heterodiméricas exhiben la mayor afinidad (actividad designada UV-DDB) para dímeros de pirimidina ciclobutano inducidos por UV (CPDS) y 6-4 fotoproductos (6-4PP) (Batty et al., J. Mol. Biol, 300: 275 - 290 (2000)). Las mutaciones en DDB2 son responsables de los casos del grupo E de complementación DE xeroderma pigmentoso (XP-E), que se caracterizan por defectos en la eliminación mediada por GGR del ADN dañado y la predisposición al cáncer de piel (Wittschieben and Wood, DNA Repair (Amst), 2: 1065 - 1069 (2003)). Después de la irradiación UV, DDB1 y DDB2 se acumulan inmediatamente sobre el ADN dañado y posteriormente se ubiquitinan y degradan por la acción de la ubiquitina ligasa CUL4A (Chen et al., Mol. Cell 22: 489 - 499 (2006); Fitch et al., DNA Repair (Amst), 2: 819 - 826 (2003); Groisman et al., Cell, 113: 357 - 367 (2003); Rapic-Otrin et al., Nucleic Acids Res., 30: 2588 - 2598 (2002)). CUL4A también es responsable de la renovación de DDB2 en condiciones de crecimiento normales (Chen et al., J. Biol. Chem, 276: 48175 - 48182 (2001); Nag et al., Mol. Cell Biol., 21: 6738 - 6747 (2001), lo que conduce a una disminución global de la actividad de UV-DDB (Chen et al., J. Biol. Chem, 276: 48175 - 48182 (2001)).

25 Las funciones de ubiquitina ligasa CUL4A como componente de un complejo multimérico en el que el extremo C de CUL4A interacciona con la proteína de dedo de ANILLO Rbx1 / ROC1 / HRT1 (denominada en lo sucesivo Rbx1) para reclutar la enzima de conjugación de ubiquitina E2, y el extremo N de CUL4A interacciona con DDB1. A su vez, DDB1 actúa como un adaptador, que se une a DDB1, factores asociados con CUL4A (DCAF), que sirven como receptores de sustrato específicos (Angers et al., Nature, 443: 590 - 593 (2006); He et al., Genes Dev., 20: 2949 - 2954 (2006); Higa et al., Nat Cell Biol., 8: 1277 - 1283 (2006); Jin et al., Mol. Cell 23: 709 - 721 (2006); Lee and Zhou, Mol. Cell 26: 775 - 780 (2007)). CUL4B, el otro miembro de la familia CUL4, tiene una amplia homología de secuencia con CUL4A y comparte algunas funciones redundantes con CUL4A, incluyendo el mantenimiento del crecimiento celular y la participación de la ubiquitinación de ciertos objetivos de CUL4 (Higa et al., Nat. Cell Biol., 5: 1008 - 1015 (2003); Hu et al., Nat. Cell Biol., 6: 1003 - 1009 (2004)). CUL4B que contiene complejos de ubiquitina ligasa tienen algunas características únicas, tales como la capacidad de degradar los receptores de hormonas esteroideas sexuales (Ohtake et al., Nature, 446: 562 - 566 (2007)). Además, se han identificado las mutaciones CUL4B como los defectos genéticos causales subyacentes al retraso mental ligado al cromosoma X (Tarpey et al., Am. J. Hum. Genet, 80: 345 - 352 (2007); Zou et al., Am. J. Hum. Genet., 80: 561 - 566 (2007)).

Hasta la fecha, la mayoría de las terapias contra el cáncer que se dirigen a las vías de reparación del ADN son

sustancias que inhiben la reparación del ADN en las células cancerosas con el fin de mejorar los efectos de las quimioterapias y radioterapias que dañan el ADN (Kelley and Fishel. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 8(4): 417 - 25 (2008)).

5 Comparativamente se han realizado menos intentos para mejorar o acelerar la reparación de ADN a fin de reducir las consecuencias del daño de ADN después de que se ha producido con el fin de prevenir o tratar la enfermedad, aunque las composiciones que comprenden endonucleasa T4 V se han analizado como una terapia potencial para el cáncer de piel (Cafardi y Elmets. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 8(6): 829 - 38 (2008)).

10 Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos para mejorar la reparación del ADN en células y en animales. La presente invención proporciona tales composiciones y procedimientos, que pueden ser útiles para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con daños en el DNA

### **Breve resumen de la invención**

15 La presente invención se refiere al uso de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A en un animal para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una afección asociada con daños en el ADN en un animal, en el que la sustancia está seleccionada del grupo que consiste en un polipéptido que comprende un fragmento de la región N-terminal de CUL4A o un análogo, homólogo, derivado del mismo que funciona de manera similar a la región N-terminal de CUL4A, un ARN de interferencia pequeño (ARNsi), un ARN de horquilla corta (ARNsh) de CUL4A, un oligonucleótido antisentido de CUL4A, un aptámero de CUL4A, y una ribozima de CUL4A, y en el que el medicamento es para ser administrado a un animal para provocar un aumento en la actividad de reparación por escisión de nucleótidos con el fin de prevenir o tratar una afección asociada con el daños en el ADN en el animal.

20 En el presente documento se divulga un procedimiento para prevenir o tratar una afección asociada con daños en el ADN en un animal, procedimiento que comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad eficaz de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A, de modo que se previene o trara una afección asociada con daños en el ADN en el animal.

25 En el presente documento también se divulga un procedimiento para prevenir o tratar una afección asociada con daños en el ADN en un animal, procedimiento que comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad eficaz de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A, en el que la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A produce un incremento de la actividad de reparación del ADN por escisión de nucleótidos, de modo que se previene o trata una afección asociada con daños en el ADN en el animal.

30 También se divulga una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A en un animal, así como una composición que comprende una sustancia de este tipo y un vehículo para el mismo. Dicha sustancia puede potenciar la actividad de reparación por escisión de nucleótidos en un animal.

35 También se divulga un procedimiento de identificación de una sustancia que modula la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A, procedimiento que comprende (a) combinar un polipéptido CUL4A, una proteína polipeptídica 1 de unión al ADN dañado, y una sustancia de ensayo, en condiciones que favorecen la formación de un complejo de CUL4A DDB1, (b) medir la cantidad de complejo-CUL4A DDB1 formada en las condiciones de (a), y (c) comparar la cantidad de complejo formado CUL4A-DDB1 como se mide en (b) en presencia de un sustancia de ensayo en la cantidad de complejo-CUL4A DDB1 formado según se mide en (b) en ausencia de una sustancia de ensayo, con lo que una diferencia es indicativa de la capacidad de la sustancia de ensayo para modular la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A. Tal modulador identificado puede ser una sustancia que interfiere con la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A.

### **Breve descripción de las figuras**

45 La FIG. 1A es un conjunto de diagramas del locus genómico *Cul4a* murino antes y después de apuntar al casete LoxP. La FIG. 1B es un conjunto de transferencias de TIPO Southern que comparan el locus de CUL4A en células madre embrionarias silvestres y heterocigotas FLOXED f/+). La FIG. 1C es un conjunto de geles de agarosa que representa CUL4A en la PCR de ADN amplificado de cola de ratones salvajes (+ / +), floxed homocigotos (f / f), y heterocigotos (f / +) (parte superior) y los alelos de de *CUL4A* ( $\Delta$ ), y recombinado (null). La FIG. 1D es un conjunto de transferencias de TIPO Western CUL4A, CUL4A( $\Delta$ ), y los niveles de  $\beta$ -actina en tejidos u fibroblastos embrionarios (MEF) de ratones salvajes (-/-) y defectivos (-/-). La FIG. 1E es un conjunto de transferencias de tipo western entre Rbx1 and CUL4A or CUL4A ( $\Delta$ )

50 La FIG.. 2A es un diagrama deL ALELO DEFECTIVO CUL4A por Li et al. (*Mol. Cell Biol.*, 22: 4997 - 5005 (2002)), lo que indica una delección de parte de *Pcid2*. La FIG. 2B es un gráfico de barras que representa la expresión del ARNm de *Pcid2* evaluada mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real en MEF salvajes infectados con lentivirus vacío (simulado), lentivirus que codifica un ARN de horquilla corto *Pcid2* (Sh-*Pcid2*-1, sh-*Pcid2*-2), o sh-*Pcid2* mezclado. La FIG. 2C es un gráfico que representa el crecimiento de MEs tratados como en la figura. 2B.

La FIG. 3A es un gráfico de barras que representa el porcentaje de MEF control (f / f-4a) y defectivos en CUL4A

(KO-4a) infectados con un lentivirus que codifica GFP y, (sh) -4b corto en horquilla o (scm)-4b mezclado, en el punto de tiempo indicado, tal como se determina por FACS. LA FIG. 3B es un gráfico de barras que representa la incorporación de BrdU en los MEF descritos en la figura. 3A, como determina contando células BrdU<sup>+</sup> en los campos microscópicos

5 La FIG. 4A es un conjunto de transferencias de tipo Western que representan CUL4A, DDB2, p21, y los niveles de  $\beta$ -actina en piel control (f / f) y defectiva en CUL4A (- / -). La FIG. 4B es un conjunto de transferencias de tipo Western que representan CUL4B, CUL4A, DDB2, p21, XPC, y los niveles de  $\beta$ -actina en MEF tratados con el lentivirus indicado. La FIG. 4C incluye autorradiogramas que indican niveles DE DDB2 por análisis pulso y caza y un gráfico de líneas que cuantifica la renovación de DDB2. La FIG. 4D incluye autorradiogramas que indican los niveles de p21 mediante análisis de pulso y caza y un gráfico de líneas que cuantifica la renovación de p21. La FIG. 4E es un conjunto de transferencias de tipo Western que indican los niveles de XPC, XPC ubiquitinada (XPC~Ub<sub>n</sub>), CUL4A, y la histona 3 (H3) en los extractos de la cromatina de las células HCT116 irradiadas con UV

10 tratados con el lentivirus indicado.

15 Las FIGS. 5A-C incluye gráficos de barras que cuantifican los niveles de ARNm de *Ddb2* (A), *p21* (B), and *Xpc* (C) según lo determinado por RT-PCR cuantitativa en tiempo real en *Cul4a<sup>fl/fl</sup>* (1), *Cul4b<sup>kl/d</sup>* (2), *Cul4a<sup>-/-</sup>* (3), and *Cul4a<sup>-/-</sup>; Cul4b<sup>kl/d</sup>* (4) y gráficos de barras de la cuantificación de los niveles proteicos de DDB2 (A), p21 (B), y XPC (C) determinado por las transferencias de tipo Western, en el que los números de las columnas corresponden a los números de carril en la figura. 4B.

20 La FIG. 6 es un conjunto de transferencias DE TIPO Western que representan las interacciones entre p21 y componentes del complejo CUL4A -DDB1 ubiquitina ligasa en inmunoprecipitados de células 293T transfectadas con los plásmidos indicados.

25 La FIG. 7A es una imagen de un ensayo de DESPLAZAMIRNTO de movilidad electroforética de la actividad UV-DDB en MEF control (*Cul4a<sup>fl/fl</sup>*) y defectivos (*Cul4a<sup>-/-</sup>*). La etiqueta "B" indica el complejo DDB-ADN. La FIG. 7B es un conjunto de gráficos de líneas que representan la reparación de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) inducidos por UV y 6-4 fotoproductos (6-4PP) en MEF tratados con el lentivirus indicado. La FIG. 7C es un gráfico de líneas que representa la síntesis de ADN en MEF sincronizados de los genotipos indicados tras la irradiación con UV. La FIG. 7D es un gráfico de líneas que representa la reparación de los CPD inducidos por UV en MEF de los genotipos indicados. La FIG. 7E incluye imágenes de micronúcleos en MEF de los genotipos indicados tras irradiación con UV y un gráfico que cuantifica la micronúcleos.

30 La FIG. 8 es un conjunto de histogramas que reflejan el contenido de ADN en los MEF del genotipo indicado irradiados o no con UV tal como se determina por citometría de flujo.

35 La FIG 9A es una curva de Kaplan-Meier de la aparición de carcinomas de células escamosas (SCC) en ratones control (*Cul4a<sup>fl/fl</sup>*) y defectivos en *Cul4a* (*Cul4a<sup>fl/fl</sup>; K14-Cre ER<sup>TAM</sup>*) después de la exposición UV crónica. La FIG. 9B es una imagen de un ratón vehículo de un SCC. Las FIGS. . 9C y 9D son imágenes de secciones de SCC teñidas con hematoxilina y eosina. Las FIGS. 9E and 9F son imágenes de las secciones de SCC inmunoteñidos con el marcador epidérmico basal p63 y DAPI. La morfometría representada en las FIGS. 9C y 9D y el patrón de inmunotinción p63 representado en las FIGS. 9E y 9F indican que el tumor es SCC típico.

40 Las FIGS. 10A y 10B son diagramas que describen un posible papel de CUL4A en el establecimiento de un umbral para la reparación del ADN y la supresión tumoral. CUL4A suprime coordinadamente la TNE y las vías de cimprobación de daños en el ADN G1 / S a través de la degradación selectiva de DDB2 y p21, respectivamente. La delección den CUL4A en las células eleva la respuesta de la capacidad de NER y de daños en el AND de G1S/ADM.

45 La FIG. 11 es un gráfico de líneas que representa la reparación de los CPD inducidos por UV en las células HCT116 infectadas con un adenovirus de control o un adenovirus que codifica un fragmento CUL4 dominante negativo (DN):

La FIG. .es un diagrama que representa la cinta de interfaz de interacción DDB1-CUL4A, en el que los 8 residuos en la región de  $\beta$ -hélice DDB1-BPB (es decir, A400, I402, L404, V443, E537, W561, I587, y R589) que hacen contacto directo con CUL4A se indican

50 Higo. 13 es un diagrama esquemático de la pantalla (AlphaScreen Platform <sup>TM</sup>, adaptado de PerkinElmer) para identificar sustancias capaces de modular la interacción entre CUL4A y DDB1.

FIG. Higo. 14 es un diagrama esquemático de la pantalla de la biblioteca de presentación en fagos para identificar moduladores peptídicos de la interacción entre CUL4A y DDB1.

### **Descripción detallada de la invención**

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el complejo la DDB1-CUL4A ubiquitina ligasa es una diana celular importante para la prevención e intervención en la enfermedad.

5 En el presente documento se divulga un procedimiento para prevenir o tratar una afección asociada con daños en el ADN en un animal, procedimiento que comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad eficaz de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A, de modo que se previene o trata una afección asociada con daños en el ADN en el animal.

10 Los términos "prevención o tratamiento", "tratar", "tratamiento", "terapia" y "tratamiento terapéutico" como se usan en el presente documento se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica o la terapia preventiva. Un ejemplo de "terapia preventiva" es la prevención o disminución de la probabilidad de adquirir una enfermedad específica (por ejemplo, cáncer u otra enfermedad proliferativa) o afección relacionada con el mismo. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen aquellos animales que ya padecen la enfermedad o afección, así como los animales propensos a sufrir la enfermedad o afección que debe prevenirse. Los términos "tratar", "tratamiento", "terapia" y "tratamiento terapéutico" como se usa en el presente documento también describen la manipulación y el cuidado de un animal con el fin de combatir una enfermedad o afección relacionada, e incluye la administración de una composición para aliviar los síntomas, efectos secundarios, u otras complicaciones de la enfermedad o afección. El animal puede ser cualquier animal, pero Preferentemente es un mamífero. En una realización de la invención, el mamífero es un ratón u otro mamífero experimental. En otra realización, el mamífero es un ser humano.

20 La expresión "daños en el ADN" es conocida por los expertos en la materia y hace referencia a cualquier alteración en una molécula de ADN con respecto a su estado nativo. Ejemplos de daños en el ADN incluyen, entre otros, apareamiento erróneos de bases, alteraciones espontáneas en la química de las bases del ADN (por ejemplo, desplazamientos tautoméricos y desaminación), pérdida de bases (es decir, la despurinización y despirimidinación), lesiones inducidas por radicales de oxígeno y radiación ionizante (por ejemplo, daños en la timina debido al ataque de C-5 = C-6 dobles enlaces y roturas en la hebra de ADN), lesiones inducidas por la radiación UV (por ejemplo, fotoproductos dímeros de pirimidina ciclobutano y pirimidina-pirimidona (6-4)) y lesiones inducidas por sustancias químicas (por ejemplo, alquilación y entrecruzamientos inter o intra-hebras) (Friedberg y Siede, Reparación de ADN y mutagénesis, ASM Press, Washington, DC (1995)).

30 Las expresiones "afección asociada con daños en el ADN" o "enfermedad asociada con daños en el ADN" se refieren a cualquier afección o enfermedad en la que los daños en el ADN es un factor causal o contribuyente. En una realización, la afección asociada con daños en el ADN es el cáncer. El cáncer puede ser el resultado de un tumor generalmente se encuentra en los seres humanos u otros mamíferos o un tumor que surge como resultado de la inoculación, tal como en los mamíferos experimentales. Los tumores, como es sabido, incluyen una masa anormal de tejido que resulta de la división celular descontrolada y progresiva, y también se conoce típicamente como "neoplasia". En seres humanos se encuentran muchos tipos de cáncery otras afecciones animales, y no hay intención de limitar la aplicación de los procedimientos de la invención a cualquier tipo o variedad de cáncer en particular. Los procedimientos de la invención son útiles para las células tumorales y las células estromales asociadas, tumores sólidos y tumores asociados con los tejidos blandos, tales como, sarcoma de tejidos blandos, por ejemplo, en un ser humano. El tumor o cáncer pueden localizarse en la piel (por ejemplo, melanoma), la cavidad oral, la faringe, el sistema respiratorio, el sistema digestivo, los huesos, las articulaciones (por ejemplo, metástasis ósea), los tejidos blandos, las mamas, el sistema genital, el sistema urinario, los ojos, la órbita, el cerebro (por ejemplo, glioma), el sistema nervioso central o el sistema endocrino (por ejemplo, el tiroides), y no es necesariamente el tumor o cáncer primario. Los tejidos asociados con la cavidad oral incluyen, entre otros, la lengua y los tejidos de la boca. El cáncer puede surgir en tejidos del sistema digestivo, incluyendo, por ejemplo, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el colon, el recto, el ano, el hígado, la vesícula biliar y el páncreas. Los cánceres del sistema respiratorio pueden afectar a la laringe, los pulmones y los bronquios, e incluyen, por ejemplo, carcinoma de pulmón amicrocítico. Los tumores pueden surgir en el cuello uterino, el cuerpo uterino, los ovarios, la vulva, la vagina, la próstata, los testículos y el pene, que componen los sistemas genitales masculinos y femeninos, y la vejiga urinaria, el riñón, la pelvis renal y el uréter, que comprenden el sistema urinario. El tumor o cáncer pueden localizarse en la cabeza y / o cuello (por ejemplo, cáncer de laringe y cáncer de paratiroides). El tumor o cáncer también se puede localizar en el sistema hematopoyético o el sistema linfoide, e incluyen, por ejemplo, linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin), mieloma múltiple o leucemia (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, y similares). Preferentemente, el tumor o el cáncer se encuentra en la piel, la cavidad oral, la garganta, los pulmones o el hígado. Más preferentemente, el tumor o cáncer está localizado en la piel.

