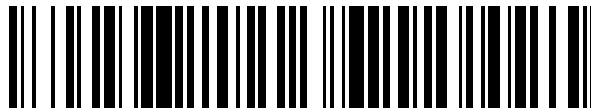


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 786**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12N 9/50** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2012 PCT/SE2012/000129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13039438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012 E 12831894 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2756310**

54 Título: **Examen de inhibidor de desubiquitinación de proteasoma**

30 Prioridad:

**16.09.2011 SE 1100678**

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

**15.09.2017**

73 Titular/es:

**VIVOLUX AB (100.0%)  
Uppsala Science Park Hus Oscar II  
751 83 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**BRNJIC, SLAVICA;  
D'ARCY, PADRAIG;  
LARSSON, ROLF y  
LINDER, STIG**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 632 786 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**

Examen de inhibidor de desubiquitinación de proteasoma

**5 Campo de la invención**

La invención se refiere a un método para examinar un compuesto para determinar si el compuesto es un inhibidor de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad.

**10 Antecedentes de la invención**

Las células tumorales presentan sensibilidad potenciada a alteraciones en el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) lo que hace que sea una diana atractiva para el desarrollo de terapias anticancerosas (1). Los sustratos etiquetados con ubiquitina se reconocen para su destrucción mediante el proteosoma 26S; un complejo multisubunidad que comprende un núcleo 20S proteolítico (CP 20S) ocupado por partículas reguladoras 19S (19S RP) (2,3). El CP 20S ha evolucionado como una importante diana para el desarrollo de fármacos anticancerosos, lo que dio como resultado la aprobación de bortezomib (Velcade®) para el tratamiento de leucemia mieloica (4). Se sabe que el compuesto de bajo peso molecular b-AP15 (NSC687852) induce apoptosis independiente de p53 y dependiente de catepsina-D (5,6).

**20 Objeto de la invención**

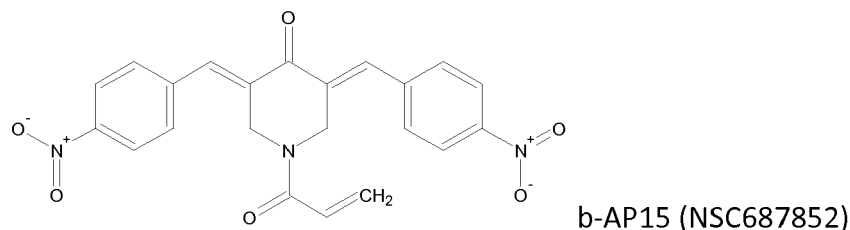
Es un objeto de la invención proporcionar un método para examinar un compuesto para determinar si el compuesto es un inhibidor de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad.

Otro objeto de la invención es proporcionar inhibidores de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad identificados mediante el método.

Objetos adicionales de la invención resultarán evidentes estudiando el siguiente sumario de la invención, varias realizaciones preferidas de la misma ilustradas en un dibujo y las reivindicaciones adjuntas.

**30 Sumario de la invención**

Según la presente invención se reconoce que el compuesto b-AP15 conocido pertenece a una clase novedosa de inhibidores de proteasoma que anulan la actividad de desubiquitinación (DUB) del 19S RP.



Según la invención se ha encontrado que b-AP15 inhibe la actividad de dos DUB de 19S RP, UCHL5 y USP14 pero no afecta a DUB no proteosómicas. De acuerdo con la inhibición de DUB, el tratamiento con b-AP15 provoca la acumulación de proteínas poliubiquitinadas de peso molecular más alto en comparación con el tratamiento con bortezomib, y da como resultado una respuesta de proteína desplegada más fuerte. Según la invención, también se ha encontrado que la inducción de la apoptosis mediante b-AP15 difiere de la de bortezomib al ser insensible a la alteración del supresor tumoral p53 e insensible a la sobreexpresión del inhibidor de la apoptosis Bcl-2. Se ha encontrado además que tratamiento con b-AP15 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de tumores sólidos. En consecuencia, inhibir la actividad de DUB del 19S RP es una opción viable para el tratamiento de cáncer. Por este motivo, los compuestos que comparten el patrón de actividad de b-AP15 son candidatos para el desarrollo de fármacos anticancerígenos potentes. Por tanto, el método mediante el cual se ha identificado que b-AP15 posee las propiedades valiosas mencionadas anteriormente es aplicable a otros compuestos de patrón de actividad desconocida y útil para identificar si comparten o no las propiedades mencionadas anteriormente de b-AP15. Si las comparten, los compuestos así identificados tienen potencial como candidatos para el desarrollo de medicamentos anticancerígenos.

Específicamente, según la presente invención se da a conocer un método para examinar un compuesto para determinar si el compuesto es un inhibidor de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad, comprendiendo el método poner en contacto el compuesto con partículas reguladoras 19S (19S RP) humanas de proteasoma 26S y determinar si el compuesto inhibe la actividad de las enzimas de desubiquitinación (DUB) UCHL5 y USP14, y una etapa adicional de determinar si el compuesto afecta a la actividad de enzimas de DUB asociadas no proteosómicas, en el que la inhibición de las actividades de UCHL5 y USP14 y la actividad no afectada de enzimas de DUB

asociadas no proteosómicas indica que el compuesto es un inhibidor de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad. Se prefiere que las enzimas de DUB asociadas no proteosómicas comprendan al menos una de UCHL1, UCHL3, USP2, USP7, USP8.

5 Según otro aspecto preferido de la invención, la determinación de la inhibición de actividades de UCHL5 y USP14 se realiza con un ensayo realizado con 19S RP humanas con HA-ubiquitina o ubiquitina-AMC vinilsulfona como sustrato.

10 Para caracterizar adicionalmente los efectos provocados por b-AP15, la firma de expresión génica de células tratadas con este compuesto se comparó con una colección de firmas de expresión para más de 1300 compuestos bioactivos proporcionados por la base de datos CMAP ([www.broad.mit.edu/cmap](http://www.broad.mit.edu/cmap)) (7). El tratamiento con b-AP15 indujo un perfil de expresión génica comparable al de varios inhibidores de proteasoma caracterizados, MG-262 (8), 15-prostaglandina J2 (9), celastrol (10) y witaferina A (11) que están entre los inhibidores más activos. Para confirmar que b-AP15 bloquea la función de proteasoma celular, se usó una línea celular indicadora, que expresa ubiquitina etiquetada con proteína fluorescente amarilla (UbG76V-YFP) que se marcó constitutivamente para la degradación proteosómica (12). La inmunotransferencia y la citometría de flujo revelaron una acumulación dependiente de la dosis del indicador Ub-YFP (IC<sub>50</sub>=0,8 μM) sugiriendo un daño de la función de proteasoma. Puesto que la inhibición de la función de proteasoma se caracteriza por defectos en el recambio de la ubiquitina (13) se trataron células de HCT116 carcinoma de colon con el compuesto y se analizó el nivel de conjugación de ubiquitina mediante inmunotransferencia. El tratamiento con b-AP15 provocó la acumulación dependiente del tiempo de proteínas poliubiquitinadas de un peso molecular más alto en comparación con el inhibidor de CP 20S bortezomib, sugiriendo que b-AP15 inhibe una rama alternativa de la UPS.

25 El recambio de muchas proteínas reguladoras del ciclo celular se controla mediante el UPS que incluye inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina p21 Cip1, p27 Kip1 y el supresor tumoral p53 (4). El tratamiento con b-AP15 aumentó sus niveles de manera dependiente de la dosis. En cambio no se observó aumento con respecto al nivel demarcadores de daño en ADN tales como p53 (at Ser 15) (14) o H2AX (at Ser 139) (15) fosforilado, sugiriendo que b-AP15 no es un agente genotóxico. La acumulación de reguladores de ciclo celular era concomitante con la detención del ciclo celular en el límite de la fase G2/M. Tan pronto como 6 h tras el tratamiento con b-AP15 las células comenzaron a acumularse en la fase G2/M; la exposición durante un tiempo prolongado dio como resultado un aumento en el contenido de ADN de sub G1.

35 El aumento en el contenido de ADN de sub G1 se asocia con (i) activación del mediador de apoptosis caspasa-3 y (ii) con escisión de los sustratos de caspasa poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) y citoqueratina-18. Se observaron escisión de caspasa de citoqueratina-18 y viabilidad celular disminuida al mismo intervalo de concentraciones que la acumulación inducida del indicador Ub-YFP. La inducción de apoptosis mediante bortezomib es dependiente de p53 y se inhibe mediante la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 (16,17). Mediante el uso de clones isogénicos de células de cáncer de colon HCT116 se encontró que b-AP15 induce la escisión de caspasa de citoqueratina-18 no afectada por alteración genética de p53 o sobreexpresión de Bcl-2. Además, la alteración genética de los reguladores apoptóticos BAX o PUMA no afecta a sensibilidad a b-AP15, mientras que se inhibe la apoptosis inducida por bortezomib.

45 CP 20S contiene las subunidades proteolíticas β1, β2 y β4 responsables de actividades de tipo caspasa, de tipo tripsina y de tipo quimotripsina del proteosoma, respectivamente (18). Experimentos *in vitro* usando sustratos específicos de actividad no muestran alteración en ninguna de estas actividades tras el tratamiento con exceso molar de b-AP15. Ensayos de recubrimiento con sustrato adicionales revelaron la presencia de proteasomas 26S ocupados doble e individualmente tras el tratamiento con b-AP15 sugiriendo que la disminución de la función proteómica observada en células no estaba provocada por la disociación del RP19S y CP 20S 19,20.

50 b-AP15 comprende una entidad dienona α-β con dos carbonos β estéricamente accesibles. Se ha descrito anteriormente un farmacóforo estructuralmente similar que está compuesto por una clase de inhibidores de ubiquitina isopeptidasa (21). Sin embargo, cuando se sometió a prueba la actividad de DUB celular usando ubiquitina-7-amido-4-metilcoumarina (Ub-AMC) sobre células tratadas con b-AP15, no pudo observarse reducción en la escisión de Ub-AMC. Esto demuestra que b-AP15 no es un inhibidor de DUB general. En opinión de los presentes inventores las similitudes en la estructura del farmacóforo y los datos que muestran que b-AP15 inhibe actividad de proteasoma independiente de la CP 20S indican que b-AP15 representa una clase novedosa de inhibidores de proteasoma que bloquean la actividad de desubiquitinación del RP19S.

60 Los ensayos *in vitro* usando Ub-AMC y RP19S purificada o proteasomas 26S confirmaron que b-AP15 inhibe la actividad de desubiquitinación de tanto RP19S como de proteasoma 26S. Para este fin se evaluó la capacidad de b-AP15 para inhibir la escisión de ubiquitina-GFP recombinante. La ubiquitina-GFP recombinante es un sustrato para actividad de DUB de RP19S (22). El tratamiento de RP19S con b-AP15 inhibió eficazmente la escisión de Ub-GFP. El tipo de enlaces de ubiquitina presentes en la cadena de poliubiquitina determina el destino de un sustrato modificado con ubiquitina. Cadenas de poliubiquitina unidas a K48 generalmente seleccionan como diana proteínas conjuntamente para la degradación (23), mientras que cadenas unidas a K63 están implicadas en papeles no proteolíticos incluyendo reparación de ADN (24) y segregación de cromosomas mitóticos (25). Las reacciones de

desensamblaje de cadenas de ubiquitina revelaron que b-AP15 inhibía el procesamiento de RP19S de tanto K48 como K63 unidos a tetrámeros de ubiquitina. La inhibición del desensamblaje de cadenas de ubiquitina observada podría explicar la acumulación de conjugados de ubiquitina de alto peso molecular en células tratadas con b-AP15.

5 La actividad de desubiquitinación del proteasoma se atribuye a la acción de tres DUB, UCHL5, USP14 y POH1, todas localizados dentro del RP19S 26-28. Tanto UCHL5 como USP14 son sensibles a N-etilmaleimida (NEM), un inhibidor general de cisteína proteasas, mientras que POH1 es insensible a la inhibición por NEM pero sensible a quelatos de metal tales como N,N,N,N-tetrakis-(2-piridilmetil)etilenodiamina (TPEN) (29). Los experimentos de inhibición mostraron que la actividad de DUB residual estaba presente incluso tras el cotratamiento de RP19S con NEM y b-AP15. Esta actividad de DUB residual se suprimió tras cotratamiento de RP19S con b-AP15 y TPEN, sugiriendo que b-AP15 inhibe principalmente uno o ambos de las DUB sensibles a NEM. Para identificar específicamente que las DUB se inhibieron mediante tratamiento con b-AP15, se realizaron experimentos de marcaje competitivo usando ubiquitina-vinilsulfonona etiquetada con hemaglutinina (HA-UbVS), una sonda dirigida al sitio activo que reacciona irreversiblemente con las DUB de la clase de cisteína (26). La incubación de RP19S o proteasomas 26S con b-AP15 suprimió el marcaje de Ub-VS de dos DUB de pesos moleculares correspondientes a UCHL5 y USP14 sin afectar a la actividad de las dos enzimas de DUB asociadas no proteosómicas relacionadas, UCHL1 y USP5.

20 Para confirmar que los resultados obtenidos mediante ensayos *in vitro* pueden extenderse a efectos citotóxicos observados sobre células, se realizaron experimentos de marcaje adicional, usando HA-UbVS sobre lisados derivados de células tratadas con fármacos (1  $\mu$ M, 3 h). El análisis de inmunotransferencia mostró un desplazamiento decreciente en el peso molecular de tanto USP14 como UCHL5 debido a una pérdida de actividad y disminución de marcaje de HA-UbVS. De manera importante, no se observó alteración en el perfil de marcaje HA-UbVS general de las DUB de células tratadas o lisados de células tratados, que es una confirmación adicional de b-AP15 que no es un inhibidor de DUB general.