55 En otra realización de la invención, la afección asociada con daños en el ADN es una enfermedad hereditaria humana o un modelo animal experimental de una enfermedad hereditaria humana. Ejemplos de enfermedades hereditarias humanas que pueden tratarse de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, entre otros, xeroderma pigmentoso, síndrome de Cockayne, tricotodistrofia, anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia (síndrome de Louis-Bar) y síndrome de Bloom. Preferentemente, la enfermedad hereditaria humana es xeroderma pigmentoso.

60 En otra realización más de la invención, la afección asociada con daños en el ADN es el envejecimiento. El

snvejecimiento incluye el proceso natural de envejecimiento en un animal (por ejemplo, un ser humano), así como un envejecimiento acelerado que se produce en un animal (por ejemplo, un ser humano) que tiene una mutación hereditaria en uno o más genes que regula el proceso de envejecimiento. Una causa principal del proceso de envejecimiento en animales es el daño somático causado por los efectos de las especies reactivas del oxígeno en el ADN celular. Se sabe que las especies reactivas de oxígeno producen una miriada de lesiones del ADN tales como modificaciones de bases, roturas en el ADN mono o icatenario y entrecruzamientos entre cadenas (Hasty et al., Science, 299: 1355-1359 (2003)). De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la actividad de reparación del ADN en un animal, evitando o tratando de este modo el envejecimiento.

En todavía otra forma de realización de la invención, la afección asociada con daños en el ADN es la exposición prolongada a la radiación UV. Como se ha tratado en lo que antecede, es bien sabido que la radiación UV induce dímeros de pirimidina ciclobutano y pirimidina-pirimidona (6-4) en el AND como fotoproductos. Otros tipos de daños en el ADN causados por la radiación UV incluyen, sin limitación, lesiones complejas que afectan a las purinas (por ejemplo, dehidrodímero 8,8-adenina), hidratos de pirimidina (por ejemplo, 5,6-dihidro-6-hidroxi-citosina), glicoles de timina, y roturas de la cadena (Friedberg y Siede, DNA Repair and Mutagenesis,, ASM Press, Washington, DC.(1995)). Por consiguiente, la invención también proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la actividad de reparación del ADN en un animal de modo que se prevenga o trate una afección asociada con la exposición prolongada a la radiación UV.

En aún otra realización de la invención, la afección asociada con daños en el ADN es la exposición a un carcinógeno químico. Como se ha tratado en lo que antecede, se sabe que los carcinógenos químicos causan diversas lesiones en el ADN, incluyendo, sin limitación, alquilación, reticulaciones inter o intra-hebras y la formación de aductos. Un experto en la técnica conoce muchos carcinógenos químicos comunes y está familiarizado con las bases de datos que contienen información sobre la carcinogenicidad de un producto químico determinado (por ejemplo, The Carcinogenic Potency Project mantenido por la University of California-Berkeley y el National Toxicology Program mantenido por el United States Department of Health and Human Services). Además, un experto en la técnica es consciente de los procedimientos para evaluar la carcinogenicidad de un producto químico determinado (por ejemplo, la prueba de Ames). Por consiguiente, la invención también proporciona procedimientos y composiciones para mejorar la actividad de reparación del ADN en un animal, de modo que se previene o trata una afección asociada con la exposición prolongada a un carcinógeno químico. En una realización, el agente carcinógeno químico es el humo del tabaco. En otra realización, el agente carcinógeno químico es la aflatoxina.

La invención también abarca composiciones y procedimientos para mejorar la actividad de reparación del ADN en un animal que ha sido expuesto a quimioterapia o radioterapia. Aunque el objetivo principal de la quimioterapia o la radioterapia es inducir daños en el ADN de las células cancerosas para detener su crecimiento y producir a muerte celular o, puede ser deseable mejorar simultáneamente la reparación del ADN en células no cancerosas en el animal expuesto a quimioterapia o radioterapia. Un experto conoce productos químicos quimioterapéuticos que inducen daños en el ADN. Ejemplos de tales productos químicos incluyen, sin limitación, derivados de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, y oxaliplatino), mostazas de nitrógeno (por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida y clorambucilo) y nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina y etilnitrosourea).

Por "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad que alivia (hasta cierto punto, según un médico experto) uno o más síntomas de la enfermedad o afección en un animal. Además, por "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad que devuelve a la normalidad, ya sea parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de una enfermedad o afección. Un médico experto en la técnica puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición para tratar o prevenir un estado de enfermedad o trastorno particular cuando se administra. La cantidad exacta de la composición requerida para ser terapéuticamente eficaz dependerá de numerosos factores, por ejemplo, la actividad específica de la sustancia activa, el dispositivo de administración empleado, las características físicas de la sustancia, la finalidad de la administración, además de muchas consideraciones específicas relacionadas con el paciente. La determinación de la cantidad de una composición que debe administrarse para que sea una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz es de rutina en la técnica y dentro de la habilidad de un médico experto en la materia.

Por "administración" o "administrado" se quiere decir que la sustancia se administra a un animal que lo necesite. La vía de administración puede ser tópica, oral, intranasal, parenteral, enteral, rectal u ocular. En una realización preferida de la invención, la sustancia se administra por vía tópica.

La invención proporciona el uso de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "sustancia", "compuestos", y "agente terapéutico" se refieren a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células animales (especialmente mamíferos) o tejidos que se sospecha que tienen propiedades terapéuticas. La sustancia, compuesto o agente terapéutico puede estar purificada, sustancialmente purificada o parcialmente purificada.

En una realización, la sustancia es un polinucleótido. Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" tal como se

utiliza en el presente documento se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN). Estos términos se refieren a la estructura primaria de la molécula y, por lo tanto, incluyen ADN mono y bicatenario, y ARN mono y bicatenario. Los términos incluyen, como equivalentes, análogos de ARN o ADN hechos de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados tales como, entre otros, polinucleótidos metilados y / o protegidos en su extremo. Análogos de nucleótidos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6,107,094 y las referencias en la misma.

El término "nucleótido" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una unidad monomérica de un polinucleótido que consta de una base heterocíclica, un azúcar, y uno o más grupos fosfato. Las bases de origen natural (guanina, (G), adenina (A), citosina, (C), timina, (T) y uracilo (U)) son típicamente derivados de purina o pirimidina, aunque se debe entender que también están incluidos los análogos de bases tanto de origen natural como no natural. El azúcar natural es la desoxirribosa pentosa (azúcar de cinco carbonos) (que forma ADN) o ribosa (que forma ARN), aunque se debe entender que también están incluidos los análogos de azúcar tanto de origen natural como no natural. Los ácidos nucleicos están típicamente unidos a través de enlaces de fosfato para formar ácidos nucleicos o polinucleótidos, aunque en la técnica se conocen muchas otras uniones (por ejemplo, fosforotioatos, boranofosfatos y similares). Los procedimientos de preparación de polinucleótidos están dentro de la experiencia ordinaria en la técnica (Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)).

El polinucleótido es una molécula de ácido nucleico inhibidora, seleccionado de un ARN de interferencia pequeño (ARNsi), un ARN de horquilla corta (ARNsh), un oligonucleótido antisentido, un aptámero, o una ribozima. En una realización preferida, el polinucleótido es un siARN o una molécula de ARNsh.

Un "ARN de interferencia pequeño" o "ARN de interferencia corto" o "siARN" o "ARN de horquilla corta" o "ARNhc" es una molécula de ARN de doble cadena que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, CUL4ARNm, y que es capaz de participar en la degradación del ácido nucleico específico de la diana. Una molécula de ARN de doble cadena está formada por el apareamiento complementario entre una primera porción de ARN y una segunda porción de ARN. La longitud de cada porción generalmente es de menos de 30 nucleótidos (por ejemplo, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, o 10 nucleótidos). En algunas realizaciones, la longitud de cada porción de ARNsi o ARNsh es de 19 a 25 nucleótidos. En algunas moléculas de ARNsi, las porciones primera y segunda complementarias de la molécula de ARN son los "ejes" de una estructura de horquilla, generando de ese modo una molécula de ARNsh. Las dos partes pueden estar unidas por una secuencia de unión, que puede formar el "bucle" en la estructura de horquilla. La secuencia de unión puede variar de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de unión puede tener 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13 nucleótidos de longitud. Una secuencia de unión representativa es 5'-TTCAGAAGG-3', pero se puede usar cualquiera de un número de secuencias para unirse a las porciones primera y segunda. Las porciones primera y segunda son complementarias pero pueden no ser completamente simétricas, ya que la estructura de horquilla puede contener nucleótidos que sobresalgan en 3' o 5' (por ejemplo, un saliente de 1, 2, 3, 4, o 5 nucleótidos).

Existen criterios bien establecidos para el diseño de ARNsis o ARNshs (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *Nature*, 411: 494-8 (2001); Amarzguioui et al., *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 316 (4): 1050-8 (2004); Reynolds et al., *Nat. Biotech.*, 22 (3): 326-30 (2004); Brummelkamp et al., *Science*, 296: 550-553 (2002)). La secuencia de cualquier candidato a ARNsi o a ARNsh generalmente se comprueba para determinar la posibilidad de reactividad cruzada con otras secuencias de ácido nucleico utilizando un programa adecuado para alinear el ARNsi o ARNsh con las secuencias de ácido nucleico contenidas en una base de datos genómica tales como GenBank o Ensembl. Por lo general, se generará una serie de ARNsis o ARNshs y se cribarán con el fin de comparar sus eficacias.

El ARNsi o ARNsh de la invención pueden generarse mediante cualquier procedimiento incluyendo, entre otros, transcripción *in vitro*, producción recombinante en una célula huésped, o medios químicos sintéticos. En una realización, el ARNsi o ARNsh se genera mediante transcripción *in vitro* e un molde oligonucleotídico de ADN utilizando una enzima recombinante, tal como la ARN polimerasa de T7. En otra realización, el ARNsi o ARNsh se prepara de forma recombinante en células cultivadas, que pueden ser procariontes o eucariontes. Los procedimientos de preparación de ARNsi y ARNsh son bien conocidos para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Elbashir et al. *Nature*, 411: 494-8 (2001); Brummelkamp et al., *Science*, 296: 550-553 (2002); y Lee et al., *Nat.Biotech.*, 20: 500-5 (2002)).

Un "aptámero" o "ligando de ácido nucleico" o "anticuerpo de ácido nucleico" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico de origen no natural que tiene una acción deseable sobre una diana (por ejemplo, CUL4A). Las acciones deseables incluyen, entre otras, la unión de la diana, cambiar catalíticamente la diana, reaccionar con la diana de manera que modifica / altera la diana o la actividad funcional de la diana, la unión covalente a la diana como en inhibidor del suicidio y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En una realización preferida, la acción deseable es la afinidad de unión específica por un complejo que comprende CUL4A, en el que la unión del aptámero, el ligando de ácido nucleico o el anticuerpo de ácido nucleico se produce a través de un mecanismo que depende predominantemente del apareamiento de bases de Watson / Crick o la unión de triple hélice.

Los aptámeros incluyen ácidos nucleicos que se identifican a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos, en la que el ácido nucleico es un ligando de una diana dado (por ejemplo, CUL4A), mediante el procedimiento que comprende (a) poner en contacto la mezcla candidata con la diana, en la que los ácidos nucleicos que tienen mayor afinidad por la diana en relación con la mezcla de candidatos puede extraerse del resto de la mezcla candidata; (b) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla candidata; y (c) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos mediante la cual se pueden identificar ligandos de ácido nucleico del compuesto diana. Este procedimiento de identificar aptámeros candidatos, conocidos como Evolución Sistemática de Ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX), es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.270.163 y 5.475.096).

Un "oligonucleótido antisentido" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos específica (es decir, la secuencia diana "sentido") y que es capaz de hibridarse con la secuencia diana (por ejemplo, CUL4AARNm). Un oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender ADN, ARN, o mezclas de los mismos. Un oligonucleótido antisentido puede tener un 100% de complementariedad de secuencia con la secuencia diana o cercana (por ejemplo, 75% o más, 85% o más, o 95% o más). Un oligonucleótido antisentido de la invención puede funcionar produciendo reducción en los niveles de ARNm diana a través de la acción de una endonucleasa, mediante el bloqueo o la inhibición de la traducción del ARNm diana, o por inhibición de la transcripción del gen diana. Un oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender ácidos nucleicos con modificaciones en la base, el azúcar y / o los grupos fosfato como se ha descrito en lo que antecede. Procedimientos para preparar un oligonucleótido antisentido son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Crooke y Bennett, *Annu.Rev.Pharmacol.. Toxicol*, 36: 107-129 (1996), y la patente de EE.UU. 6.107.094).

Una "ribozima" se refiere a una molécula de ARN capaz de catalizar una reacción química, tal como la escisión repetida de otras moléculas de ácido nucleico distintas (es decir, que tiene actividad endonucleasa) de una manera específica de la secuencia de bases nucleotídicas. Una ribozima tal con actividad endonucleasa puede tener complementariedad en una región de unión al sustrato a un gen diana específico (por ejemplo, CUL4A), y también tiene una actividad enzimática que escinde específicamente ARN o ADN en esa diana. Es decir, la ribozima con la actividad endonucleasa es capaz de escindir intermolecularmente o intramolecularmente ARN o ADN y, por lo tanto, inactivar una molécula de ARN o de AND diana. Esta complementariedad funciona permitiendo una hibridación suficiente de la ribozima con el ADN o AND diana para que se pueda producir la escisión. El grado de complementariedad entre una ribozima de la invención y un ARN o ADN diana puede ser 50% o más, 75% o más, 90% o más, o 95% o más. Preferentemente, el grado de complementariedad es del 100%. Una ribozima de la invención puede comprender ácidos nucleicos que están modificados en la base, el azúcar y / o los grupos de fosfato, como se ha descrito en lo que antecede. Procedimientos para preparar ribozimas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.987.071 y 6.617.438; Robertson y Joyce, *Nature*, 344: 467-468 (1990)).

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos. La proteína, polipéptido o péptido pueden ser de longitud completa o ser un fragmento. El término "fragmento" se refiere a una porción más corta de una proteína de longitud completa de tamaño variable desde cuatro restos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa menos un residuo de aminoácido. En ciertas realizaciones de la invención, un fragmento se refiere a la secuencia entera de aminoácidos de un dominio de una proteína (por ejemplo, región  $\alpha$ -helicoidal N-terminal de CUL4A o el dominio de  $\beta$ -hélice BPB de DDB1). Las proteínas, polipéptidos, péptidos y fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante síntesis química o por tecnología de ADN recombinante usando procedimientos dentro de la experiencia ordinaria en la técnica (Benoiton, *Chemistry of Peptide Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, Florida (2006); Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)).

En ciertas realizaciones de la invención, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEC ID N° 7 o Lla SEC ID N° 18.

La sustancia puede ser un análogo polipeptídico. El término "análogo" como se usa en el presente documento en referencia a un polipéptido incluye cualquier polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica citada en el presente documento, en la que uno o más residuos se han sustituido de manera conservadora por un residuo funcionalmente similar y que muestra la actividad de la secuencia polipeptídica parental como se divulga en el presente documento. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro; la sustitución de lisina por arginina y viceversa de tal manera que se mantiene una carga positiva; la sustitución de ácido glutámico por ácido aspártico y viceversa de tal manera que se mantiene una carga negativa; la sustitución de serina por treonina de tal manera que se mantiene un -OH libre; y la sustitución de glutamina por asparagina de tal manera que se mantiene un -NH<sub>2</sub> libre.

La sustancia puede ser un "derivado químico" de un polipéptido. El término "derivado químico" como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más residuos químicamente derivatizados mediante la reacción de un grupo lateral funcional. Además de las derivaciones del grupo lateral, un derivado químico puede tener una o más modificaciones del esqueleto, incluyendo sustituciones  $\alpha$ -amino tales como N-metilo,



N-etilo, N-propilo, y similares, y sustituciones  $\alpha$ -carbonilo tales como tioéster, tioamida, guanidina, y similares. Tales moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que los grupos amino libre se han derivatizados para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres, o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar derivados de O-acilo o de O-alquilo. El nitrógeno imidazol de la histidina puede derivarse para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados químicos los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: la 4-hidroxi prolina se puede sustituir por prolina; la 5-hidroxilisina se puede sustituir por lisina; la 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; la homoserina se puede sustituir por serina; y la ornitina se puede sustituir por lisina. Los polipéptidos de la invención también incluyen cualquier polipéptido que tiene una o más adiciones y / o deleciones o residuos respecto a la secuencia de un polipéptido cuya secuencia se cita en el presente documento, siempre y cuando se mantenga la actividad requerida.

La sustancia puede ser un homólogo de las secuencias de polinucleótidos y de polipéptidos citados en la presente memoria. El término "homólogo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o un polipéptido que comprende una secuencia con una homología de al menos aproximadamente un 80% con la secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente, preferentemente con una homología de al menos aproximadamente un 90% con la secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente, incluso más preferentemente con una homología de al menos aproximadamente un 95% con la secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente, incluso más preferentemente con una homología de al menos aproximadamente un 99% homóloga con la secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente. Por "secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente" se quiere decir, las secuencias que se alinean con la secuencia de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica correspondiente en la que la región de alineación tiene al menos aproximadamente 10 residuos (es decir, nucleótidos o aminoácidos) de longitud, al menos aproximadamente 15 residuos de longitud, al menos aproximadamente 20 residuos de longitud, al menos aproximadamente 30 residuos de longitud, al menos aproximadamente 40 residuos de longitud, al menos aproximadamente 50 residuos de longitud o al menos aproximadamente 100 residuos de longitud. En la materia de biotecnología se conocen varios procedimientos de alineación de secuencia (véase, por ejemplo, Rosenberg, BMC Bioinformatics 6: 278 (2005); Altschul et al, J. FEBS 272 (20): 5101-5109 (2005)).