30 Con el fin de investigar el efecto de b-AP15 sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, se le administró el compuesto a ratones que portaban o bien un tumor humano o bien xenoinjertos de ratón. Se eligieron carcinoma de cabeza y cuello FaDu como un xenoinjerto de ratón SCID ambos como modelo para un tumor p53mut y puesto que este modelo es adecuado para estudios usando biomarcadores de muerte celular circulante (30). Se observó inhibición significativa del crecimiento de tumor FaDu tras tratamiento diario con b-AP15 (volumen de tumor de control/tratado, T/C=0,4, p=<0,001). De manera similar b-AP15 (programa de día con tratamiento/2 días sin tratamiento) inhibió el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6J que portaban carcinomas de pulmón (T/C=0,16, p=<0,01). No se observaron efectos secundarios en el grupo tratado con b-AP15 con una pérdida de peso promedio de <5% en la finalización del estudio. Para examinar si b-AP15 promueve la muerte de células tumorales *in vivo*, se analizaron los niveles en plasma de citoqueratina-18 (CK18). La citoqueratina-18 es un biomarcador para apoptosis y muerte celular (30,31); se usaron ensayos específicos para esta proteína humana. El tratamiento con b-AP15 da como resultado un aumento significativo de los niveles de CK18 humana derivada de tumores FaDu en la circulación (p=0,01). Los niveles de CK18 escindida con caspasa (CK18-Asp396) aumentaron moderadamente en comparación con niveles totales, sugiriendo que la apoptosis no es el mecanismo exclusivo de la muerte celular en tumores tratados con b-AP15. Para investigar la capacidad de b-AP15 para inhibir la desubiquitinación de proteasoma *in vivo*, se analizó la acumulación de conjugados de poli-ubiquitina por medio de anticuerpos específicos para cadenas de poliubiquitina unidas a K48. Los análisis histológicos de tumores tratados confirmó la acumulación de conjugados de poli-ubiquitina. Estos resultados indican que b-AP15 inhibe la actividad de DUB de proteasoma y el crecimiento tumoral *in vivo*.

50 Las hidrolasas C-terminales de ubiquitina (UCH) y proteasas específicas para ubiquitina (USP) son los principales subgrupos de los aproximadamente cien DUB codificadas por el genoma humano (32). El mecanismo de especificidad de b-AP15 para UCHL5 y USP14 en el RP19S puede relacionarse con conformaciones únicas de estas enzimas en la RP19S o debido a alteraciones inducidas por fármacos de la estructura de RP19S. Los presentes hallazgos están de acuerdo con informes en la técnica que indican que la pérdida de tanto UCHL5 como USP14, al contrario que la pérdida de o bien uno solo, conduce a la acumulación de proteínas poliubiquitinadas o bien la inhibición de la degradación de proteínas celulares (33).

55 La capacidad de b-AP15 para inducir la apoptosis de sobreexpresión de células Bcl-2 o defectuosas en p53 es de particular interés en la consideración del papel de estas proteínas en la resistencia a bortezomib (16,17,34). Tanto b-AP15 como bortezomib bloquean la actividad de proteasoma celular pero inducen la apoptosis mediante rutas diferentes. Sin restringirse a la teoría, la observación que asocia esta inhibición de DUB con complejos de ubiquitina-sustrato de alto peso molecular parece que es de relevancia particular en este contexto. Se observó una fuerte expresión de genes de chaperona en células tratadas con bAP15, lo que indica la inducción de una respuesta proteotóxica.

60 A continuación la invención se describirá en mayor detalle por referencia a realizaciones preferidas de la misma ilustradas mediante un dibujo que comprende varias figuras.

65

#### Descripción de las figuras

Las figuras de los dibujos ilustran:

- 5 Figuras 1a-1f: inhibición mediante b-AP15 del sistema de ubiquitina-proteasoma;
- Figuras 2a-2e: inhibición mediante b-AP15 de la desubiquitinación mediante el RP19S;
- Figuras 3a-3d: inhibición mediante b-AP15 de las DUB RP19S, UCHL5 y USP14;
- 10 Figuras 4a-4h: inhibición mediante b-AP15 del crecimiento tumoral *in vivo*;
- Figura 5: ausencia de daño en ADN provocado potencialmente por b-AP15;
- 15 Figuras 6a-6f: inducción por b-AP-15 de la apoptosis e inhibición de la supervivencia celular de células HCT-116;
- Figura 7: curvas de respuesta a la dosis de la inducción de la apoptosis en clones isogénicos de células HCT-116;
- Figuras 8a, 8b: ausencia de inhibición mediante b-AP15 de la actividad proteolítica de proteasoma;
- 20 Figuras 9a, 9b: ausencia de disociación de partículas 19S y 20S provocada potencialmente por b-AP15 o alteración de la unión a ubiquitina provocada por b-AP15;
- Figura 10 b-AP15: que no es un inhibidor de DUB general;
- 25 Figuras 11a-11c: caracterización bioquímica de la unión a b-AP15;
- Figuras 12a-12c: b-AP15 que no es un inhibidor de DUB general;
- Figura 13: ausencia de alteración significativa del peso del animal mediante tratamiento con b-AP15;
- 30 Figura 14: sensibilidad de líneas celulares en la línea de células NC160 a b-AP15 y bortezomib.

### Descripción de realizaciones preferidas

#### 35 Métodos

Se realizaron ensayos de actividad de proteasoma *in vitro* en placas de microtitulación de 96 pocillos negras usando proteasoma 20S humano (Boston Biochem) en tampón de reacción (Hepes 25 mM, EDTA 0,5 mM, SDS al 0,03%) con Suc-LLVY-AMC, Z-LLEAMC o Boc-LRRAMC usados como sustratos para actividad de proteasoma. Se realizaron ensayos de actividad con desubiquitinasa con RP19S humana (Boston Biochem) con ubiquitina-AMC como sustrato. Para estudios de xenoinjertos se inyectó por vía subcutánea una suspensión de células de 100  $\mu$ l que contenía  $1 \times 10^6$  células de cabeza-cuello FaDu o  $2 \times 10^5$  de células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) en el costado de ratones SCID o C57BL/6J. Después de que los ratones contrajesen el tumor se dispusieron de manera aleatoria en grupos de control o de tratamiento y se les administraron 5 mg  $\text{kg}^{-1}$  de b-AP15 o de vehículo. Se determinaron los niveles de apoptosis *in vivo* y la muerte celular a partir de la detección de caspasa escindida y niveles totales de citoqueratina-18 en plasma usando ensayos M30 Apoptosense® y M65 ELISA® (Peviva). Los métodos se describen a continuación en detalle.

50 **Reactivos.** Se obtuvieron reactivos a partir de las siguientes fuentes: proteasoma 20S (E-360), proteasoma 26S (E-365), proteasoma 19S (E-366), Suc-LLVY-AMC (S-280), Z-LLE-AMC (S-230), Boc-LRR-AMC (S-300), ubiquitina-AMC (U-550), tetra-ubiquitina K63 (UC-310), tetra-ubiquitina K48 (UC-210), conjunto de enzima de desconjugación (KE10), HA-ubiquitina vinilsulfona (U-212) (Boston Biochem); anti-actina (AC-15), ODC-1 (HPA001536) (Sigma Aldrich); anti-LC-3 (2775), anti-GAPDH (2118), anti-p44/42 MAPK (4695), anti-fosfo-p44/42 MAPK (9101) (Cell Signaling); N-etilmaleimida (34115) (EMD Chemicals); anti-ubiquitina K48 (Apu2), anti-ubiquitina (MAB1510) (Millipore); anti-p53 (DO1), anti-UCHL5 (H-110), Hdm2 (SMP14) (Santa Cruz); anti-PARP (C2-10), anti-p27 (G173-524), caspasa 3 anti-activa (C92-605) (BD Biosciences); anti-USP14 (A300-919A) (Bethyl Laboratories); anti-HA (12CA5) (Roche); b-AP15 (NSC687852) se obtuvo del Developmental Therapeutics Program del US National Cancer Institute (<http://www.dtp.nci.nih.gov>) o se sintetizó mediante células OncoTargeting AB (Uppsala, Suecia). Se obtuvo bortezomib del departamento de oncología del hospital de Karolinska (Suecia).

60 **Cultivo celular.** Se mantuvieron células MCF7 en MEM/suero bovino fetal al 10%. Se mantuvieron células HCT-116 p53 +/+, p53 -/-, Bcl-2 +/+, PUMA -/- y BAX -/- en medio modificado 5A de McCoy/suero bovino fetal al 10%. Se generaron las HCT-116 p53 +/+, p53 -/-, PUMA -/- y BAX -/- tal como se describió (36). Se generó la línea celular HCT-116 Bcl-2 +/+ transfectando células HCT-116 p53 +/+ parentales con pCEP4 Bcl-2 (plásmido 16461 Addgene) (37) y aislando clones de alta expresión. Se mantuvieron células FaDu y LLC3 en medio alto en glucosa DMEM complementado con suero bovino fetal al 10%, piruvato de Na, Hepes y aminoácidos no esenciales. Se mantuvieron

células de carcinoma 4T1.12B en medio RPMI complementado con suero bovino fetal al 10%. La línea celular indicadora de proteasoma MeJuSo Ub-YFP se generó tal como se describe (38). Se mantuvieron células en medio de Eagle modificado por Dulbecco/suero bovino fetal al 10%. Se generó la línea celular epitelial de la retina tal como se describe (39). Se mantuvieron todas las células a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%.

*Análisis de mapa de conectividad.* Se realizó el análisis de expresión génica basado en microalineamiento y el análisis de mapa de conectividad (CMAP) como se describió previamente (40). En resumen, se expusieron células MCF7 a b-AP15 (1 µM, 6 h) o vehículo (DMSO al 0,1%, 6 h). Se aisló ARN (RNeasy miniprep kit, Qiagen) seguido por control de calidad, etiquetado e hibridación a microalineamientos de Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix Inc). Se normalizaron datos sin procesar usando Mas5 (Affymetrix Inc.) y rango ordenado. Para la selección de los 30 transcritos más inducidos (etiquetas ascendentes) y los 30 más suprimidos (etiquetas descendentes) se usaron los siguientes criterios: Etiquetas ascendentes, llamada presente y expresión sobre 300 arbitrarios en el experimento con b-AP15; etiquetas descendentes, llamada presente tras tanto b-AP15 como tratamiento con vehículo, y expresión sobre 300 unidades arbitrarias en el experimento de vehículo. Para la compatibilidad de CMAP solo se usaron etiquetas (es decir sondas) presentes en HG U133A. Los datos de expresión sin procesar y normalizados se han depositado en Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de registro GSE24150.

*Ensayos de proteasoma e inhibición de DUB.* Se realizaron ensayos de actividad de proteasoma *in vitro* usando CP 20S (2nM) (Boston Biochem) a 37°C en 100 µl de tampón de reacción (Hepes 25 mM, EDTA 0,5 mM, SDS al 0,03%). Se incubaron las muestras durante 10 min con el compuesto indicado seguido por adición de Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC o Boc-LRRAMC 10 µM para la detección de actividad de tipo quimotripsina, de tipo caspasa y de tipo tripsina respectivamente. Para los ensayos de inhibición de DUB RP19S (5 nM), se incubaron 26S (5 nM) UCH-L1 (5 nM), UCH-L3 (0,3 nM), USP2CD (5 nM) USP7CD (5 nM) USP8CD (5 nM) y BAP1 (5 nM) con b-AP15 seguido por adición de ubiquitina-AMC (1000 nM). Se monitorizó la fluorescencia usando un contador Wallac Multilabel o Tecan Infinite M1000 equipado con filtros de excitación a 360 nm y emisión a 460 nm. Ensayos de superposición de sustrato. Se realizó electroforesis en gel nativa tal como se describió (41). En resumen, se mezclaron 4 µg de proteasoma 26S purificada (Boston Biochem) con b-AP15 10 o 50 µM y se incubó a 37°C durante 10 min. Se revelaron las muestras sobre PAGE no desnaturizante al 4%. Se sumergieron geles en tampón de ensayo (Tris-HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ATP 1 mM, Suc-LLVY-AMC 0,1 mM) y se visualizaron proteasomas bajo iluminación UV.

*Ensayo de escisión de ubiquitina.* El plásmido Ub-GFP recombinante pet19b Ub-M-GFP se generó tal como se describe (42). En resumen, se purificó Ub-GFP recombinante a partir de células de *E. coli* BL21 mediante purificación por afinidad de His. Para ensayos de escisión se incubó RP19S (25 nM) con NEM 10 mM, TPEN 250 µM o b-AP15 50 µM durante 10 min seguido por la adición de Ub-GFP recombinante (200 nM). Se realizaron reacciones de desensamblaje de cadena de ubiquitina esencialmente como anteriormente excepto que se sustituyeron tetrámeros de ubiquitina unidos a K48 o K63 (50 ng) para Ub-GFP. El nivel de escisión Ub-GFP o desensamblaje de ubiquitina se determinó mediante inmunotransferencia con anticuerpos antiubiquitina. El sustrato de Hdm2 ubiquitinado se generó según el protocolo de Boston Biochem (K-200). Para el ensayo de escisión se incubó RP19S (25 nM) con b-AP15 o DMSO 50 µM durante 10 min seguido por la adición de sustrato de Hdm2 ubiquitinado (100 nM). La escisión de sustrato de Hdm2 ubiquitinado y Hdm2 ubiquitinado se determinó mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-Hdm2.

*Aislamiento de proteasoma:* se trataron células HCT-116 con bortezomib (100 nM) o b-AP15 (1 mM) durante 3 horas. Tras la estimulación, se lisaron las células en HEPES 50 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 2 mM, DTT 1 mM y digitonina al 0,025%. Se sonicaron las muestras brevemente y se incubaron durante 15 min sobre hielo. Se aislaron proteasomas de estas muestras según el protocolo del fabricante.

*Marcaje con UbVS de las DUB.* Para el marcaje de las DUB en lisados celulares se recogieron mediante tripsinización células subconfluentes, se lavaron tres veces con PBS, y se centrifugaron a 1500 RPM durante 5 min. Se lisaron aglomerados celulares con tampón (HEPES 50 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 2 mM, DTT 1 mM) sobre hielo durante 15 min. Se retiraron los residuos mediante centrifugación y se marcaron 25 µg de proteína con HA-UbVS 1 µM durante 30 min a 37°C. Se revelaron las muestras mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante inmunotransferencia con los anticuerpos indicados.