La expresión "interfiere con la actividad de" se refiere a la capacidad de una sustancia para inhibir la expresión y / o actividad de una molécula(s) diana. La inhibición de la expresión puede producirse en el ARNm o el a nivel de proteína y puede ser el resultado de la disminución de la síntesis, el aumento de la degradación, o ambos. La inhibición de la actividad se refiere a una función bioquímica o biológica de la(s) molécula (s) diana. El grado de inhibición puede ser parcialmente completa (por ejemplo, 10% o más, 25% o más, 50% o más, o 75% o más), sustancialmente completa (por ejemplo, 85% o más, 90% o más, o 95 % o más), o totalmente completa (por ejemplo, 98% o más, o 99% o más).

CUL4A es una ubiquitina ligasa que funciona como un componente de un complejo multimérico en el que el extremo C de CUL4A interacciona con la proteína de tipo dedo RING Rbx1 / ROC1 / HRT1 (denominado en lo sucesivo Rbx1) para reclutar la enzima de conjugación con ubiquitina E2, y el extremo N de CUL4A interacciona con DDB1. DDB1, a su vez, actúa como un adaptador, uniéndose a los factores asociados DDB1, CUL4A (DCAF), que sirven como receptores de sustrato específicos (Angers et al., Nature, 443: 590-593 (2006); He et al, Genes Dev, 20: 2949-2954 (2006); Higa et al, Nat Cell Biol., 8: 1277-1283 (2006); Jin et al., Mol.Cell, 23: 709-721 (2006); Lee y Zhou, Mol.Cell, 26: 775-780 (2007)). Sustratos para la ubiquitinación mediante complejos que contienen CUL4A incluyen c-Jun, DDB2, XPC, y p21 (Li et al, Cell, 124: 105-117 (2006); Nishitani et al., J. Biol. Chem, 283: 29045-52 (2008)).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "interfiere con la actividad de CUL4A" se refiere a la capacidad de una sustancia para inhibir la expresión y / o la función bioquímica o biológica de CUL4A. Ejemplos de funciones bioquímicas de CUL4A incluyen, sin limitación, la unión a DDB1, la unión a Rbx1, y que tiene actividad de ubiquitina ligasa (por ejemplo, ubiquitinación y desestabilización p21, ubiquitinación y desestabilización de DDB2 y ubiquitinación y desestabilización de XPC). En una realización, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A interrumpe la unión de CUL4A unión a la proteína 1 de unión al ADN dañado (DDB1). Preferentemente, la sustancia interrumpe la interacción de la región  $\alpha$ -helicoidal en N-terminal de CUL4A con el dominio propelente en de hélice  $\beta$ -BPB de DDB1. La sustancia que altera la unión de CUL4A a DDB1 puede interaccionar directamente con CUL4A y / o DDB1 o actuar indirectamente mediante la unión a otro componente de un complejo que contiene CUL4A- DDB1.

En una realización, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A inhibe competitivamente la unión de una CUL4A endógena a DDB1 en un animal. El inhibidor competitivo es un polipéptido que comprende un fragmento de CUL4A. El fragmento de CUL4A comprende la región N-terminal de CUL4A (SEC ID N° 7 o SEC ID N° 18) o un análogo, homólogo, derivado o fragmento de la misma que funciona de manera similar a la región N-terminal de CUL4A (SEC ID N° 7 o SEC ID N° 18).

Ejemplos de funciones biológicas de CUL4A incluyen, sin limitación, la regulación de la proliferación celular, la supervivencia celular, la reparación del ADN y la integridad genómica (Lee y Zhou. Mol.Cell, 26: 775-780 (2007)). En

una realización preferida, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A provoca un aumento en la actividad de reparación del AND. En una realización particularmente preferida, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A provoca un aumento en la actividad de reparación por escisión de nucleótidos, y de este modo previene o trata una afección asociada con daños en el ADN en el animal.

- 5 Ya sea que la sustancia interfiere con la expresión de CUL4A o con una función bioquímica o biológica de CUL4A, el grado de inhibición puede ser parcialmente completo (por ejemplo, 10% o más, 25% o más, 50% o más, o 75% o más), sustancialmente completa (por ejemplo, 85% o más, 90% o más, o 95% o más), o totalmente completa (por ejemplo, 98% o más, o 99% o más).

- 10 En el presente documento también se describen composiciones que comprenden (a) la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A y (b) un vehículo. El vehículo será típicamente líquido, pero también puede ser sólido, o una combinación de componentes líquidos y sólidos. Es deseable que el vehículo sea fisiológicamente aceptable (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente, farmacológicamente, o cosméticamente aceptable) (por ejemplo, excipiente o diluyente). Cualquier vehículo fisiológicamente aceptable adecuado puede usarse en el contexto de la invención, y tales vehículos son bien conocidos en la técnica. La elección del vehículo se determinará, al menos en parte, mediante la localización de los tejidos y / o células diana y el procedimiento particular usado para administrar la composición.

- 15 La composición puede comprender además otros componentes adecuados, especialmente para potenciar la estabilidad de la composición y / o su uso final. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición de la invención. Las siguientes formulaciones y procedimientos son meramente ilustrativas y no son en modo alguno limitantes.

- 20 Las composiciones que comprenden moléculas de ácido nucleico típicamente requieren componentes adicionales para facilitar o mejorar la liberación intracelular debido al tamaño relativamente grande, la susceptibilidad a la degradación por enzimas endógenas y la carga negativa de las moléculas de ácido nucleico. Ejemplos de componentes adecuados incluyen, entre otros, liposomas, polímeros catiónicos y nanopartículas. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico puede estar conjugada, por ejemplo, en sus extremos 3' o 5', con un péptido rico en arginina, colesterol o un ácido graso para facilitar o potenciar la liberación intracelular. El experto en la materia conoce componentes y conjugados adecuados (véase, por ejemplo, Las patentes de EE.UU. 6.617.438 y 7.402.574; Whitehead et al., Nat. Rev. Drug Disc., 8: 129-138 (2009)).

- 25 Entre las formulaciones adecuadas para administración parenteral se incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas e isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor al que están destinadas, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados para monodosis o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado secado por congelación (liofilizado) que solo requiere la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyectables, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. La formulación para administración parenteral se puede formular para administración intratumoral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección intraocular, inyección subcutánea, y similares.

- 30 Las composiciones adecuadas para administración entérica se formulan usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión por el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante la combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Los excipientes adecuados son cargas de carbohidratos o de proteínas, tales como azúcares, incluidas lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas, incluidas goma arábiga y de tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados tales como soluciones concentradas de azúcar, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y / o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos comprimidos o de grageas para identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosificación.

- 35 Las formulaciones adecuadas para la administración anal o rectal se pueden preparar en forma de supositorios mezclando el principio activo con diversas bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, o fórmulas para pulverización que contienen, además del ingrediente activo, vehículos tal como se

conocen en la técnica como apropiados.

Las formulaciones adecuadas para administración ocular se pueden preparar como inyectables, gotas, aerosoles, o películas mezclando la sustancia activa con diversas coluciones nyectables estériles acuosas y no acuosas isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con el tejido ocular del receptor al que están destinada, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

En una realización preferida de la invención, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A, sola o en combinación con otros componentes adecuados, se convierte en una formulación de aerosol para su administración mediante inhalación. Preferentemente, una sustancia de la invención se suministra en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. Los porcentajes típicos de los compuestos de la invención pueden ser de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20% en peso, preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% en peso. El tensioactivo debe, por supuesto, no ser tóxico y, preferentemente, soluble en el propelente. Representantes de tales agentes tensioactivos son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linoléico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden usar ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% en peso de la composición, preferentemente de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 5%. El resto de la composición suele ser un propelente. Según se desee, también se puede incluir un vehículo, por ejemplo, lecitina, para administración intranasal. Estas formulaciones en aerosol se pueden introducir en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones en aerosol se pueden utilizar, por ejemplo, para pulverizar en la mucosa y pueden ser particularmente preferibles para la prevención o el tratamiento de cánceres del sistema respiratorio ode la cavidad oral y la faringe.

En una realización particularmente preferida, la formulación es una composición de filtro solar que comprende la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A y un vehículo cosméticamente aceptable. Típicamente, una composición de filtro solar es una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite en la que la fase de aceite comprende uno o más compuestos protectores solares, solubilizantes, emulsionantes de silicona, emolientes y otros agentes acondicionadores de la piel cosméticamente aceptables. La fase acuosa es predominantemente agua, pero típicamente comprende ingredientes adicionales tales como agentes humectantes (por ejemplo, pentilenglicol y glicerina), conservantes y espesantes. Los componentes adicionales tales como fragancias, colorantes y extractos pueden añadirse a cualquiera de las fases o a la emulsión después de su preparación. Del mismo modo, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A de la invención se puede añadir a la fase oleosa, la fase acuosa, o después de la preparación de la emulsión en función de de las características fisicoquímicas de la sustancia.

El término "compuesto de filtro solar" se refiere a un compuesto capaz de filtrar la radiación ultravioleta que tiene una longitud de onda de 280 nm - 320 nm (es decir, UV-B) y / o 320 nm-400 nm (es decir, UV-A).El compuesto de filtro solar puede ser uno o más productos químicos orgánicos que absorben la radiación UV, uno o más productos químicos inorgánicos que reflejan, dispersión, o absorben la radiación UV, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de compuestos de protección solar adecuados incluyen, sin limitación, sulisobenzona, dioxibenzona, antranilato de metilo, ácido 4-aminobenzoico (PABA), amil dimetil PABA, octil dimetil PABA, PABA de glicerilo, 2-etoxietilo p-metoxicinamato, diethanolamine p-metoxicinamato, etilhexil p -methoxycinnamate, trioleato de digaloiolo, 4-bis (hidroxipropil) aminobenzoato de etilo, 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenil-acrilato, salicilato de 2-etilhexilo, salicilato de homomentilo, salicilato de trietanolamina, ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico, vaselina roja, dióxido de titanio, óxido de zinc, y combinaciones de los mismos.

Adecuadamente, la composición de filtro solar toma la forma de una loción, un aceite, un gel, una barra sólida, un aerosol, o una espuma.Composiciones y procedimientos de preparación de protección solar son bien conocidos para un experto normal en la técnica y se describen en, por ejemplo, Las patentes de EE.UU. 5,587,150; 5,770,183; y 6,033,649.

En el presente documento se divulga también procedimiento de prevención o tratamiento de una afección asociada con daño en el ADN en un animal, procedimiento que comprende administrar a un animal que lo necesite una cantidad eficaz de una composición de filtro solar que comprende una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A y un cosméticamente aceptable vehículo, prevenir o tratar una afección asociada con el daños en el ADN en el animal de ese modo.En una realización, la composición de filtro solar de la invención se administra antes de la exposición a la radiación UV.Deseablemente, la composición de filtro solar se administra 10 minutos o más, 20 minutos o más, 30 minutos o más, o 60 o más minutos antes de la exposición a la radiación UV para prevenir o atenuar el daños en el ADN.En otra realización, se administra la composición de filtro solar durante la exposición a la radiación UV para prevenir o atenuar el daños en el ADN o para mejorar la reparación del ADN.En aún otra realización, la composición de filtro solar se administra después de que el animal se expone a la radiación UV.Deseablemente, la composición de filtro solar se aplica 30 minutos o menos, 1 hora o menos, 4 horas o menos, 12 horas o menos, o 24 horas o menos después de la exposición a la radiación UV con el fin de mejorar la

reparación del ADN.

En el presente documento se divulga es también un procedimiento de co-administración de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A con un agente quimioterapéutico a un animal que lo necesite. Por "co-administración" se entiende la administración del agente quimioterapéutico y la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A suficientemente cerca en el tiempo de tal manera que la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A puede mejorar la eficacia del agente quimioterapéutico. En este sentido, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A se puede administrar primero y el agente quimioterapéutico se puede administrar segundo o viceversa. Alternativamente, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A y el agente quimioterapéutico puede administrarse simultáneamente.

Cualquier clase de agente quimioterapéutico puede ser co-administrado con la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A, incluyendo, sin limitación, un agente antimicrotubular, un antimetabolito, un antimitótico, un agente que daña el ADN, un proapoptótico, un agente inductor de la diferenciación, un antibiótico, una hormona, y cualquier combinación de los mismos. Agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, entre otros, inhibidores de tirosina quinasa (genisteína), agentes biológicamente activos (TNF, o iTF), radionucleidos (<sup>131</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In, <sup>211</sup>At, <sup>32</sup>P y otros radionúclidos terapéuticos conocidos), adriamicina, antibióticos ansamicina, asparaginasa, bleomicina, busulfán, cisplatino, carboplatino, carmustina, la capecitabina, el clorambucil, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, etopósido, epotilones, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, mephalan, metotrexato, la rapamicina (sirolimus) y derivados, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosurea, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazona, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxol, combretastatinas, discodermolidas, transplatinum, compuestos de factor de crecimiento endotelial vascular ("anti-VEGF") compuestos de receptores, anti-factor de crecimiento epidérmico ("anti-EGFR"), 5-fluorouracilo, y similares. Una dosis de uno o más agentes quimioterapéuticos se pueden administrar de acuerdo con el procedimiento de la invención. El tipo y número de agentes quimioterapéuticos usados en el procedimiento de la invención dependerán del régimen quimioterapéutico estándar para un determinado tipo de tumor. En otras palabras, mientras que un cáncer particular se puede tratar rutinariamente con un solo agente quimioterapéutico, otro se puede tratar rutinariamente con una combinación de agentes quimioterapéuticos. El agente quimioterapéutico se administra en una dosis suficiente para tratar el cáncer (por ejemplo, el tratamiento del cáncer cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico). Un médico experto en la técnica puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición para tratar o prevenir un estado de enfermedad particular, o trastorno cuando se administra.

En el presente documento se divulga también un procedimiento para identificar una sustancia que modula la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A, procedimiento que comprende (a) combinar un polipéptido CUL4A, un polipéptido DDB1, y una sustancia de ensayo, en condiciones que favorecen la formación de un complejo-CUL4A DDB1, (b) medir la cantidad de complejo CUL4A-DDB1 formada bajo las condiciones de (a), y (c) comparar la cantidad de complejo formado CUL4A-DDB1 como se mide en (b) en presencia de una sustancia de ensayo a la cantidad Complejo CUL4A DDB1 formado según se mide en (b) en ausencia de una sustancia de ensayo, con lo que una diferencia es indicativa de la capacidad de la sustancia de ensayo para modular la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A.

El modulador de la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A a ser identificado por el procedimiento de la invención puede ser un regulador positivo, es decir, una sustancia que aumenta la actividad de ubiquitina ligasa de CUL4A. El modulador puede aumentar la actividad de ubiquitina ligasa de CUL4A en aproximadamente 1,5 veces o más, alrededor de 2 veces o más, aproximadamente 3 veces o más, aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 10 veces o más, aproximadamente 15 veces o más, o aproximadamente 20 veces o más, en comparación con la actividad de ubiquitina ligasa en ausencia del modulador.

El modulador de CUL4A puede ser un regulador negativo, es decir, una sustancia que disminuye, inhibe, o interfiere con la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento de identificación de una sustancia que interfiere con la actividad de ubiquitina ligasa de CUL4A, procedimiento que comprende (a) combinar un polipéptido CUL4A, un polipéptido DDB1, y una sustancia de ensayo, bajo condiciones que favorecen la formación de un CUL4A -DDB1 complejo, (b) medir la cantidad de complejo CUL4A-DDB1 formada bajo las condiciones de (a), y (c) comparar la cantidad de complejo formado CUL4A-DDB1 como se mide en (b) en presencia de una sustancia de ensayo a la cantidad de complejo formado CUL4A DDB1 como se mide en (b) en ausencia de una sustancia de ensayo, por lo que una disminución en la cantidad de complejo CUL4A-DDB1 formado en la presencia de una sustancia de ensayo es indicativa de la capacidad de la prueba sustancia que interfiera con la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A.

Deseablemente, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A inhibe la actividad de ubiquitina ligasa en al menos un 25% (por ejemplo, 25% o más, 35% o más, o 45% o más) en comparación con la actividad de ubiquitina ligasa en ausencia de la interferencia sustancia. Preferentemente, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A inhibe la actividad de ubiquitina ligasa en al menos un 50% (por ejemplo, 50% o más, 60% o más, o 70% o más) en comparación con la actividad de ubiquitina ligasa en ausencia de la interferencia sustancia. Lo más Preferentemente, la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A inhibe la actividad de ubiquitina ligasa en al

menos 75% (por ejemplo, 75% o más, 85% o más, o 95% o más) en comparación con la actividad de ubiquitina ligasa en ausencia de la sustancia de interferencia.

Los procedimientos para el cribado de sustancias capaces de modular una interacción proteína-proteína son bien conocidos para un experto normal en la técnica. Por ejemplo, la sustancia de ensayo puede ser examinada para la capacidad de modular un complejo de CUL4A DDB1 usando ensayos reconocidos en la técnica tradicionales tales como ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), punto de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISPOT), radioinmunoensayo, o BIACORE ensayos, que permiten para la determinación de las afinidades de unión en presencia y ausencia de una sustancia de ensayo. Preferentemente, la detección se produce en una placa de múltiples pocillos como parte de una pantalla de alto rendimiento. Ensayos de selección adecuados se describen en más detalle en los Ejemplos.

El polipéptido CUL4A puede ser un polipéptido CUL4A de longitud completa (por ejemplo, SEC ID N° 1), o un fragmento de un polipéptido CUL4A de longitud completa. El fragmento de un polipéptido de longitud completa CUL4A puede tener una longitud de 75 aminoácidos o más, 100 o más aminoácidos, 125 aminoácidos o más, o 150 aminoácidos o más. Alternativamente, o además, el fragmento de un polipéptido de longitud completa CUL4A puede tener una longitud de 750 aminoácidos o menos, 600 aminoácidos o menos, 450 aminoácidos o menos, o 300 aminoácidos o menos. Por lo tanto, el fragmento de un polipéptido de longitud completa CUL4A puede tener una longitud limitada por dos cualesquiera de los puntos finales anteriores. Por ejemplo, el fragmento de un polipéptido de longitud completa CUL4A puede tener una longitud de 75-750 aminoácidos, los aminoácidos 150-450, o 125-300 aminoácidos. Deseablemente, el fragmento de un polipéptido de longitud completa CUL4A comprende toda la región N-terminal de  $\alpha$ -helicoidal de CUL4A (por ejemplo, SEC ID N° 7) y / o retiene la capacidad de unirse a un polipéptido DDB1. Fragmentos ejemplares adicionales de un polipéptido de longitud completa CUL4A que comprenden toda la región  $\alpha$ -helicoidal N-terminal de CUL4A y que se unen a un polipéptido DDB 1 incluyen fragmentos que comprenden la SEC ID N° 5 o SEC ID N° 6.