*Determinación de apoptosis y viabilidad celular.* Para la determinación de apoptosis parental se trataron células HCT-116 p53 +/+ con las dosis aumentadas de bortezomib o b-AP15 durante 24 h. Las dosis de tratamiento se basaron en la concentración de fármaco que dio como resultado apoptosis máxima a lo largo de un periodo de 24 h. Se sembraron células HCT-116 en placas de microtitulación de 96 pocillos a 10.000 células por pocillo y se incubaron durante la noche. Se trataron células con el fármaco indicado durante 24 h. Al final del periodo de incubación, se añadió NP40 al medio de cultivo de tejido al 0,1% y se sometieron a ensayo 25 µl del contenido de cada pocillo usando el ELISA M30-Apoptosense® como se describió previamente (43). Se determinó la viabilidad celular midiendo la actividad de ácido fosfatasa o usando el método FMCA (44). Para la actividad de ácido fosfatasa, se sembraron células a 5000 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 12 h a 37°C. Se añadieron compuestos a las células en medios de crecimiento y se incubaron durante 72 h a 37°C. Se lavaron las células con 200 µl de PBS caliente. Se añadieron 100 µl de fosfato de para-nitrofenilo (pNPP, 2 mg/ml)

en tampón de acetato de Na pH 5 (NaAc 0,1 M, Triton-X-100 al 0,1%) por pocillo. Se incubaron células durante 2 h tras lo cual se detuvo la reacción mediante adición de NaOH 1N. Se midió la absorbancia a 405 nm.

Para el ensayo de FMCA se sembraron células en las placas de 384 pocillos preparadas con fármaco usando el robot para pipetear Precision 2000 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT). Se incubaron las placas durante 72 h y entonces se transfirieron a un sistema de núcleo HTS SAIGAN integrado que consiste en un robot ORCA (Beckman Coulter) con incubadora de CO<sub>2</sub> (Cytomat 2C, Kendro, Sollentuna, Suecia), módulo dispensador (Multidrop 384, Titertek, Huntsville, AL), módulo lavador (ELx 405, Bio-Tek Instruments Inc), estación para retirar tapas, hoteles de placas, lector de código de barras (Beckman Coulter), manipulador de líquidos (Biomek 2000, Beckman Coulter) y un lector objetivos múltiples (FLUOstar Optima, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Alemania) para FMCA automatizado. Se define el índice de supervivencia (SI) como la fluorescencia de los pocillos de prueba en porcentaje de controles con valores de blanco sustraídos.

*Análisis de ciclo celular.* Para la determinación del ciclo celular se trataron células HCT-116 con b-AP15 o DMSO. Se recogieron células mediante tripsinización, se lavaron y se fijaron en EtOH enfriado con hielo al 70% durante 12 h. Se resuspendieron las células en disolución de tinción que contenía yoduro de propidio (50 µg/ml) y ARNasa A (0,5 µg/ml) en PBS. Se ejecutaron las muestras en un FACScalibur de BD. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determinó usando software ModFit.

*Experimentos de tumor in vivo.* Se realizaron experimentos de animales de plena conformidad con las regulaciones estatutarias gubernamentales suecas sobre el bienestar animal bajo permiso del comité ético local. Se alojaron los animales en un máximo de cinco por jaula y se les dotó de agua estéril y comida a voluntad. Se monitorizaron todos los ratones y se pesaron diariamente. Para el modelo de carcinoma de cabeza y cuello se inyectó por vía subcutánea una suspensión de células de 100 µl que contenían  $1 \times 10^6$  células de FaDu en el costado de la parte posterior derecha de los animales. Tras la inyección, se midió diariamente el crecimiento tumoral con calibradores y se calculó el volumen de tumor mediante la fórmula  $L \times W^2 \times 0,44$ . Cuando los tumores habían crecido hasta un tamaño de aproximadamente 200 mm<sup>3</sup> (día 0) se aleatorizaron los ratones para recibir o bien vehículo (n=10) o bien b-AP15 5 mg/kg<sup>-1</sup> mediante inyección subcutánea s.c. (n=15) diariamente. Para el modelo de carcinoma de colon, se inocularon por vía subcutánea  $2,5 \times 10^6$  Células de carcinoma de colon HCT-116 transfectadas establemente con Bcl-2 (HCT-116<sup>Bcl-2+</sup>) en el costado derecho de ratones desnudos. Un día tras la inoculación se trataron ratones con 5 mg/kg<sup>-1</sup> mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Se inspeccionaron los animales diariamente para establecer la aparición y crecimiento del tumor. Para el modelo de carcinoma de pulmón se inyectó por vía subcutánea una suspensión de células de 100 µl que contenía  $2 \times 10^5$  células de carcinoma de pulmón de Lewis (LLC) en el costado de la parte posterior derecha de ratones C57/B6. Cuando los tumores habían crecido hasta un tamaño de aproximadamente 50 mm<sup>3</sup> (día 0) se aleatorizaron los ratones para recibir o bien vehículo (n=4) o bien b-AP15 5 mg/kg<sup>-1</sup> i.p. (n=4) con un ciclo de tratamiento que consistía en tratamiento de dos días seguido por dos días sin tratamiento (2 días con tratamiento/2 días sin tratamiento) durante dos semanas. Para el modelo de carcinoma de mama se inyectó por vía subcutánea una suspensión de células de 100 µl que contenía  $1 \times 10^5$  células 4TD en la almohadilla adiposa mamaria derecha de ratones BALB/c. Cuando los tumores habían crecido hasta un tamaño de aproximadamente 25 mm<sup>3</sup> (día 0), se aleatorizaron los ratones para recibir o bien vehículo (n=5) o bien b-AP15 2,5 mg/kg<sup>-1</sup> i.p. (n=5) con un ciclo de tratamiento que consiste en un día de tratamiento seguido por tres días sin tratamiento (1 día tratamiento/3 días sin tratamiento) durante 3 semanas. En los estudios de AML se les inyectó i.v. a ratones C57BL/6J hembra en la vena caudal con  $5 \times 10^5$  células de AML C1498. Tras ocho días se aleatorizaron los ratones para recibir o bien b-AP15 5 mg/kg<sup>-1</sup> (n=10) o bien vehículo (n=10) i.p. durante 7 días (día +8 hasta +14). Diecinueve días después de la inyección de células malignas se sacrificaron todos los ratones y se evaluaron las manifestaciones histopatológicas de hígado, ovarios (órganos diana para este modelo de tumor) y se compararon entre los grupos. Para la administración del fármaco se disolvió b-AP15 en Cremphor EL:PEG 400 (1:1) calentando para proporcionar una concentración de trabajo de 2 mg/ml. Se diluyó la disolución madre de trabajo 1:10 en solución salina normal al 0,9% inmediatamente antes de la inyección.

*Determinación de CK18 escindida con caspasa en plasma de ratón.* Para la medición del fragmento de CK18-Asp396 relacionado con la apoptosis, se recogieron 12,5 ml de plasma 24 h tras el último tratamiento y se analizaron usando el ensayo M30-Apoptosense®. Cada muestra se mezcló con 0,4 ml de reactivo bloqueante heterófilo (Scantibodies Laboratory Inc).

*Determinación de metástasis pulmonar.* Puesto que las células 4T1 son resistentes a 6-tioguanina, la metástasis puede determinarse cultivando tejido homogeneizado en presencia de 6-tioguanina. Para la determinación de células 4T1 metastásicas el protocolo fue tal como se describió (45). En resumen, se homogeneizaron los pulmones de animales tratados o sin tratar y tratados con colagenasa y elastasa. Se hicieron crecer las células en presencia de 6-tioguanina 60 µM durante 2 semanas y el número de colonias metastásicas se determinó mediante tinción Giemsa.

*Inmunotinción.* Se desparafinizaron secciones tumorales con xileno, se rehidrataron y entonces se incubaron durante la noche con ubiquitina K-48 o caspasa 3 activa (1/500) diluida en albúmina de suero bovino al 1% (p/v) y se visualizaron mediante la técnica de complejo avidina-biotina-peroxidasa convencional (Vector Laboratories). Se

realizó la contratinción con hematoxilina de Mayer.

*Análisis estadísticos.* Para comparaciones de grupos de tratamiento, se realizaron la prueba de t para datos independientes (Mann-Whitney), medidas ANOVA repetidas y supervivencia de Kaplan-Meier (prueba de Mantel-Cox). Se realizaron todos los análisis estadísticos usando software GraphPad Prism (versión 5.0). La significancia estadística se logró cuando P era de menos de 0,05.

EJEMPLO 1. *b-AP15 inhibe el sistema de ubiquitina-proteasoma.* La lectura CMAP de células MCF7 tratadas con b-AP15 (1  $\mu$ M) durante 6 h se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Lectura CMAP de células MCF7 tratadas con B-AP15

Rango	Nombre	Célula	Puntuación
1	MG-262	MCF7	1
2	15 $\Delta$ prostaglandina J2	-"	0,999
3	Celastrol	-"	0,966
4	15 $\Delta$ prostaglandina J2	-"	0,940
5	Witaferina A	-"	0,922

b-AP15 inhibe la degradación de YFP etiquetada con ubiquitina en una línea celular indicadora de proteasoma (figura 1a). Se determinaron los niveles de acumulación de <sup>UbG76V</sup>-YFP mediante citometría de flujo e inmunotransferencia; la inmunotransferencia de conjugación de ubiquitina en células HCT-116 tratadas con b-AP15 (1 mM) o bortezomib (100 nM) (la figura 1b). Inmunotransferencia de conjugados de ubiquitina, escisión de PARP de activación con caspasa 3, p53, P21<sup>Cip1</sup> y p<sup>Kip1</sup> en células HCT-116 tras tratamiento de 24 h con las concentraciones indicadas de b-AP15 (figura 1c). Inmunotransferencia de niveles de ODC-1 en células HCT-116 tras el tratamiento con bortezomib (100 mM) o b-AP15 (1  $\mu$ M) (figura 1d); los valores representan unidades de densidad óptica cuantificada de ODC-1 normalizada para dar  $\beta$ -actina. Perfiles de ciclo celular de células HCT-116 tratadas con b-AP15 (figura 1e); se analizaron células mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo. Los niveles de actividad caspasa en células HCT-116 isogénicas tal como se determinó mediante ELISA para citoqueratina-18 escindida con caspasa (CK18-Asp398) tras el tratamiento con bortezomib (100 nM) o b-AP15 (1  $\mu$ M) (\*\*P=0,01, \*\*\*P=0,001) (figura 1f).

EJEMPLO 2. *b-AP15 inhibe la desubiquitinación mediante el RP 19S.* Inhibición de escisión Ub-AMC mediante RP 19S o proteasomas 26S tras el tratamiento con b-AP15; aldehído de ubiquitina (Ubal), un inhibidor de DUB general, se incluyó como control (figura 2a). La inmunotransferencia de RP 19S medió la escisión de Ub-GFP (figura 2b); se pretrataron RP 19S con DMSO o las concentraciones indicadas de b-AP15 seguido por adición de Ub-GFP recombinante como sustrato de DUB. La cinética de escisión de Ub-GFP RP 19S tras tratamiento con b-AP15 (50  $\mu$ M) (figura 2c). b-AP15 inhibe la desubiquitinación de Hdm2 (figura 2d); se añadió Hdm2 ubiquitinada a RP 19S tratado con DMSO o b-AP15 (50  $\mu$ M) seguido por inmunotransferencia. Las reacciones de desensamblaje de cadena de ubiquitina de tetrámeros de ubiquitina unidos a K63/K48 mediante RP 19S tras el tratamiento con DMSO o b-AP15 (50  $\mu$ M) (figura 2e).

EJEMPLO 3. *b-AP15 inhibe las DUB de RP 19S UCHL5 y USP14.* Se pretrató RP 19S con DMSO, NEM (10 mM), b-AP15 (50  $\mu$ M) (figura 3a) o TPEN (250  $\mu$ M) (figura 3b) seguido por adición de Ub-GFP e inmunotransferencia con anticuerpos anti-GFP. Marcaje dirigido a sitios activos de DUB proteosómicas (figura 3c); se pretrataron proteasomas 19S o 26S purificados con DMSO, NEM o bAP15 seguido por marcaje con HA-UbVS e inmunotransferencia. Inmunotransferencia de células HCT116 tratadas con b-AP15 (1  $\mu$ M) durante 3 h (figura 3d); Se marcaron DUB de lisados de células completas con HA-UbVS seguido por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anticuerpos indicados.

EJEMPLO 4. *b-AP15 inhibe el crecimiento tumoral in vivo.* Se aleatorizaron ratones SCID que portaban xenoinjertos de tumor humano FaDu en la toma de tumor (200 mm<sup>3</sup>) y se trataron mediante inyección subcutánea diariamente con o bien vehículo (n = 10) o bien b-AP15 5 mg kg<sup>-1</sup> (n=15) durante 10 días. Volumen de tumor medio  $\pm$  EEM mostrado (\*\*P=<0,001) (figura 4a). Niveles totales de CK18 derivada de tumor y caspasa escindida (CK 18-Asp396) en circulación tras el tratamiento con b-AP15 (\*\*P=0,01) (figura 4b). La supervivencia libre de enfermedad de ratones desnudos se desafió con células HCT-116<sup>Bel-2+</sup> (figura 4c). Se trataron ratones con vehículo (n=6) o b-AP15 5 mg kg<sup>-1</sup> (n=6) 4-5 veces semanalmente durante 3 semanas y se monitorizó durante la aparición de tumor (rango log, P=0,0136, razón de riesgo = 7,9). Se trataron ratones C57BL/6J que portaban tumores de carcinoma de pulmón singénico (LLC) con o bien vehículo (n=4) de b-AP15 5 mg kg<sup>-1</sup> (n=4) en un ciclo de un día con tratamiento/dos días sin tratamiento (figura 4d); volumen de tumor medio  $\pm$  EEM mostrado (P=<0,01). Se trataron ratones BALB/c que portaban carcinomas de mama ortotópicos (4T1) con o bien vehículo (n=5) o bien b-AP15 2,5 mg kg<sup>-1</sup> (n=5) en un ciclo de un día con tratamiento/tres días sin tratamiento (la figura 4e); volumen de tumor medio  $\pm$  EEM mostrado (\*\*P=<0,01). Diagramas de cajas y bigotes de colonias metastásicas pulmonares de carcinomas de mama 4T1 tratados con vehículo o b-AP15 (la figura 4f); las cajas representan cuartiles superiores e inferiores y la mediana, los bigotes muestran valores máximos y mínimos. Tinción inmunohistoquímica representativa para acumulación de



ubiquitina unida a K48 y caspasa-3 escindida en tumores 4T1 tratados con vehículo y b-AP15, aumento original x 20 (figura 4g). Infiltración de AML en hígado y ovario de ratones tratados con vehículo y b-AP15 (figura 4h). Hígado de ratones tratados con vehículo con invasión mostrada de blastocitos leucémicos junto con agotamiento de glucógeno y hemorragia no específica. Sección de ovarios de ratones tratados con vehículo con invasión masiva mostrada de blastocitos leucémicos y sangrado intersticial. En cambio, hígado y ovarios de ratones tratados con b-AP15 mostraron pocos blastocitos infiltrados y morfología normal (aumento original x 20).