El polipéptido DDB1 puede ser un polipéptido de longitud completa DDB1 de longitud completa (por ejemplo, SEC ID N° 3), o un fragmento de un polipéptido DDB1 de longitud completa. El fragmento de un polipéptido de longitud completa DDB1 puede tener una longitud de 150 aminoácidos o más, 200 o más aminoácidos, 250 aminoácidos o más, o 300 aminoácidos o más. Alternativamente, o además, el fragmento de un polipéptido de longitud completa DDB1 puede tener una longitud de 800 aminoácidos o menos, 600 aminoácidos o menos, o 400 aminoácidos o menos. Por lo tanto, el fragmento de un polipéptido de longitud completa DDB1 puede tener una longitud limitada por dos cualesquiera de los puntos finales anteriores. Por ejemplo, el fragmento de un polipéptido de longitud completa DDB1 puede tener una longitud de 150-800 aminoácidos, los aminoácidos 200-600, o 250-400 aminoácidos. Deseablemente, el fragmento de un polipéptido de longitud completa DDB1 comprende el dominio BPB  $\beta$ -hélice de DDB1 (por ejemplo, SEC ID N° 8) y / o retiene la capacidad de unirse a un polipéptido CUL4A. Preferentemente, el fragmento de un polipéptido de longitud completa DDB1 comprende los residuos de aminoácidos A400, I402, L404, V443, E537, W561, I587, y R589, que han sido identificados como que forman contactos directos con CUL4A (Angers et al. *Nature*, 443: 590-593 (2006); . Li et al, *Cell*, 124: 105-117 (2006)) (Figura 12).

El polipéptido CUL4A y / o el polipéptido DDB1 se pueden vincular a una secuencia de procesamiento o identificación, tal como una etiqueta de purificación de proteínas. Ejemplos de etiquetas de purificación de proteínas adecuados incluyen, entre otros GST, FLAG, y polihistidina. Preferentemente, la etiqueta de purificación de proteínas es GST o FLAG. Más Preferentemente, las etiquetas de purificación de proteínas del polipéptido y el polipéptido CUL4A DDB1 son diferentes.

En una realización preferida del procedimiento de identificación de una sustancia que modula la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A, el polipéptido y el polipéptido CUL4A DDB 1 marcados con diferentes moléculas, y, o bien el polipéptido CUL4A etiquetado o el polipéptido se inmoviliza DDB1 marcado a una esfera donante excitable con láser y el otro del polipéptido CUL4A o el polipéptido DDB1 no se inmoviliza con la esfera donante sino con una esfera aceptora que comprende un derivado de tioxeno capaz de generar quimioluminiscencia en presencia de oxígeno singlete. Una descripción detallada de esta realización se expone en los Ejemplos.

La sustancia de ensayo que modula la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A puede ser cualquier sustancia adecuada. Por ejemplo, la sustancia de ensayo que modula la actividad de ubiquitina ligasa CUL4A puede ser una molécula pequeña (por ejemplo, obtenida a partir de una biblioteca química) o un péptido (tal como se muestra desde la superficie de un fago, por ejemplo, en una biblioteca de presentación en fagos).

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse en modo alguno como limitativos de su ámbito.

### 55 Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la generación de un ratón defectivo en Cul4 (Cul4<sup>-/-</sup>) y compara su fenotipo con un ratón defectivo en Cul4a previamente divulgado.

Para generar el CUL4a alelo floxed, la biblioteca genómica 129 (Invitrogen) se rastreó con una sonda de ADNc. Se identificaron cinco clones de BAC, y el clon nº 297L07 se utilizó para generar la construcción de la orientación final. El vector de orientación se generó mediante la colocación de un sitio LoxP y el casete de resistencia a neomicina pSV-FLP-Cre 1,1 kb aguas arriba del exón 17 y otro sitio LoxP 300 pb aguas abajo del exón 19. Los brazos homólogos en 5' y 3' eran de 3 kb y 5 kb, respectivamente, y se generaron mediante EXL PCR de largo alcance (Stratagene) a partir del clon BAC. Después de la electroporación y la selección de G418, los clones ES que se sometieron a la recombinación homóloga fueron identificados por transferencia Southern. La recombinación homóloga en el extremo 5' se evaluó mediante la digestión de ADN genómico de células ES con BamHI y la hibridación de la transferencia Southern con una sonda inmediatamente aguas arriba del brazo 5' homóloga. El alelo de tipo silvestre produjo una banda de 11 kb, mientras que el alelo dirigido produjo una banda de 7,3 kb debido a un sitio BamHI adicional en el vector pSV-FLP-Cre. La recombinación homóloga en el extremo 3' se determinó por digestión con SacI y tanto PacI, y la hibridación con una sonda inmediatamente aguas abajo del extremo 3' del brazo homólogo. El alelo de tipo salvaje mostró una banda de 9 kb en comparación con una banda de 7 kb en el alelo dirigido. Dos clones positivos (# 379 y # 395) después de la recombinación homóloga se utilizaron para generar ratones quiméricos mediante inyección de blastocisto.

El alelo *Cul4a* eliminado se creó mediante supresión inducida por la línea germinal de los exones 17-19 cruzando ratones *Cul4a floxed* con el la línea transgénica E2A-Cre (Lakso et al., Proc.Natl.Acad.Ciencia.EE.UU., 93: 5.860 a 5865 (1.996)). La transmisión de los loci objetivo se confirmó mediante transferencia de tipo Southern y PCR. Todos los animales mutantes se retrocruzaron a C57BL / 6J durante 12 generaciones.

Análisis de la expresión de proteínas se realizó mediante la extracción de proteínas a partir de tejidos de *Cul4a*<sup>-/-</sup>, *Cul4a*<sup>fl/fl</sup>, o compañeros de camada de tipo salvaje utilizando el CelLytic™ MT tejidos de mamíferos Lisis / reactivo de extracción (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tejidos y extractos MEF se inmunotransfirieron con anticuerpos contra CUL4A (C-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y β-acción (Sigma, St. Louis, MO).

Horquilla corta (sh) ARN para la orientación de genes fueron los siguientes: murino sh-Cul4b fue 5'-GTAGTAACGAGAGAGAAGACT-3' (SEC ID Nº 9); murino sh-Pcid2-1 era 5'-GGCAAAGCACGAGACGTTCTT-3' (SEC ID Nº 10); murino sh-Pcid2-2 era 5'-GATGAAATGTTTGCAGCTCATT-3' (SEC ID Nº 11); sh-p21 murino fue 5'-GAGAACGGTGGAACTTTGACTT-3' (SEC ID Nº 12); revueltos sh-Cul4b era 5'-GTGCGCAGCAATAAATACGGCT-3' (SEC ID Nº 13); y humano SH-Cul4A era 5'-GAAGCTGGTCATCAAGAAC-3' (SEC ID Nº 14). ARNshs se subclonaron en el vector lentiviral FUGW y expresó bajo el promotor U6 (Sui y Shi, Methods Mol.. Biol, 309: 205-218 (2005)). Lentivirus recombinantes se generaron para la infección de MEFs o células HCT116.

El (Δ) mutante CUL4A (delección de los residuos 585 a 727) se generó por dos reacciones de PCR consecutivas y se clonó en el vector pCDNA3 con los siguientes cebadores de PCR: el cebador de PCR corriente arriba era 5'-GCGATATCCGCGGACGAGGGCCCTCG-3' (SEC ID Nº 15); la primera cebador en el sentido era 5'-CATATAGTCTGTCTATAAG TGACTCAATCCTTTTTTCAAATCTCCAGGCTCCTTAAAGTCCGCCTTCAGC-3' (SEC ID Nº 16), y el segundo cebador en el sentido era 5'-GCTCTAGATCATGCCACGT AGTGGTACTGATTTGGACTGTCTTTGTCTCGTTCCATATAGTCTGTCTATAAG-3' (SEC ID Nº 17). La interacción con CUL4A Rbx1 se evaluó en inmunoprecipitados de células 293T transfectadas transitoriamente con un CUL4A MYC-etiquetados o un mutante CUL4A (delección de los residuos 585 a 727) (CUL4A (Δ)), que fue generada por PCR y clonado en el pCDNA3- MYC vector, con o sin co-transfección de Rbx1 bandera de etiquetado. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos anti-Myc, y la posterior transferencia de Western se realizó con anti-FLAG (M2) anticuerpos obtenidos a partir de fuentes comerciales anti-Myc (Ab-1) y.

Para investigar el papel fisiológico de CUL4A en la reparación del ADN y la tumorigénesis, condicionada a ratones defectivos en CUL4 se generaron utilizando la estrategia Cre / lox. Los exones 17-19, que abarcan el sitio de dominio de homología y neddylation cullin esencial, se floxed por recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES) (Figura 1A). Transferencia de Southern confirmó la presencia del objetivo locus *Cul4a* en heterocigotos floxed (f / +) células madre embrionarias (FIG. 1B), y el análisis de PCR identificaron la de tipo salvaje, floxed, y recombinados alelo *Cul4a* en el ADN de la cola del ratón (FIG. 1C). Homocigótica *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> los ratones estaban sanos y fenotípicamente indistinguibles de sus compañeros de camada de tipo salvaje. *Cul4a*<sup>-/-</sup> los ratones fueron generados posteriormente por cruzamiento *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> ratones con ratones E2A-Cre transgénicos (Lakso et al., Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU., 93: 5.860 a 5865 (1.996)), y la ausencia de la proteína de longitud completa CUL4A se confirmó por Western Blot en múltiples tejidos y MEFs (Figura 1D). Un CUL4A truncada C-terminal (CUL4A designado (Δ)) era detectable, pero a niveles marcadamente reducidos (8%) en comparación con la de tipo salvaje CUL4A, y no interactuar con Rbx1 para el reclutamiento de la ubiquitina-conjugación enzima E2 (Figura 1E).

Los ratones *Cul4a*<sup>-/-</sup> descritos en este ejemplo eran viables y no mostraron anomalías del desarrollo abiertas durante toda su vida. Este resultado está en marcado contraste con la letalidad embrionaria de la publicada *Cul4a* exón 1 cepa de delección (Li et al., Mol.Cell Biol., 22: 4997-5.005 (2.002)). Sin embargo, el exón 1 focalización de constructo de Li et al. También suprimió la expresión de la Pcid2gen que reside en el soporte complementario adyacente a *Cul4a* exón 1. Pcid2 codifica una proteína con un dominio PCI, que se conserva entre las subunidades esenciales de la proteasoma 26S, COP9 signalosome, y el factor de iniciación de la traducción 3 complejos (Hofmann y Bucher, Trends Biochem.Sci, 23: 204-205 (1998)). El exón 1 alelo dirigido por Li et al. eliminado una región 529 de base par aguas arriba de la primera Pcid2exón, dejando sólo 4 pares de bases aguas arriba del codón

de iniciación de la traducción ATG (figura 2A). El silenciamiento de *Pcid2* expresión en fibroblastos embrionarios primarios de ratón (MEFs) por lentiviral *Pcid2* horquilla (sh) ARN corto resultó en una rápida pérdida de viabilidad (FIG. 2B). En contraste, la detención del crecimiento o la muerte celular no se observó en *Cul4a*<sup>-/-</sup> MEFs (Figura 3A). Por lo tanto, el fenotipo de letalidad embrionaria observada por Li et al. es probable debido a la derogación de la coincidencia esencial *Pcid2* gen que reside en la cadena complementaria adyacente a *Cul4a*.

En los mamíferos, los dos genes *Cul4* (es decir, *Cul4a* y *Cul4b*) se coprescriben ampliamente y montan ubiquitina ligasas estructuralmente similares. Por lo tanto, CUL4B podría complementar la pérdida de CUL4A y asegurar así la supervivencia de los ratones *Cul4a*<sup>-/-</sup>. En consecuencia, el silenciamiento de *Cul4b* en MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup> ha conducido a una espectacular reducción de la incorporación de BrdU y a la pérdida de viabilidad celular (Figuras. 3A y 3B), en consonancia con lo que previamente se observó con los MEF *Ddb1*<sup>-/-</sup> (Cang et al., Cell, 127: 929-940 (2006)), y de acuerdo con el hecho de que ambas proteínas *Cul4* deben ser inactivadas para abolir la actividad de CUL4 de ubiquitina ligasa (Higa et al., Nat. Cell Biol., 5: 1008-1015 (2003); Hu et al., Nat. Cell Biol., 6: 1003-1009 (2004)).

Este ejemplo demostró la generación de un ratón defectivo en *Cul4* (*Cul4*<sup>-/-</sup>) en el que el locus *Pcid2* no se ha modificado.

## Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la estabilidad mejorada de DDB2, p21, y XPC en células deficientes en *Cul4a*.

Se aislaron MEF del día embrionario (E) 13,5 de tipo salvaje o embriones defectivos en *Cul4a*. Los ARNsh para *Cul4b* y *Pcid2* murinos así como para controles mixtos se subclonaron en el vector lentiviral FUGW y se expresaron bajo el promotor U6 como se describe en el Ejemplo 1. Los sh*Cul4b* y sh*Pcid2* recombinantes de lentivirus se generaron para la infección de células MEF primarias, *Cul4a*<sup>+/+</sup> y *Cul4a*<sup>-/-</sup>. Los ARNsh que contenían el lentivirus FUGW se añadieron a los MEF *Cul4a*<sup>+/+</sup> y *Cul4a*<sup>-/-</sup> cada 12 horas durante 36 horas. Las células se cosecharon 48 horas después de la infección, y se realizó una transferencia de tipo Western en extractos de MEF utilizando anticuerpos contra CUL4A (C-19, Santa Cruz de Biotecnología), CUL-4B, DDB2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), p21 (Santa Cruz Biotechnology), XPC, histona H3, y  $\beta$ -actina (Sigma, St. Louis, MO).

La vida media de DDB2 se determinó por análisis de pulso-caza en *Cul4a*<sup>-/-</sup> y *Cul4c*<sup>+/+</sup> MEFs y cuantificado usando un escáner de imágenes de fósforo. La vida media de p21 se ensayó por ciclohexamida (CHX) en persecución *Cul4a*<sup>-/-</sup> y *Cul4a*<sup>+/+</sup> MEFs y cuantificado por medición de señales de inmunotransferencia, que se trazan en escala logarítmica como una función del tiempo.

La interacción de p21 con componentes del complejo-CUL4A DDB1 se evaluó en inmunoprecipitados de células 293T transfectadas transitoriamente o no transfectadas con un CUL4A con etiqueta myc, DDB1 marcada con HA, GST-etiquetados CDT2, y p21 marcada con FLAG. La inmunoprecipitación y Western Blot posterior se realizó con los anticuerpos adecuados tal como se representa en la figura. 6.

La ubiquitinación XPC se determinó en células HCT116 después de la irradiación UV. HCT 116 células fueron infectadas con sh*Cul4a* lentiviral o FUGW de control durante 48 horas, UV irradió a 10 J / m<sup>2</sup> y se cosecha a 0 h, 0,5 h, 1 h, y 2 horas después de la UV. Los extractos cromatina determinada se prepararon y se sometieron a inmunotransferencia.

Se observaron altos niveles de estado estacionario de la proteína DDB2 en la epidermis de ratones *Cul4a*<sup>-/-</sup> (FIG. 4A) y *Cul4a*<sup>+/+</sup> MEFs (Figura. 4B), y la vida media de DDB2 se prolongó en MEFs primarios derivados de E13.5 *Cul4a*<sup>-/-</sup> embriones como se determina por análisis de pulso-caza (FIG. 4C). Para determinar las contribuciones relativas de CUL4A y CUL4B en la degradación DDB2, lentiviral ARNsh contra ratón *Cul4b* fue generada por la infección de la pronta aprobación (P3) primaria *Cul4a*<sup>+/+</sup> y *Cul4a*<sup>-/-</sup> MEFs. sh*Cul4b* reducido efectivamente más del 93% de CUL4B ratón, sin embargo, tenía sólo un efecto marginal sobre los niveles de DDB2 (FIG. 4b., Figura 5A). En contraste, *Cul4a* defectivo o derogación de ambas *Cul4a* y *Cul4b* resultado en un 3 a 4,5 veces la regulación positiva de la proteína DDB2, pero no ARNm (figura 4B., Figura 5A). Niveles de ARNm DDB2 permanecieron inalterados, o incluso disminuyeron ligeramente en respuesta a *Cul4a* defectivo o *Cul4b* silenciamiento (figura 5A).

La proteína p21, pero no ARNm, también se acumula en piel de *Cul4a*<sup>-/-</sup> (figura 4A., figura 5B) y MEFs primarios (FIG. 4B), como resultado del aumento de la vida media de p21 a la supresión CUL4A (FIG. 4D). El silenciamiento de *Cul4b* por RNAi tenido poco efecto, lo que subraya el papel predominante de CUL4A en el control de la estabilidad no sólo de DDB2 y XPC sino p21 (FIG. 4B). Mientras que la inactivación simultánea de ambos *Cul4a* y *Cul4b* dado lugar a una mayor acumulación de p21, la comparación directa de la degradación de p21 con la de individuo *Cul4a* o *Cul4b* inactivación no se pudo realizar debido a la detención del crecimiento rápido de *Cul4a*<sup>-/-</sup> MEFs en el que *Cul4b* fue derribado (Figuras 3A y 3B). Consistentemente, p21 estaba físicamente presente en el complejo-CUL4A DDB1 por la co-inmunoprecipitación (Figura 6).

XPC es un factor limitante de la velocidad para la etapa de reconocimiento de daños en el ADN de GGR, y también es una diana directa de ubiquitinación CUL4A-DDB1-DDB2 E3 ligasa (Friedberg et al., ADN de reparación y mutagénesis, 2nd Edition ASM Press, Washington, DC (2006); . Sugawara et al, Cell, 121: 387-400

(2005)). Curiosamente, en condiciones normales, los niveles de estado estacionario de la proteína XPC, pero no ARNm, el aumento de 4,4 veces en *Cul4a* deleción en células MEF primarios, mientras que *Cul4b* caída tuvo un efecto marginal sobre la acumulación de XPC (FIG. 4B, comparar los carriles 1-3,. Figura 5C). Por lo tanto, *Cul4a*<sup>-/-</sup> MEFs acumulado no sólo DDB2, sino también el sensor de daño en el ADN XPC limitante de la velocidad para el reconocimiento de daños y GGR.

Tras la irradiación UV, el complejo DDB1 DDB2 reconoce inmediatamente el ADN dañado y ayuda a reclutar el complejo XPC-HHR23B a los sitios de daño en el ADN a través de la unión directa a XPC (Fitch et al., J. Biol. Chem, 278: 46.906-46.910 (2.003)). XPC se ubiquitinated entonces en el ADN por la ligasa CUL4A-DDB1-DDB2 E3, y posteriormente deubiquitinated, en lugar de someterse a la degradación proteasomal-dependiente (Sugasawa et al, Cell, 121: 387-400 (2005)). El papel fisiológico de ubiquitinación XPC en GG-NER aún no se ha determinado. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la ablación CUL4A en XPC de unión a la cromatina y la modificación por ubiquitina tras la irradiación UV. Dado que los anticuerpos XPC disponibles fueron incapaces de detectar XPC ubiquitinated ratón en MEFs, CUL4A se agotó por ARNsh lentiviral en células HCT116 humanos. Como se muestra en la figura. 4E, la asociación con la cromatina de XPC aumenta tras el silenciamiento CUL4A por lentiviral ARNsh, consistente con los niveles más altos XPC disponible en la ausencia de *Cul4a* (Figura 4B). Además, el agotamiento de CUL4A condujo a una inhibición espectacular de la ubiquitinación de XPC en la cromatina post-UV (Figura 4E). En conjunto, estos resultados demostraron una función específica de CUL4A en el control de los niveles de XPC en condiciones normales y de ubiquitinación XPC en la cromatina en respuesta a la irradiación UV. Además, CUL4A fue el principal responsable de dirigir la ubiquitinación de DDB2 y XPC, mientras que CUL4B desempeñó un papel menor en estos procesos, si es que desempeñó alguno.

Los resultados de este ejemplo reflejan la mayor estabilidad de DDB2, p21, y XPC en células deficientes en *Cul4a*.

### Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra las actividades mejoradas de unión a AND dañado (UV-DDB) y de reparación genómica global (GGR) en células deficientes en *Cul4a*.

Para el ensayo de unión al ADN dañado de la actividad UV-DDB, 2 µg de extracto de células enteras se incubaron con una sonda de AND marcada con <sup>32</sup>P y se irradia a UV-5000 en J / m<sup>2</sup>, y la unión se evaluó mediante el ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (Chen et al., J. Biol. Chem, 276: 48175 a 48182 (2001)).

El ensayo ELISA GGR de CPD y la eliminación de 6-4PP se realizó como se ha descrito previamente (Chen et al., 2006) en MEF primarios *Cul4a*<sup>-/-</sup> (Ko-4a scm-4b), *Cul4b*<sup>kd</sup> (F / f-4a-4b sh), y *Cul4a*<sup>fl</sup> control (F / f-4a-4b scm) (Figura 7B, ko, defectivo; k/d, defectivo; scm, mixto). Brevemente, las células MEF en crecimiento exponencial se irradiaron con 10 J / m<sup>2</sup>-C de UV (254 nm) y o se recogieron inmediatamente (0 h) o se les dejó reparar durante la duración indicada en la figura. 7B. Se aisló el ADN genómico y se cuantificó mediante centelleo líquido y mediciones fluorométricas de ADN teñido con Hoechst. El ADN genómico desnaturalizado se fijó a cada pocillo de placas de 96 pocillos revestidos con protamina sulfato y secuencialmente se incubó con anticuerpo monoclonal específico para 6-4PP (64M-2, 1: 5000) o CPD (1: 5000), biotina-fragmento f (ab ' ) 2 de IgG anti-ratón (H + L) (1: 2000, Zymed) y peroxidasa-estreptavidina (1: 10.000, Zymed) durante 30 min a 37 ° C. Los pocillos se lavaron con PBS-Tween y 0.1 tampón citrato-fosfato y M se incubaron con la solución de sustrato (tampón 0,1 M de citrato-fosfato, 0,1 mg / ml de tetrametilbencidina [TMB], 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción enzimática se terminó mediante la adición de 50 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1Ma cada pocillo. La A450 se determinó utilizando un lector de placas (Molecular Devices).

La progresión del ciclo celular se ensayó mediante la sincronización de MEFs primarios en G0 / G1 por privación de suero durante 72 horas, seguido de irradiación UV (10 J / m<sup>2</sup>) a las 3 h de la liberación al medio que contiene suero, y la cosecha de los MEF en varios puntos de tiempo indicados para el análisis por ensayo de incorporación de timidina [<sup>3</sup>H] (FIG. 7C) (Gittig y Koff, Methods Mol. Biol, 142: 109-123 (2000)) o mediante citometría de flujo (Figura 8). Para la medición de micronúcleos, se irradiaron los MEF con UV a 10 J / m<sup>2</sup>, se cultivaron durante 48 horas, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se sometieron a tinción con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

El reconocimiento de ADN dañados por radiación UV está limitada por la piscina celular de DDB2 disponible (Fitch et al, Reparación de ADN (Amst), 2.: 819-826 (2003); Tang y Chu, reparación de ADN (Amst), 1: 601-616 (2002)). La acumulación de DDB2 en *Cul4a*<sup>-/-</sup> MEFs llevó a un aumento de la actividad de UV-DDB en comparación con *Cul4a*<sup>fl</sup> MEFs (Figura 7A; "B" indica compleja DDB-ADN) ensayo de GGR, y una mejora de aproximadamente el 20% de la actividad GGR tanto para los CPD y 6-4 PP, las lesiones más comunes reparadas por NER, medida por ELISA basados- el uso de anti-CPD y anticuerpos anti-6-4PP (FIG. 7B). En contraste, el agotamiento de los *Cul4b* por ARNsh tenido ningún efecto discernible sobre la eficiencia GGR (Fig. 7B). Estos resultados demuestran que CUL4A abrogación permite la elevación eficaz de la capacidad GGR más allá del umbral alcanzable en las células de tipo salvaje.

Para determinar si la estabilización postraduccional de p21 en MEF de *Cul4a*<sup>-/-</sup> demostrada en el Ejemplo 2 hace cumple el punto de control el daños en el ADN dependiente de p21, la cinética de la entrada en la fase S se midió en MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup> y salvajes primarios de forma sincronizada en G0 / G1-post-UV mediante incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina.



Los MEF de tipo salvaje comenzaron a salir de G1 y a incorporar [<sup>3</sup>H] timidina a las 12 horas post-UV, y la mayoría entraron en la fase S en 16-20 horas. (Figura 7C). Sin embargo, los MEF de *Cul4a*<sup>-/-</sup> se retrasaron 4-6 horas en la entrada en fase S después de la UV. Para validar que p21 es la diana principal responsable del retraso de la entrada en la fase S en MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup>, se generaron MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup>; p21<sup>+/+</sup> cruzando ratones *Cul4a*<sup>+/+</sup> y p21<sup>+/+</sup>. De hecho, la eliminación de p21 anulaba efectivamente la detención prolongada de G1 asociada con la pérdida de CUL4A, y dio lugar a la entrada acelerada en la fase S. El 18% de los MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup>; p21<sup>+/+</sup> progresaron en la fase S a las 8 horas después de la UV, similar a lo observado en MEF p21<sup>+/+</sup> (Figura. 7C). El análisis de citometría de flujo confirmó además que los MEF *Cul4a*<sup>+/+</sup> se retrasaron al menos 6 horas en la progresión a la fase S en comparación con los MEF de tipo salvaje, mientras que la supresión de p21 eliminaba efectivamente el bloque G1 en células *Cul4a*<sup>+/+</sup>MEF (Figura 8). Por lo tanto, la estabilización de p21 en las células *Cul4a*<sup>+/+</sup> indicó que el bloque en G1 respondedor a los daños en el AND prevenía la entrada prematura en la fase S y que proporcionaba tiempo adicional para que el mecanismo NER identificara y eliminara las fotolesiones en el ADN.

La delección del gen p21gen o la eliminación de p21 por ARNsh lentiviral en MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup> condujo a una reducción del 8-11% de la actividad NER en la eliminación de CPD en comparación con los MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup>, lo que subraya el beneficio de la regulación por aumento de p21 en la eliminación de fotolesiones inducidas por UV. (Figura 7D). Cabe destacar que, mientras que la potenciación de GGR por p21 fue modesta en el ensayo de reparación de 24 horas tras una única dosis fisiológica de UV (10 J / m<sup>2</sup>), se magnificaría con eficacia con asaltos repetidos de UV, dosis de UV más altas o una irradiación prolongada. La ventaja de la detención prolongada en G1 de los MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup> TAMBIÉN SE SUBRAYA MEDIANTE SU MAYOR CAPACIDAD para mantener la integridad del genoma después de la exposición UV, ya que los MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup> tenían un 40% menos de micronúcleos que los MEF de tipo salvaje inducidos por irradiación UV (Figura 7E). La delección de p21 abolió la capacidad de los MEF *Cul4a*<sup>-/-</sup> para prevenir perturbaciones de la segregación cromosómica durante la mitosis. Por lo tanto, la estabilización de p21 en células *Cul4a*<sup>-/-</sup> es, en gran parte, responsable del bloque G1 respondedor a los daños en el ADN y del retraso de la progresión del ciclo celular en la fase S tras exposición a UV.

Los resultados de este ejemplo demostraron que las células deficientes en *Cul4a* tienen actividades de unión al ADN dañado (UV-DDB) por UV y de reparación genómica global (GGR) relativas a las células salvajes.

#### Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que los ratones defectivos en *Cul4a* específica de la piel son resistentes a la carcinogénesis de la piel inducida por UVB.

Los ratones *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> fueron criados con ratones K14-CREER<sup>TAM</sup> (Vasioukhin, et al., Proc.Natl.Acad.Ciencia.EE.UU., 96: 8.551-8556 (1999)) para generar ratones defectivos en *Cul4a* inducible específica de la piel. Se usaron ratones de la misma camada de ocho a doce semanas de edad y se afeitó la piel de la espalda una vez a la semana para el experimento de irradiación UV. Antes de la irradiación UVB, las pieles de la espalda de los ratones *Cul4a*<sup>fl/fl</sup>;K14-CreERTAM se afeitaron y se aplicó por vía tópica una solución de tamoxifeno / DMSO para inducir la delección del alelo *Cul4a*. Como control, los compañeros de camada salvajes también recibieron el tratamiento con tamoxifeno / DMSO (20 mg / día durante 5 días). Cada ratón individual fue irradiado hasta que aparecieron tumores en la piel o durante un máximo de 48 semanas, lo que corresponde a la semana a la cual todos los ratones CUL4A salvajes desarrollaron tumores en la piel. En tres experimentos independientes, se irradió a un total de trece ratones defectivos en CUL4A y diecinueve ratones compañeros de camada salvajes a una dosis de inicio de 2.500 J / m<sup>2</sup> al día y se incrementó gradualmente hasta una dosis máxima de 3.500 J / m<sup>2</sup> al día mediante el uso de un banco de cuatro lámparas UVB (TL20W 311NB Philips lamp, National Biological Co). El flujo UVB se midió con un radiómetro digital UVX (Modelo UVX-31). Se examinó a los ratones al menos una vez a la semana para comprobar su salud y el desarrollo de tumores. Se sacrificó a los ratones muy enfermos o si los tumores externos superaban 1,5 cm de diámetro. La significación estadística se midió utilizando la prueba del orden logarítmico. Para análisis adicionales, los tumores de piel se fijaron en 10% de formalina a temperatura ambiente durante la noche, se incluyeron en parafina y se obtuvieron secciones de un espesor de 10µ. La tinción con H y E se efectúa mediante procedimientos convencionales. Para la inmunohistoquímica, las secciones del tumor de la piel se desparafinizaron con NEO-CLEAR<sup>TM</sup> Xylene Substitute (65351-85, EMD Chemicals, NJ) y el antígeno recuperado con TRILOGY<sup>TM</sup> (CMX832, Cell Marque, CA) con ebullición a 95 ° C durante 10 minutos. Tras el bloqueo, las secciones se incubaron con anticuerpos primarios melan-A (A103) (sc-20032, Santa Cruz de Biotecnología) y p63 (A4A) (sc-8431, Santa Cruz de Biotecnología) a 4 °C durante la noche seguido de anticuerpos secundarios y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para la contratinción.

Para evaluar el impacto fisiológico de la regulación por aumento simultánea de la NER y el punto de comprobación de los daños en el ADN en G1/S tras la anulación de CUL4A, se compararon ratones defectivos en *Cul4a* inducibles con tamoxifeno específica de la piel con animales control *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> en cuanto a su susceptibilidad a la carcinogénesis de la piel inducida por UV. Primero se delecionó *Cul4a* en un área afeitada de la piel de la espalda de los ratones *Cul4a*<sup>fl/fl</sup>;K14-CreERTAM mediante la administración tópica de tamoxifeno, seguido de irradiación UV-B diaria. Los ratones control *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> comenzaron a desarrollar tumores de la piel la semana 27 del tratamiento con UV-B. A la semana 48, todos los ratones *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> desarrollaron tumores en el área de la piel dorsal afeitada (Figura 9A). El análisis histológico e inmunohistoquímico confirmó que los tumores en los ratones *Cul4a*<sup>fl/fl</sup> control eran principalmente carcinomas de células escamosas (SCC) derivados de origen epidérmico (FIGS. 9B-F).

Sorprendentemente, todos menos uno de los ratones *Cul4a<sup>fl/fl</sup>;K14-CreER<sup>TAM</sup>* se mantuvo sin SCC (FIG. 9A). También se desarrollaron tumores no SCC (por ejemplo, neoplasia de células fusiformes) y, como era de esperar, se observó una incidencia similar en ambos grupos *Cul4a<sup>fl/fl</sup>* y *Cul4a<sup>fl/fl</sup>;K14-CREER<sup>TAM</sup>*, ya que K14-CREER<sup>TAM</sup> no se expresa en estos tipos de células. La espectacular diferencia en la aparición de SCC frente a tumores no SCC sugiere la asociación específica de la resistencia del tumor con la pérdida de CUL4A. Cabe destacar que la piel de *Cul4a<sup>fl/fl</sup>* y *Cul4a<sup>fl/fl</sup>;K14-CreER<sup>TAM</sup>* mostró índices apoptóticos similares, lo que indica que la resistencia a SCC es poco probable debido a una mayor susceptibilidad a la muerte celular en los animales defectivos en *Cul4a* específica de la piel.

Sin desear estar ligado por ninguna teoría en particular, en la figura 10 se presenta un modelo hipotético que representa el papel de CUL4A en la regulación de NER y la tumorigénesis en base a los resultados descritos en los Ejemplos 1-4. CUL4A suprime coordinadamente las vías del punto de comprobación de los daños en el ADN en G1 / S y la NER a través de la degradación selectiva de DDB2 y p21, respectivamente. Por tanto, la delección de CUL4A en las células eleva la respuesta de la capacidad de la NER y de daños en el ADN en G1S/ADM. La elevación de la capacidad de la NER y la respuesta del punto de comprobación de los daños en el ADN en G1/S contribuyen a la mayor resistencia al desarrollo de tumores en ratones defectivos en *Cul4a* con respecto a los ratones control.

Los resultados de este ejemplo reflejan que la anulación de CUL4A confiere una mayor protección contra la carcinogénesis de la piel en respuesta a la irradiación UV.

### Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que una (DN) CUL4 dominante negativa mejora la NER *in vitro*.

Células HCT116 se infectaron con un adenovirus de control o un adenovirus que comprende un gen que codifica un DN-CUL4 (SEC ID N° 18). Las células se irradiaron después con 10 J / m<sup>2</sup> de UV-C. El ADN genómico se recogió a 0 horas, 4 horas, 8 horas, y 24 horas y se sondó para las lesiones CPD como se describe en el Ejemplo 3. A continuación, se calculó la tasa de actividad NER como la tasa de reparación CPD como una función del tiempo.

Reparación de CPD en las células HCT116 irradiadas con UV se produjo antes y era más completa en las células que expresan un DN-CUL4 en comparación con las células control (Fig. 11).

Los resultados de este ejemplo confirmaron que una (DN) CUL4 dominante negativa mejora la NER *in vitro*.

### Ejemplo 6

Este ejemplo profético describe un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS) para identificar una sustancia que modula (por ejemplo, inhibe) la unión de CUL4A a DDB1

Los estudios de cristalografía de rayos X han revelado los detalles moleculares de la asociación DDB1-CUL4A (Angers et al. Nature, 443: 590 - 593 (2006); Li et al., Cell, 124: 105 - 117 (2006)). Se identificaron ocho residuos dentro de la región de β-hélice DDB1-BPB (A400, I402, L404, V443, E537, W561, I587, y R589) para formar contactos directos con CUL4A (Figura 12). Tanto DDB1 como CUL4A contienen múltiples dominios modulares para las interacciones proteína-proteína que median en el ensamblaje de otros componentes de E3 y reguladores adicionales. Para dirigir la selección de los inhibidores en la interfaz de unión CUL4A-DDB1, se establecerá un ensayo de unión con los dominios mínimos de cada pareja de unión. Por otra parte, para mejorar la selección de objetivos y optimizar los parámetros de ensayo, el cribado inicial se centrará en el sitio de unión entre la superficie superior de DDB1 BPB (en lo sucesivo, "DDB1 (BPB)") (SEC ID N° y la región de α hélice en N-terminal con exclusión de la región N-terminal extremo de CUL4A (en lo sucesivo, "CUL4A (NTD-N)") (SEC ID N° 7). Cabe señalar que la maquinaria cullin ensambla componentes complejos DE E3 de una manera altamente precisa y ordenada de tal manera que el sustrato se orientará directamente hacia la enzima de conjugación de E2 conjugación para aceptar la ubiquitina. Aunque el extremo N-terminal de CUL4A forma un segundo sitio de unión para DDB1 (BPB), se espera que la interrupción de la unión entre la superficie superior de DDB1 (BPB) y el dominio α-helicoidal de CUL4A probablemente oriente erróneamente el sustrato reclutado, como se evidencia por la mutación de DDB1(BPB) (BPB), que anula la unión y suprime efectivamente la actividad de E3 a pesar de la segundo sitio de unión intacto.