EJEMPLO 5. *b-AP15 no induce daño de ADN.* Se trataron células HCT-116 con b-AP15 o doxorubicina (100 nM, como control positivo para estrés genotóxico durante 18 h) (la figura 5). Se inmunotransfirieron lisados de células con anticuerpos para p53 fosforilado y marcador Ax H2 histona para daño de ADN para niveles totales de p53 y  $\beta$ -actina como controles de carga.

EJEMPLO 6. *b-AP15 induce apoptosis e inhibe la supervivencia celular de células HCT-116 mientras que PBMC (células mononucleares de sangre periférica) y hTERT-RPE1 inmortalizado son menos sensibles.* Se trataron células HCT-116 con concentraciones crecientes de b-AP15 durante 24 h y se determinaron los niveles de apoptosis midiendo los niveles de citoqueratina-18 escindida con caspasa (CK18) mediante ensayo ELISA (figura 6a). Se trataron células HCT-116 con concentraciones crecientes de b-AP15 durante 48 h. Se determinó la viabilidad celular mediante ensayo de actividad de ácido-fosfatasa. Valores de media  $\pm$  d.e. mostrados (figura 6b). Se trataron células HCT-116 o hTERT-REP1 con concentraciones crecientes de b-AP15 durante 72 h seguido por análisis de citotoxicidad usando el método FMCA (44) (figura 6c). Se trataron células HCT-116 o hTERT-REP1 con concentraciones crecientes de bortezomib durante 72 h seguido por análisis de citotoxicidad usando el método FMCA (figura 6d). HTERT-RPE1 es una línea celular de epitelio de pigmento de retina humana inmortalizada (39). Se determinó  $CI_{50}$  a partir de curvas de log de concentración/efecto en Graph Pad Prism (GraphPad Software Inc. CA, EE.UU.) usando análisis de regresión no lineal (modelo de cuatro parámetros con pendiente de Hill variable) (figuras 6e, 6f). Se generaron curvas de concentración/respuesta en diluciones de dos veces en ocho concentraciones de b-AP15 y bortezomib por triplicado usando el ensayo FMCA. Los resultados se expresan como  $\log CI_{50} + DE$  a partir de cuatro o cinco experimentos independientes (HCT-116, n=5; PBMC, n=4; hTERT-RPE1, n=5).

EJEMPLO 7. *Curvas de respuesta de dosis de la inducción de la apoptosis en clones isogénicos de células HCT-116.* Se trataron células HCT-116 con concentraciones crecientes de bortezomib o b-AP15 durante 24 h y se determinaron los niveles de apoptosis midiendo los niveles de citoqueratina-18 escindida con caspasa (CK-18) mediante ensayo ELISA (Cambio en veces de la media  $\pm$  d.e., n=4) (figura 7).

EJEMPLO 8. *b-AP15 no inhibe las actividades proteolíticas del proteosoma.* Se pretrató CP 20S (2nM) con DMSO, b-AP15 (50  $\mu$ M) o bortezomib (100 nM) durante 5 min en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, EDTA 0,5 mM, SDS al 0,03%) seguido por la adición de 100  $\mu$ M de los sustratos fluorogénicos Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC o Boc-LRR-AMC para análisis de actividades de proteasomas de tipo quimotripsina, de tipo caspasa y de tipo tripsina, respectivamente (la figura 8a). Se trataron proteasomas 26S (2 nM) en tampón de ensayo (HEPES 25 mM, NaCl 50 mM,  $MgCl_2$  1 mM, ATP 2 mM, DTT 1 mM) como en el experimento ilustrado en la figura 8a (figura 8b). Los valores representan escisión en veces en unidades fluorescentes relativas.

EJEMPLO 9. *b-AP15 no produce disociación de partículas 19S y 20S o alteran unión de ubiquitina.* Ensayo de superposición de sustrato de proteasomas tratados con b-AP15 (figura 9a). Se trató proteasoma 26 S purificado con b-AP15 (10  $\mu$ M o 50  $\mu$ M) separada mediante electroforesis en gel nativa y se sometió a ensayo para determinar la actividad proteolítica usando Suc-LLVY-AMC como sustrato fluorogénico para actividad peptidasa. Los análisis de los geles mostraron la presencia de proteasomas ocupados de manera doble (RP2CP) y única (RP1CP) en carriles tanto de control como de b-AP15. La adición de SDS al 0,03% no reveló un aumento en presencia de partículas de núcleo 20S sin ocupar. b-AP15 no altera la actividad de unión de proteasoma-ubiquitina (figura 9b). Se trataron células HCT-116 con bortezomib (100 nM) o b-AP15 (1  $\mu$ M), y se purificaron por afinidad los proteasomas. Se determinaron los niveles de poliubiquitina asociada mediante inmunotransferencia.

EJEMPLO 10. *b-AP15 no es un inhibidor de DUB general.* Se trataron HTC-116 células durante 3 h con b-AP15 (1 mM) (figura 10). Se incluyeron los lisados tratados con N-etilmaleimida (NEM) 10 mM como control para la inhibición total de DUB. Se determinó la actividad de DUB de los lisados de células midiendo la escisión de del sustrato fluorogénico ubiquitin-7-amido-4-metilcumarina (Ub-AMC).

EJEMPLO 11. *Caracterización bioquímica de la unión de b-AP15.* Respuesta a la dosis de b-AP15 (figura 11a): se trataron proteasomas 10S purificados (5 nM) con concentraciones indicadas de b-AP15, y se determinó la actividad de DUB mediante la detección de escisión Ub-AMC. Se determinó el valor  $CI_{50}$  ( $2,1 \pm 0,411$  mM) de curvas de log de concentración en Graph Pad Prism usando análisis de regresión no lineal (valores de media  $\pm$ DE, n=3). Debe observarse que el  $CI_{50}$  observado en ensayos libres de células es un poco más alto que el observado en las células, probablemente debido a la hidrofobicidad de b-AP15 (XLogP = 3,3) lo que dio como resultado el enriquecimiento del compuesto en células (11). Reversibilidad de inhibición de b-AP15 (la figura 1b): Se determinó la reversibilidad de la inhibición midiendo la recuperación de la actividad de DUB tras la dilución rápida del complejo enzima/b-AP15. Se

incubó una mezcla de reacción que contenía 50 veces la concentración 19S usada normalmente en reacciones (250 mM) y 10 veces el valor de  $CI_{50}$  calculado para b-AP15 (25  $\mu$ M) sobre hielo durante 15 min seguido por una dilución en 50 veces en tampón de reacción para proporcionar una concentración final de 5 nM para 19'S y 0,5  $\mu$ M para b-AP15. Las curvas de reacción lineal de escisión de Ub-AMC muestran que b-AP15 es un inhibidor reversible. Determinación de si b-AP15 no reacciona específicamente con residuos de cisteína (figura 11c). Se trató 19S (5 nM) con b-AP15 (10  $\mu$ M) o b-AP15 (10  $\mu$ M) mezclado con glutatión reducido (GSH (2 mM)). La presencia de glutatión no redujo inhibición mediada por b-AP15 de actividad de DUB de 19S.