El diseño de un ensayo de proximidad luminiscente amplificado no radiactivo basado en esferas se muestra en la figura. 13, que puede adaptarse para proporcionar una lectura para la interacción CUL4A (NTD-N) -DDB1 (BPB). Este ensayo implica típicamente esferas donantes y aceptoras diseñadas para asociarse con las respectivas parejas de unión. Tras la excitación con láser, un fotosensibilizador en la esfera "donante" convierte el oxígeno ambiente en un estado de singlete más excitado. Las moléculas de oxígeno en estado de singlete difunden a través para reaccionar con un derivado de tióxeno en la esfera "aceptora" que genera quimioluminiscencia a 370 nm. Debido a que la luz emitida es en realidad energía mayor (menor longitud de onda), en la misma esfera se contienen fluoróforos de actividades adicionales. Después, los fluoróforos emiten luz a 520 - 620 nm. Esta cascada de reacciones químicas sólo se produce cuando las esferas donantes y aceptores se ponen en estrecha proximidad (-200 nm) iniciada por la interacción entre las parejas de unión. Si la interacción entre las dos parejas es débil o se ha interrumpido por los inhibidores, el oxígeno singlete generado por la esfera donantes decae rápidamente al estado fundamental debido a que es menos probable que se encuentren las esferas aceptoras.

Para aplicar el sistema ALPHASCREEN™ (PerkinElmer), esferas donantes acopladas a anticuerpos anti-GST se utilizan para capturar GST-CUL4A(NTD-N) y esferas receptoras que se unen al marcador FLAG se utilizan para inmovilizar FLAG-DDB1 (BPB). La proximidad de los donantes a las esferas receptoras se inducirá tras la unión del CUL4A (NTD-N) a DDB1 (BPB), lo que tiene como resultado la generación de una señal luminiscente a 520 nm tras excitación a 680 nm, según lo registrado por un lector de placas ENVISION™ Multilabel (PerkinElmer). El ensayo de unión ALPHASCREEN™ entre GST-CUL4A (NTD-N) y FLAG-DDB1 (BPB) se realiza en microplacas de 384 pocillos por triplicado y los compuestos que suscitan inhibición superior al 50% en la fuerza de la señal se definen como "objetivos obtenidos".

Los parámetros medidos en el ensayo de unión CUL4A(NTD-N)-DDB1(BPB) incluyen la afinidad de unión, especificidad de unión, y la sensibilidad al vehículo (es decir, DMSO).

La afinidad de unión entre CUL4A (NTD-N) y DDB1 (BPB) se determinará mediante la mezcla de una cantidad constante de GST-CUL4A (NTD-N) (50 nM como punto de partida) con concentraciones crecientes del complejo FLAG-DDB1 (BPB) (2-200 nM) e incubando a temperatura ambiente durante 2 horas. El volumen de reacción final será 25  $\mu$ l, que contiene 5  $\mu$ l de cada proteína y 5  $\mu$ l de tampón ALPHASCREEN™. Después de mezclar, la placa se incubará a temperatura ambiente, agitando durante 1 hora, seguida de la adición de 5  $\mu$ l de cada uno del donante de unión AlphaScreen™ GST y perlas receptoras de unión a FLAG (20 ng / ml). La mezcla se equilibrará a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la lectura. Cada punto de datos se realiará por triplicado. Los datos de unión se analizarán mediante el software GraphPad Prism, y se determinará una  $K_d$  aparente.

Para demostrar la especificidad de la unión CUL4A (NTD-N) -DDB1 (BPB) se realizarán ensayos de competición con CUL4A(NTD-N) and DDB1(BPB) sin marcar. Al aumentar las concentraciones de CUL4A(NTD-N) or DDB1(BPB) sin marcar suprimen la unión entre GST-CUL4A (NTD-N) y FLAG-DDB1 (BPB), la  $CI_{50}$  puede determinarse. El control negativo es el FLAG-DDB1 (BPB-W561A) mutante, que es incapaz de unirse a CUL4A (Li et al, Cell, 124: 105-17 (2006)). 105 - 17 (2006)).

Un ensayo HTS eficaz requiere que los objetivos proteicos retengan la actividad biológica completa en concentraciones significativas de DMSO, el disolvente utilizado para disolver bibliotecas de pequeñas moléculas. Para analizar la sensibilidad al DMSO de GST-CUL4A (NTD-N) y FLAG-DDB1 (BPB) en el formato ALPHASCREEN™ se añadirán concentraciones crecientes (0-20%) a la mezcla de unión para determinar la concentración más alta que aún conserva la interacción eficiente.

Este ensayo de unión entre CUL4A (NTD-N) purificado por afinidad recombinante y DDB1 (BPB) para el formato AlphaScreen™ hace hincapié en la importante interfaz proteína-proteína para su interrogación. Este enfoque puede reducir la posibilidad de encontrar compuestos que afectan a los sitios de unión alostéricos en otra parte en CUL4A de longitud completa o DDB1 que pueden alterar la estructura terciaria, lo que resulta en la retirada efectiva de asociación DDB1-CUL4A. Por lo tanto, un enfoque alternativo emplea CUL4A de longitud completa (por ejemplo, SEC ID N° 1) y DDB1 (p. ej., SEC ID N°: 3) como parejas de unión en el formato de ensayo AlphaScreen™ utilizando DDB1 de longitud completa con un marcador-MARCA en N-terminal y CUL4A de longitud completa (hecha mediante la coexpresión de CUL4A con Rbx1 utilizando un vector pCool bicistrónico derivado de pGEX-4T-1 para mejorar la expresión y el plegamiento / solubilidad de CUL4A (Li et al, Cell, 124: 105 - 17 (2006)). En aún otro enfoque, un fragmento de CUL4A (por ejemplo, SEC ID N° 5 o la SEC ID N° 6) y DDB1 o DDB1(BPB) se utilizan como parejas de unión en el ensayo ALPHASCREEN™. Este ensayo puede identificar objetivos adicionales que alteren el ensamblaje preciso de DDB1-CUL4A requerido para la actividad ligasa E3.

### Ejemplo 7

Este ejemplo profético describe ensayos HTS cuantitativos para identificar pequeñas moléculas que alteran la interacción DDB1-CUL4A y la actividad ubiquitina ligasa.

Debido a que una única mutación puntual en DDB1 (BPB-W561A) es suficiente para interrumpir la unión de DDB1-CUL4A (Li et al, Cell, 124: 105-17 (2006)), es posible que las pequeñas moléculas dirigidas al punto clave de la interfaz DDB1-CUL4A o en un sitio secundario que induce cambios alostéricos en la conformación puede colapsar de manera efectiva el módulo de interacción DDB1-CUL4A y suprimirá la función ubiquitina ligasa.

Se realizará un cribado de alto rendimiento a gran escala de los compuestos de la biblioteca para identificar compuestos que alteran la interacción DDB1 (BPB) -CUL4A (NTD-N) utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 6. Cada componente de la reacción de unión se valora de manera que la concentración final de cada una esté cerca del límite superior del intervalo de la respuesta lineal. El orden óptimo de la adición de parejas de unión se puede determinar de la siguiente manera. En primer lugar, GST-CUL4A (NTD-N) se incuba con los compuestos, y FLAG-DDB1 (BPB) se añade posteriormente antes de grabar el resultado. El cribado se realiza en una estación de trabajo de manipulación de líquidos Biomek FX equipada con unidades de apilación de placas y de pipeteado en cuadrante (Beckman). El ensayo DDB1(BPB)-CUL4A(NTD-N) ALPHASCREEN™ se realiza en un formato de microplaca de 384 pocillos con 352 compuestos únicos en cada placa. La columna 1 y la columna 24 contienen controles (GST-CUL4A (NTD-N) y FLAG-DDB1 (BPB)) positivos y (GST-CUL4A (NTD-N) y FLAG-DDB1 (BPB-W561A)) negativos. Los compuestos se diluyen en DMSO a la concentración óptima determinada como se describe en el Ejemplo 6

anterior para maximizar la señal, y se dispensan en los pocillos de la placa en alícuotas de 1  $\mu$ l. Esto da una concentración final de compuesto 10 mM en la reacción de unión 10  $\mu$ l, que se añade al mismo tiempo que el GST-CUL4A (NTD-N) y FLAG-DDB1 (BPB) a la concentración óptima y el orden de adición para este ensayo de unión. Se añaden perlas de donante y aceptor y se incubaron durante 1 hora, y la señal de AlphaScreen™ se lee en un lector de ENVISION™ multidisco (PerkinElmer). Cada placa debe tener una puntuación Z 'de 0,5 o mayor con las dos pocillos de control positivo y negativo (Zhang et al., J. Biomol. Screen, 4 67 - 73 (1999)). El factor Z '(por la calidad de ensayo) se calculará de forma automática durante el análisis de los datos utilizando el paquete de software ActivityBase (software IDBS, Emeryville, CA) para cada placa. Los compuestos que causan una reducción del 50% en la señal luminiscente en dos ensayos independientes se clasifican como objetivos obtenidos y se someten a la posterior validación en cribados secundarios.

Se realizarán múltiples cribados secundarios y ensayos de especificidad para eliminar los falsos positivos y los inhibidores inespecíficos. Se eliminan los compuestos que se ha determinado que son "inespecíficos", según se documenta mediante la base de datos central del Sloan Kettering HTS que se mostró previamente que obtenían múltiples dianas en múltiples ensayos. La medición de la  $CI_{50}$  de los objetivos obtenidos usando una serie de diluciones del compuesto de 2 veces en formato de HTS con los compuestos objetivo obtenidos permite la búsqueda de sólo aquellos compuestos que muestran inhibición dependiente de la dosis. Los objetivos obtenidos se organizan en grupos de compuestos estructuralmente relacionados para identificar armazones comunes y para examinar la relación estructura-actividad (SAR) de estos objetivos obtenidos y los "no objetivos" (es decir, sin inhibición) con estructuras relacionadas de la base de datos de la biblioteca química. El análisis SAR sirve como filtro para la confirmación de los objetivos obtenidos y define las características estructurales básicas de estos inhibidores. La reversibilidad de la inhibición se determina por diálisis de la mezcla del complejo de proteína con el compuesto de ensayo. Esto elimina el inhibidor y restaura la señal para controlar los niveles si la inhibición es reversible. La autenticidad de la inhibición de los compuestos objetivos obtenidos se pone a prueba aún más mediante un ensayo de ubiquitinación convencional in vitro de DDB1. Además, los ensayos de *pull-down* en presencia y ausencia de los compuestos objetivo se llevarán a cabo como un ensayo independiente para verificar la perturbación de la interacción DDB1 (BPB) -CUL4A (NTD-N). Se buscarán los compuesto (s) objetivos que cumplan todos los criterios establecidos. Cualquier compuesto que inhiba de forma irreversible la asociación DDB1 (BPB) -CUL4A (NTD-N), que sea específico puede buscarse, ya que los dos fármacos antibacterianos y anticancerosos más largos están en esta clase (penicilina y 5-FU).

Los compuestos del cribado secundario con valores de  $CI_{50}$  potentes se eligen para probar si perturban las actividades de la DDB1 CUL4A ubiquitina ligasa y NER-1 in vivo. Antes de la prueba de las actividades in vivo de los compuestos principales, la permeabilidad celular de los candidatos se determinará usando el ensayo de permeabilidad de la membrana artificial paralelo (PAMPA), que utiliza una membrana llena de lípidos para determinar las propiedades de permeabilidad transcelular pasiva de los potenciales compuestos farmacológicos (Kansy et al., J. Med. Chem., 41: 1007 - 10 (1998)). El ensayo PAMPA (Millipore) es relativamente simple, barato y sencillo, pero produce resultados comparables a los ensayos basados en células tradicionales como los que utilizan células Caco-2 (Kansy et al., J. Med. Chem., 41: 1007 - 10 (1998)). Los compuestos con una buena permeabilidad celular se pondrá a prueba posteriormente en líneas celulares. Cables potentes que muestran poca permeabilidad de membrana pueden modificarse para que sean más lipofílicos para mejorar la permeabilidad de la membrana, al tiempo que se tiene cuidado de evitar comprometer la solubilidad.

Las células MEF primarias de *Cul4A<sup>fl/fl</sup>* and *DDB1<sup>fl/fl</sup>* (Cang et al., Cell, 127: 929-40 (2006)) y células de cáncer de colon HCT116 humanas son líneas celulares modelo establecidas para probar los efectos de los inhibidores sobre la degradación de DDB2 y para medir los efectos sobre la actividad NER. Las células se trataron con compuestos de ensayo o vehículo durante 4 horas, y luego se cosecharon y lisaron por inmunotransferencia usando anticuerpos contra DDB2, DDB1, CUL4A, y  $\beta$ -actina (control). Los compuestos que causan selectivamente un aumento en la expresión DDB2 se evalúan adicionalmente por su capacidad para reparar los CPD inducidos por UV y 6,4-PP utilizando el ensayo basado en ELISA descrito en el Ejemplo 3 anterior. Como control de especificidad compuesto, las células MEF primarias *Cul4A<sup>fl/fl</sup>* y *DDB1<sup>fl/fl</sup>* MEF células se infectarán con adenovirus recombinantes que expresan la recombinasa Cre para eliminar *Cul4a* o *DDB1* endógenos antes de la adición de los compuestos principales para determinar si los efectos inhibitorios de verdad dependen de la DDB1-CUL4A ubiquitina ligasa. Un lentivirus recombinante vehículo de los shARN para CUL4A o DDB1 humano también se puede utilizar para evaluar la especificidad de los compuestos en las células HCT116 humanas.

Los inhibidores de molécula pequeña identificados de acuerdo con los procedimientos descritos en este ejemplo se pueden co-cristalizar con CUL4A o DDB1 con el fin de determinar la base molecular de la inhibición y se ensayaron en el sistema de modelo de ratón de cáncer de piel UV descrito anteriormente para evaluar su eficacia en la protección de contra la carcinogénesis de la piel, y para desarrollar aún más estos inhibidores sintéticos como agentes anticancerosos para la prevención y el tratamiento de tumores malignos humanos.

### Ejemplo 8

Este ejemplo profético demuestra otra forma de realización del procedimiento de la invención para identificar una sustancia que modula (por ejemplo, inhibe) la actividad de ubiquitina ligasa de CUL4A que es adecuado para la identificación de inhibidores peptídicos.

Los inhibidores basados en péptidos que interactúan con cualquiera de DDB1 (BPB) o CUL4A (NTDN) se pueden identificar mediante el cribado de bibliotecas de expresión en fagos usando el protocolo descrito en la figura. 14. Para resumir brevemente, FLAG-DDB1 (BPB) o GST-CUL4A (NTD-N) se inmovilizan sobre placas de ELISA de 96 pocillos recubiertos con el anticuerpo FLAG o GST y se incubaron con 10 µl de la biblioteca en fagos en cada pocillo. Tras un extenso lavado, el fago unido se eluyó mediante tripsinización o tampón de elución en glicina a pH bajo e infectó en *E. coli* para la amplificación, secuenciación y segunda y tercera ronda de panning que enriquecen los péptidos de alta afinidad. Los péptidos seleccionados se sintetizan usando un sintetizador de péptidos (Protein Technologies, Inc.), se purificaron por HPLC y se evaluaron en el ensayo de CUL4A (NTD-N) -DDB1 (BPB) AlphaScreen™ como se describe en el Ejemplo 6 y el Ejemplo 7 para su eficacia en el bloqueo de la interfaz de unión, y la inhibición de la ubiquitinación de DDB1 in vitro. Los péptidos que muestran al menos el 50% de inhibición de la actividad de unión o E3 ligasa se evalúan in vivo en células MEF Cul4A<sup>fl/fl</sup> y DDB1<sup>fl/fl</sup> o células HCT 116 humanas para la inhibición de la ubiquitinación y degradación de DDB2, y para mejorar la actividad NER contra CPD inducidos por UV o 6,4-PP en el ADN. Para mejorar la permeabilidad de la membrana, los péptidos sintéticos se pueden vincular con la secuencia señal de transducción de membrana de HIV-TAT (Nagahara et al., Nat. Med. 1449 - 52 (1998)). La estabilidad de los inhibidores peptídicos identificados contra las peptidasas celulares se puede mejorar mediante la aplicación de la tecnología de péptido retro-inverso para sintetizar los péptidos optimizados utilizando D-aminoácidos unidos en el orden inverso al del péptido parental. Tales péptidos retro-inversos presentan sus cadenas laterales en orientaciones similar a la estructura original, pero son resistentes a la escisión por peptidasas in vivo (Angers et al. Nature, 443: 590 - 3 (2006); Van Regenmortel and Muller, Curr. Opin. Biotechnol., 9: 377 - 82 (1998)).

Ejemplos de bibliotecas de expresión en fagos incluyen, sin limitación, bibliotecas CX<sub>10</sub>C / p8 + 8, bibliotecas NNS<sub>20</sub>p8 / 8 + bibliotecas y bibliotecas en un armazón knottin, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre	CX <sub>10</sub> C-1	CX <sub>10</sub> C-2	NNS <sub>20</sub> - 1	NNS <sub>20</sub> - 2	Knottin-1	Knottin-2
Vector	pC89s	pC89s	pC89s	pC89s	pC89s	pC89s
Tipo	p8+8	p8+8	p8+8	p8+8	p8+8	p8+8
Forma de expresión	Cíclica	Cíclica	Lineal	Lineal	Estructurada	Estructurada
Copias / virión	~ 200	~ 200	~ 200	~ 200	~ 200	~ 200
Diversidad	5,4 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>9</sup>	8,8 x 10 <sup>8</sup>	7,04 x 10 <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>8</sup>	0,5 x 10 <sup>9</sup>
Título (ufc/ml)	1,35 x 10 <sup>13</sup>	4,05 x 10 <sup>13</sup>	1 x 10 <sup>14</sup>	1 x 10 <sup>14</sup>	3,4 x 10 <sup>12</sup>	1 x 10 <sup>12</sup>

Las dos bibliotecas de expresión en fagos de CX<sub>10</sub>C/p8+8 contienen 2,44 x 10<sup>9</sup> secuencias de cisteína limitada de 10-aminoácidos de longitud. Las dos bibliotecas de NNS<sub>20</sub>/ P8 + 8 contienen 1,58 x 10<sup>9</sup> secuencias largas lineales de 20 aminoácidos de longitud. Además de péptidos existentes en forma cíclica o lineal, sino que también es deseable que los péptidos se expresen en un armazón de proteínas definido. Por consiguiente, las bibliotecas de expresión en fagos en un armazón knottin también se pueden someter a detección selectiva. Las Knottins son proteínas funcionalmente diversas, pero relacionadas estructuralmente, por lo general de menos de 40 residuos de longitud. Todas las knottins comparten un armazón común que comprende una pequeña estructura en lámina β antiparalela de triple cadena y puentes disulfuro.

El uso de los términos “un” y “una/uno” y “el/la” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) se deberá interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o esté claramente contraindicado por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “incluyendo” y “que contiene” se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan incluyendo, aunque sin limitaciones”, a menos que se indique lo contrario. Los intervalos de valores citados en el presente documento están destinados simplemente a servir como método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor por separado que entra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor distinto se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera citado individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que, de otro modo, claramente se contradiga en el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o términos ilustrativos (p. ej., “tal como”) proporcionados en el presente documento

está destinado simplemente a iluminar mejor la invención y no impone una limitación del ámbito de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como indicativa de ningún elemento no reivindicado esencial en la práctica de la invención.

- 5 Realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de estas realizaciones preferidas pueden ser evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos usen dichas variaciones según sea adecuado y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo distinto a lo descrito específicamente en el presente documento. De acuerdo con esto, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto citada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de la misma entra dentro de la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto contradiga claramente lo otra cosa.
- 10

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A en un animal para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una afección asociada con daños en el ADN en un animal, en el que la sustancia está seleccionada del grupo que consiste en un polipéptido que comprende un fragmento de la región N-terminal de CUL4A o un análogo, homólogo, derivado del mismo que funciona de manera similar a la región N-terminal de CUL4A, un ARN de interferencia pequeño (ARNsi) de CUL4A, un ARN de horquilla corta (ARNsh) de CUL4A, un oligonucleótido antisentido de CUL4A, un aptámero de CUL4A, y una ribozima de CUL4A, y en el que el medicamento es para ser administrado a un animal para provocar un aumento en la actividad de reparación por escisión de nucleótidos con el fin de prevenir o tratar una afección asociada con el daños en el ADN en el animal.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A inhibe la expresión de CUL4A
3. El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A interrumpe la unión de CUL4A a la proteína 1 de unión al ADN dañado (DDB1).
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la sustancia es un siARN de CUL4A o un shARN de CUL4A.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la afección asociada con daños en el ADN se selecciona del grupo que consiste en el envejecimiento, exposición prolongada a radiación ultravioleta (UV), exposición a un carcinógeno químico, cáncer, xeroderma pigmentoso, síndrome de Cockayne, y ataxia-telangiectasia.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la afección asociada con daños en el ADN es la exposición prolongada a radiación UV.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el medicamento es una composición de filtro solar que comprende:
- (a) la sustancia que interfiere con la actividad de CUL4A,
  - (b) una cantidad fotoprotectora de un compuesto de filtro solar capaz de filtrar la radiación UV que tiene una longitud de onda de 280 nm a 320 nm (UV-B) y / o 320 nm a 400 nm (UV-A), y
  - (c) un vehículo cosméticamente aceptable.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que el compuesto de filtro solar está seleccionado del grupo que consiste en sulisobenzona, dioxibenzona, antranilato de metilo, ácido 4-aminobenzoico (PABA), amil dimetil PABA, octil dimetil PABA, PABA de glicerilo, p-metoxicinamato de 2-etoxietilo, dietanolamina p-metoxicinamato, p-metoxicinamato de etilhexilo, trioleato de digaloiolo, 4-bis (hidroxipropil)aminobenzoato de etilo, 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato, salicilato de 2-etilhexilo, salicilato de homomentilo, salicilato de trietanolamina, ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico, vaselina roja, dióxido de titanio, óxido de zinc, y combinaciones de los mismos.

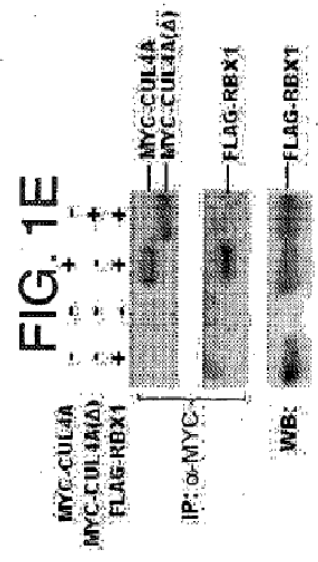
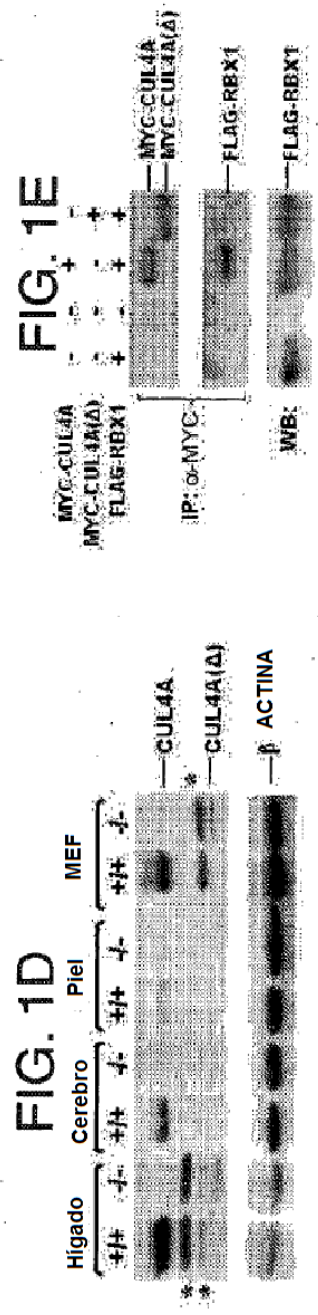
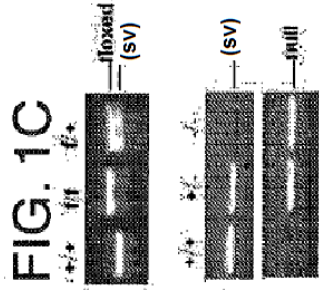
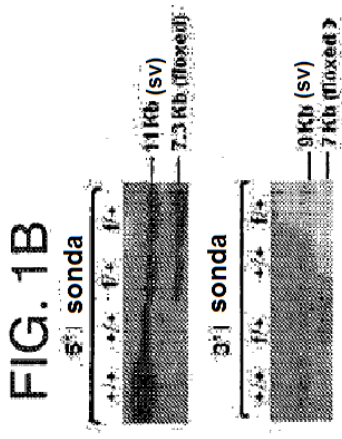
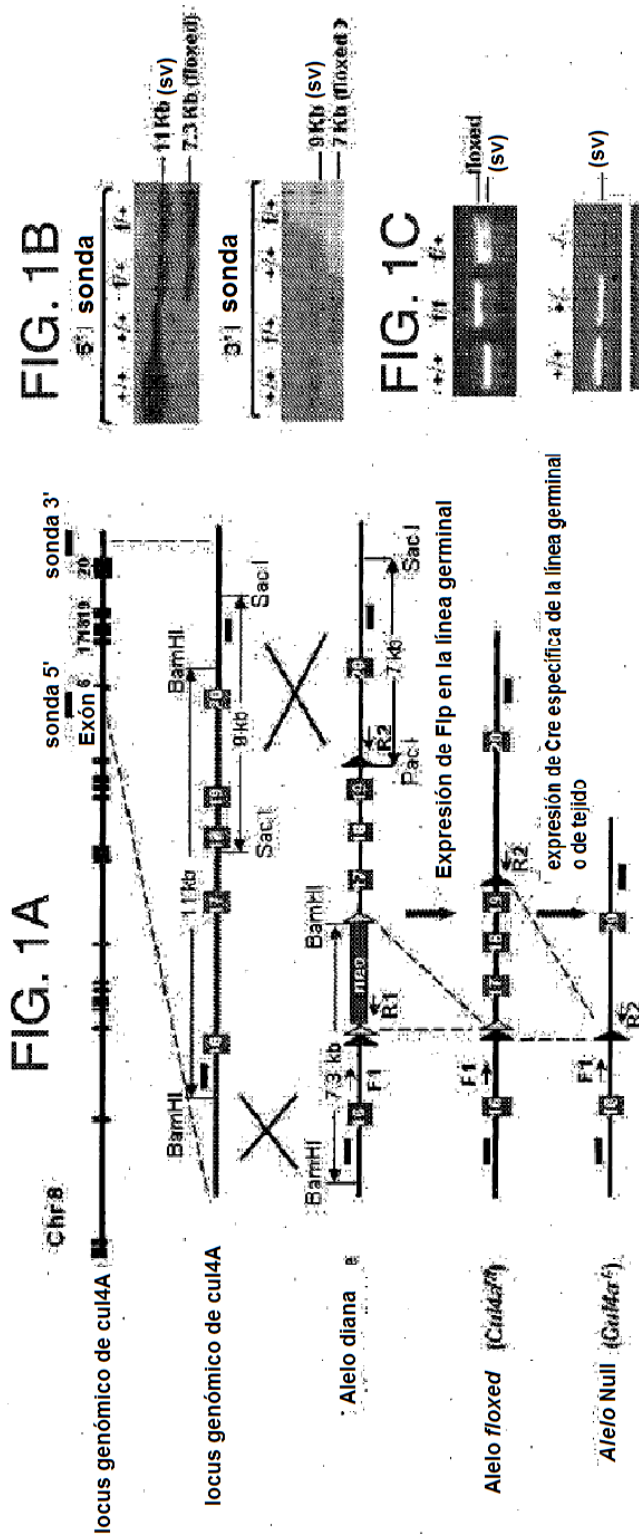




FIG. 2A

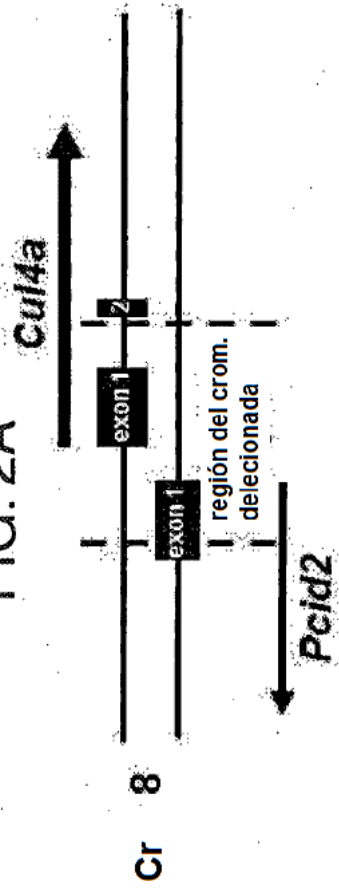


FIG. 2B

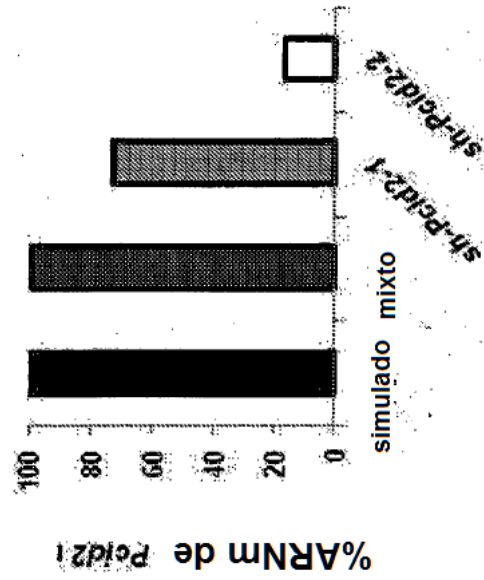


FIG. 2C

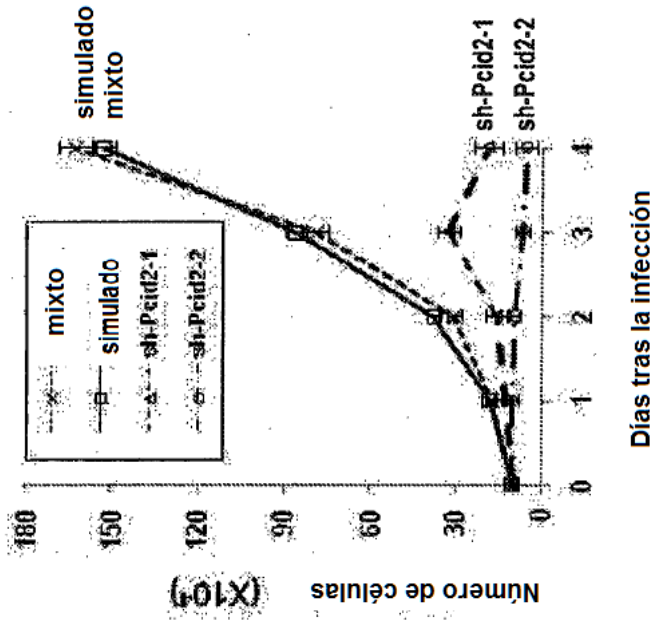


FIG. 3A

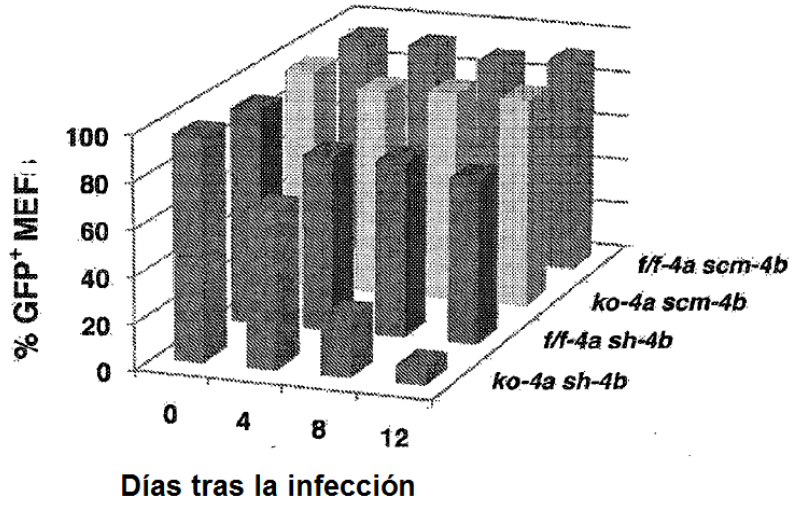
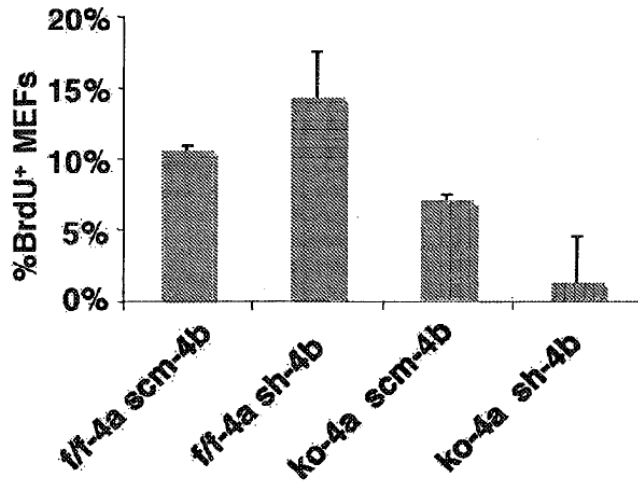


FIG. 3B



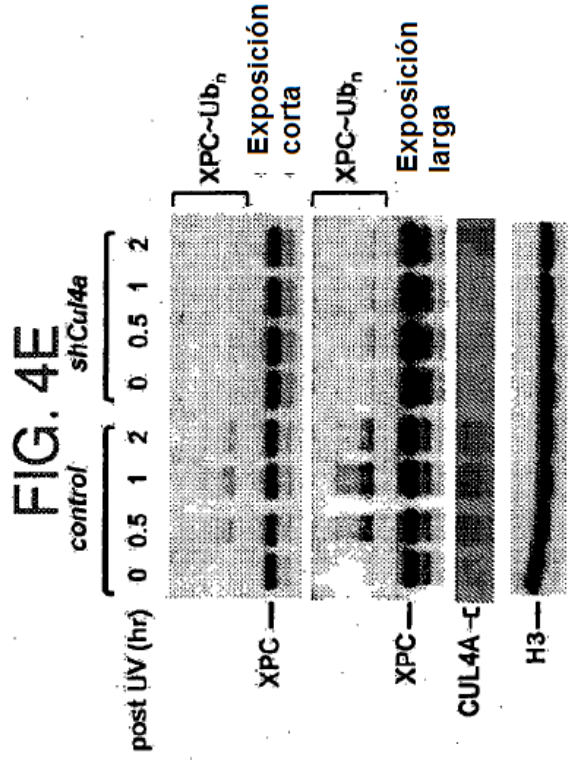
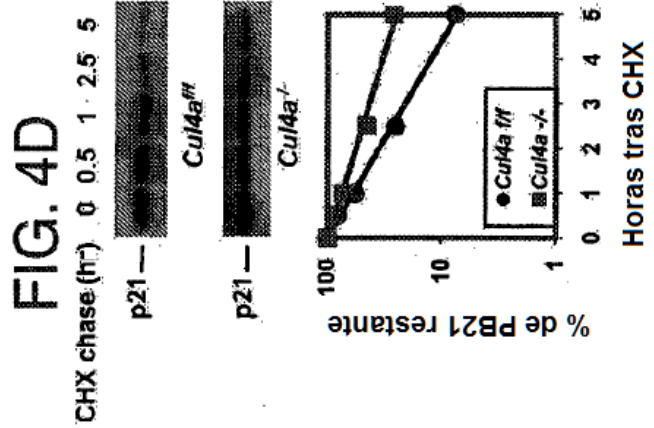
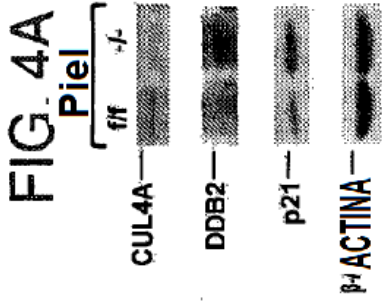
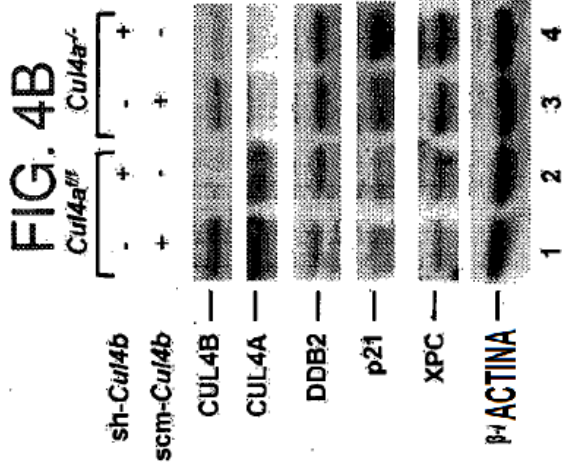
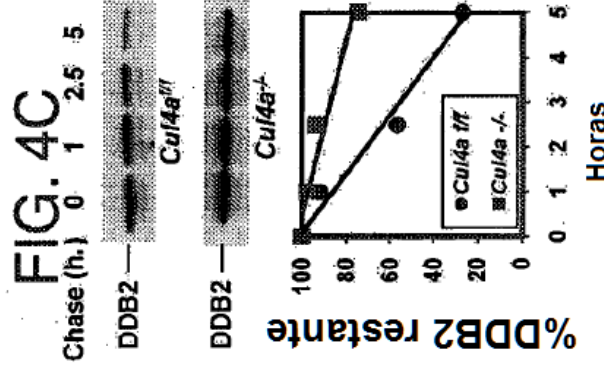


FIG. 5A

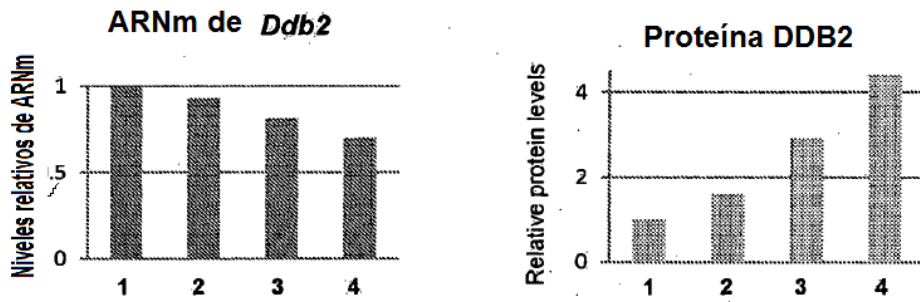


FIG. 5B

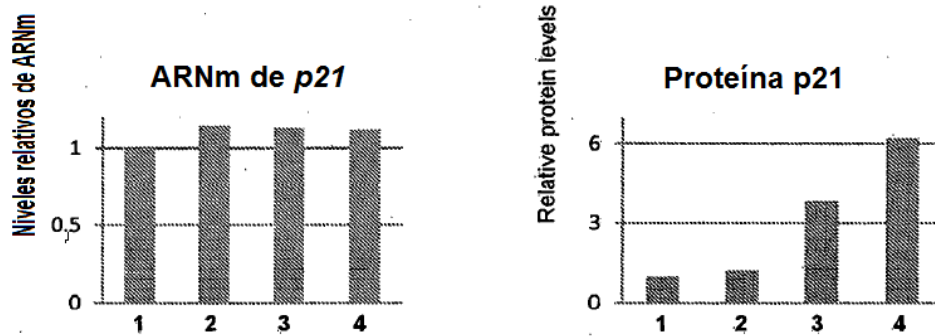


FIG. 5C

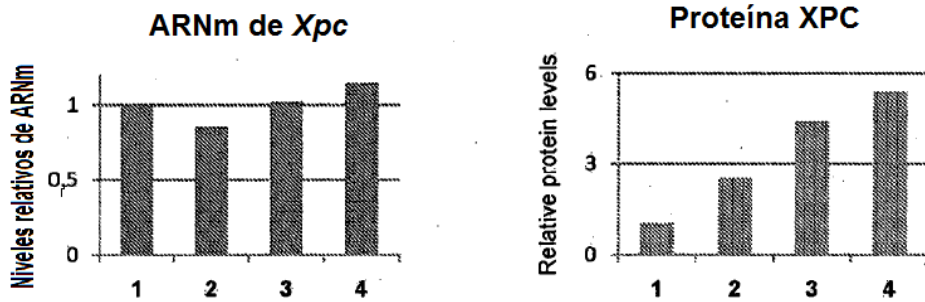
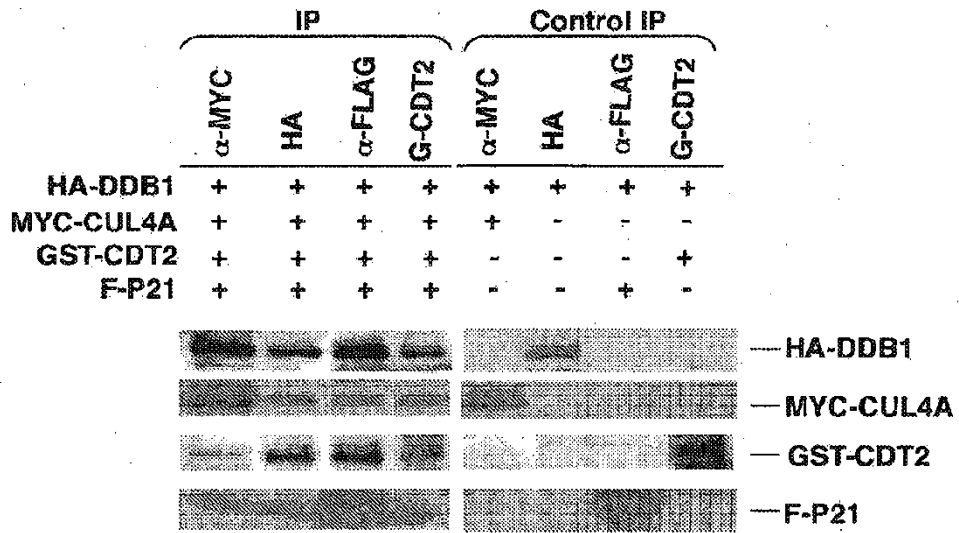


FIG. 6



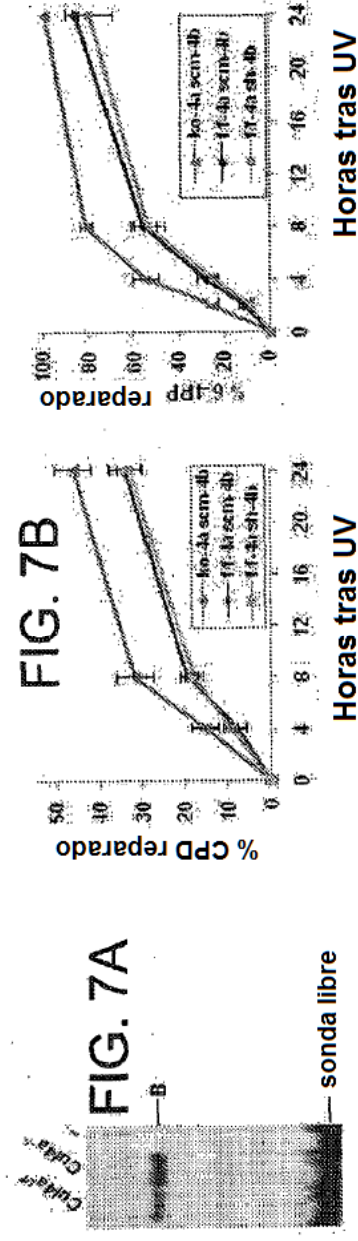
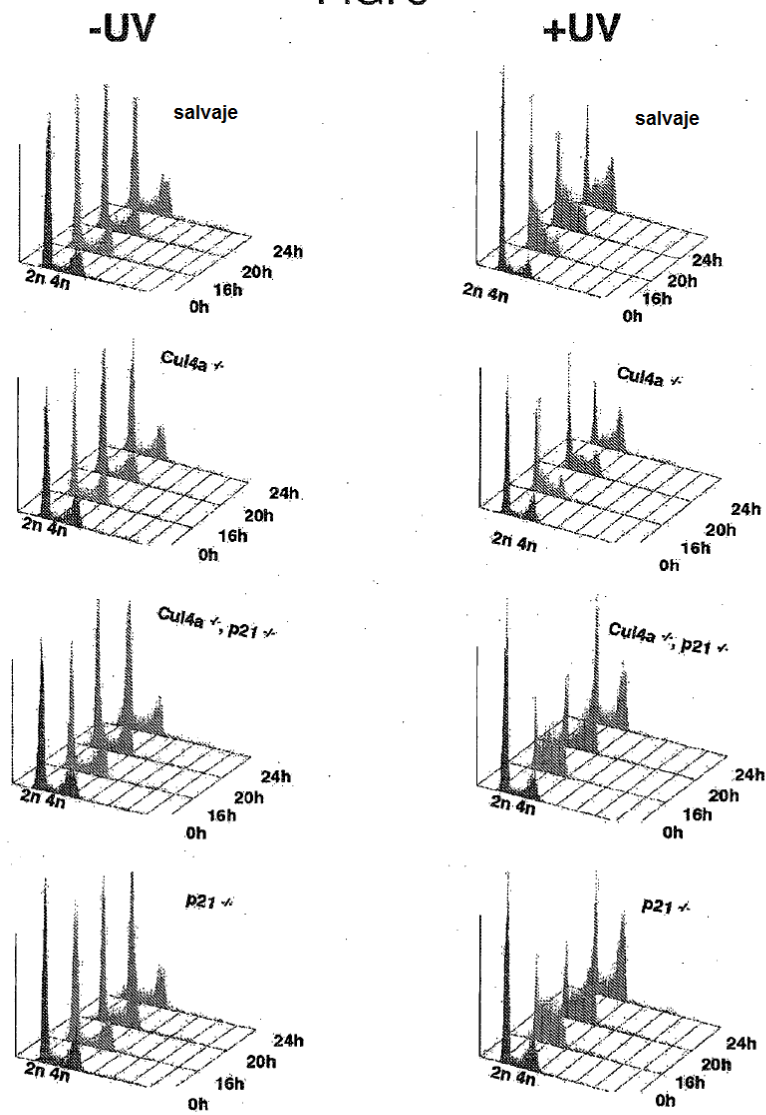




FIG. 8



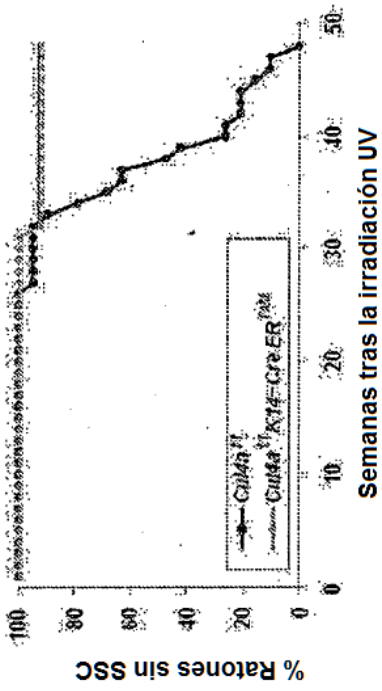


FIG. 9B

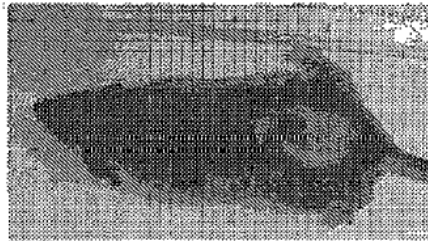


FIG. 9C



FIG. 9D

FIG. 9E

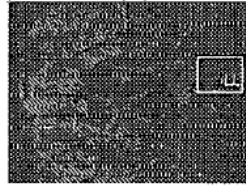
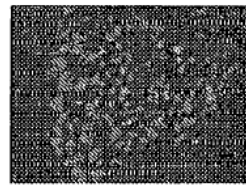


FIG. 9F



$\alpha$ :p63+DAPI



FIG. 10A

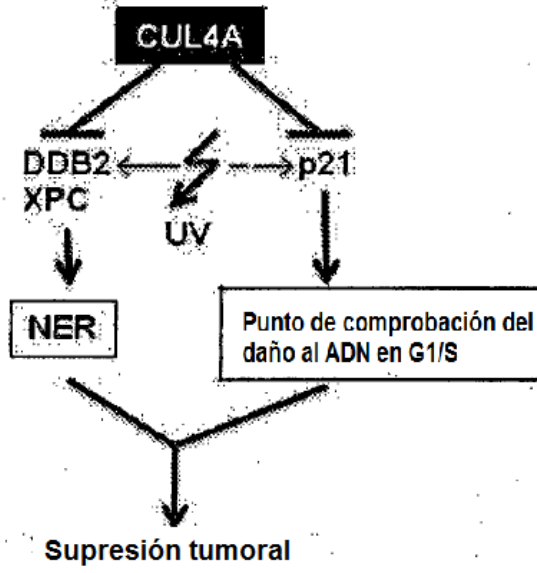


FIG. 10B

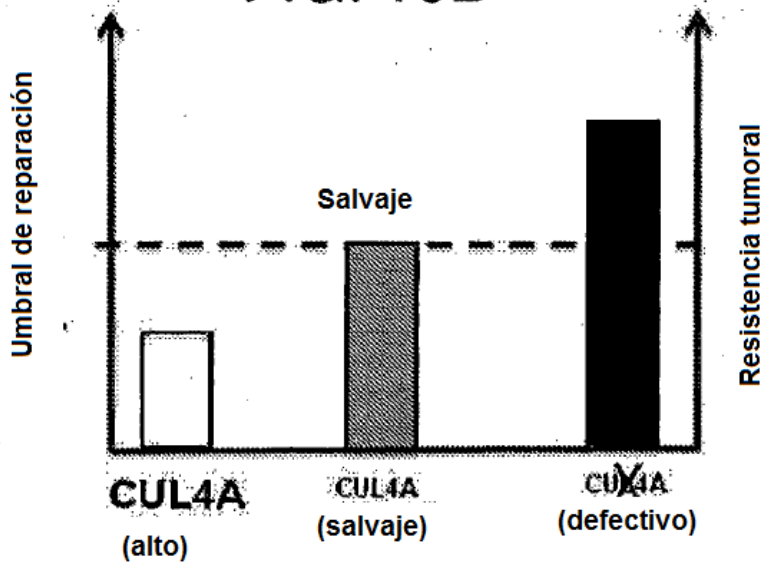


FIG. 11

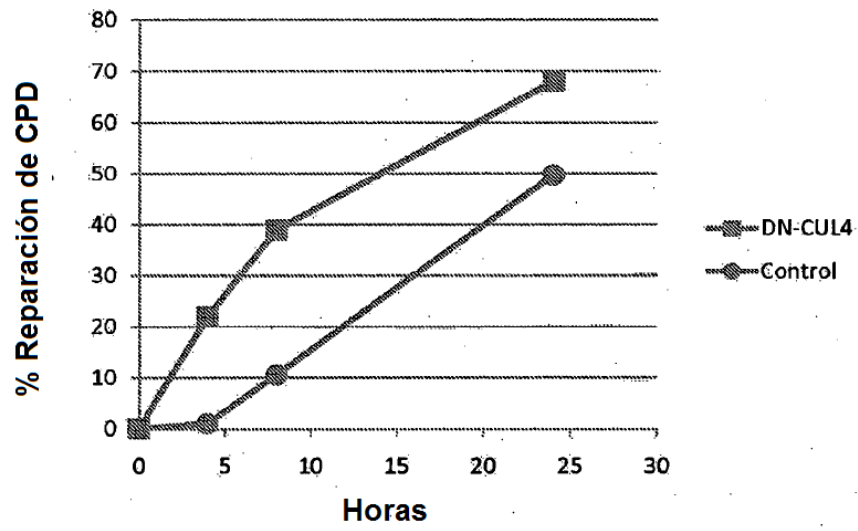


FIG. 12

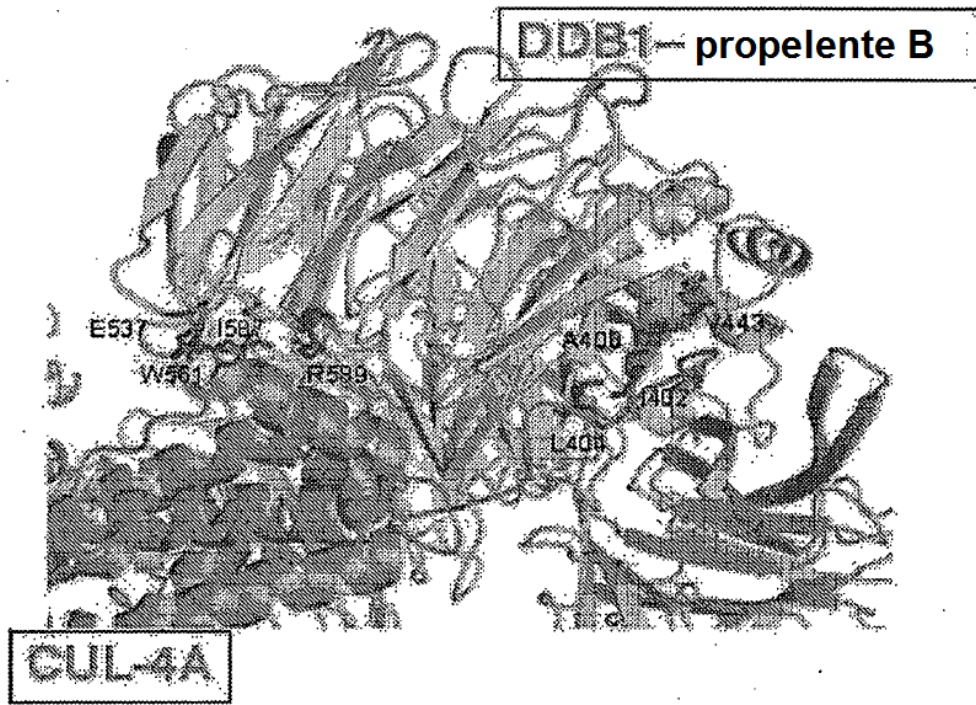


FIG. 13

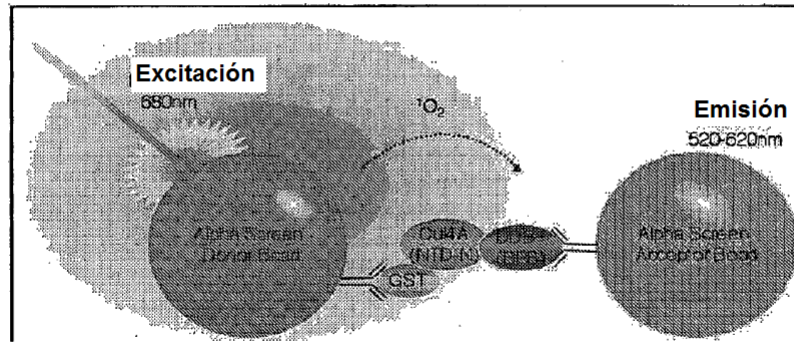


FIG. 14