EJEMPLO 12. *b-AP15 no es un inhibidor de DUB general.* Se trataron células HCT-116 durante 3 h con b-AP15 (1  $\mu$ M) y se purificaron por afinidad los proteasomas (figura 12a). Se expresa la actividad de DUB de proteasoma como escisión de Ub-AMC/suc-LLVYAMC para normalizar para recuperación de proteasoma ( $P=0,012$ , prueba t para datos independientes, dos colas). b-AP15 no inhibe DUB no proteosómicas (figura 12b). Se trataron DUB no proteosómicas recombinantes con b-AP15 y se determinó el % de actividad. Se trataron lisados de células de células 293T y HeLa con b-AP15 (50 mM) seguido por marcaje activo con HA-UbVS (figura 12c). Se ejecutaron todas las muestras sobre SD-PAGE seguido por inmunotransferencia con anticuerpos  $\alpha$ -HA.

EJEMPLO 13. *Tratamiento con b-AP15 no altera significativamente el peso del animal* (figura 13). La diferencia en peso al inicio y en el punto final entre el animales de control y tratados para los xenoinjertos mostrados en la figura 4 fueron: FaDu, -1,3%; LLC, +2,1%; 4T1 + 5,8%. Las cajas representan los cuartiles superiores e inferiores y la mediana, los bigotes muestran los valores máximos y mínimos.

EJEMPLO 14. *Sensibilidad de líneas celulares en la línea de células NC160 para b-AP15 y bortezomib* (figura 14). Se muestran los valores de  $CI_{50}$  para las líneas celulares individuales (gráficos a mano izquierda) y mediana de  $CI_{50}$  para cada tipo de tumor (gráficos a mano derecha). Los datos se han tomado de [www.dtp.nci.nih.gov](http://www.dtp.nci.nih.gov). Las flechas indican los tipos de células de tumor más sensibles para cada fármaco.

EJEMPLO 15. *Expresión de genes de chaperona observados en células tratadas con bAP15.* La expresión de genes de chaperona observadas en células tratadas con bAP15 (tabla 1) es indicativa de la inducción de una respuesta proteotóxica.

Tabla 1. Inducción de expresión de chaperona tras tratamiento con b-AP15

ID	Título de gen	Símbolo de gen	Valores de expresión		
			b-AP15	Vehículo	Cambio en veces
117_at	Proteína de 70kDa de choque térmico 6 (HSP70B')	HSPA6	24149	33	725
225061_at	Homólogo de DnaJ (Hsp40), A4	DNAJA4	21103	711	30
203810_at	Homólogo de DnaJ (Hsp40), B4	DNAJB4	1955	123	16
205543_at	Proteína de 70kDa de choque térmico de tipo 4	HSPA4L	5452	406	13
200666_s_at	Homólogo de DnaJ (Hsp40), B1	DNAJB1	33900	5251	6
241716_at	Proteína de 60kDa de choque térmico 1	HSPD1	487	77	6
203811_s_at	Homólogo de DnaJ (Hsp40), B4	DNAJB4	960	178	5
202581_at	Proteína de 70kDa de choque térmico 1B	HSPA1B	31068	6382	5
206976_s_at	Proteína de 105kDa/110kDa de choque térmico 1	HSPH1	40974	8427	5
211016_x_at	Proteína de 70kDa de choque térmico 4	HSPA4	1803	422	4
202843_at	Homólogo de DnaJ (Hsp40), B9	DNAJB9	1879	449	4
200880_at	Homólogo de DnaJ (Hsp40), A1	DNAJA1	19970	4872	4
200800_s_at	Proteína de 70kDa de choque térmico 1A	HSPA1A	57478	14352	4

El análisis adicional mediante PCR cuantitativa mostró que b-AP15 induce una expresión de HSPA6 (Hsp70B'), HSPA1B y DNAJB1 (Hsp40) más fuerte que bortezomib (tabla 2). HSPA6, que se sabe que se induce en respuesta a la acumulación de proteínas dañadas (35), se indujo > 1000 en veces mediante b-AP15. Estos hallazgos indican que complejos de sustrato de ubiquitina de alto peso molecular que se acumulan como resultado de la inhibición de DUB pueden generar un fuerte citotoxicidad que es insensible a la sobreexpresión de Bcl-2.

Tabla 2. Cuantificación de la inducción de gen de chaperona.

Título de gen	Símbolo de gen	Inducción de veces#	
		b-AP15	bortezomib
proteína de 70kDa de choque térmico 6 (Hsp70B')	HSPA6	1550	60
proteína de 70kDa de choque térmico 1B (Hspa1b)	HSPA1B	21	12
Homólogo DnaJ, B1 (Hsp40B1)	DNAJB1	22	5

# Se trataron células HCT116 con concentraciones  $CI_{90}$  de b-AP15 o bortezomib y se determinaron los niveles de ARNm tras PCR de transcripción inversa y a tiempo real. La inducción en veces se expresa como control sin tratar en veces. Se repitió el experimento con resultados similares.

La celular respuesta para b-AP15 no es solo distinta de la de bortezomib con respecto a implicación de reguladores de apoptosis sino también en relación con la sensibilidad de líneas de células tumorales en el panel de línea celular NCI-60 (<http://dtp.nci.nih.gov>). Los inhibidores de actividad de DUB de RP 19S deben presentar un espectro terapéutico diferente de la de los inhibidores de actividad enzimática de 20S, y por tanto expanden el arsenal de opciones de terapia en oncología.

### Bibliografía

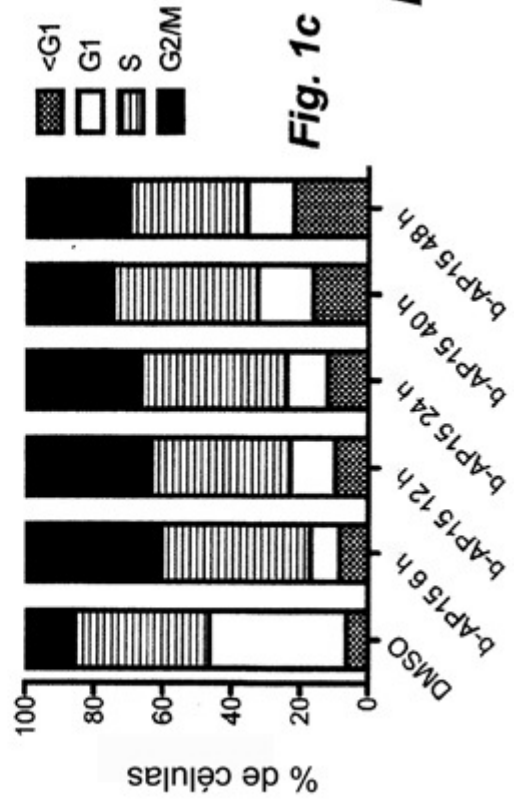
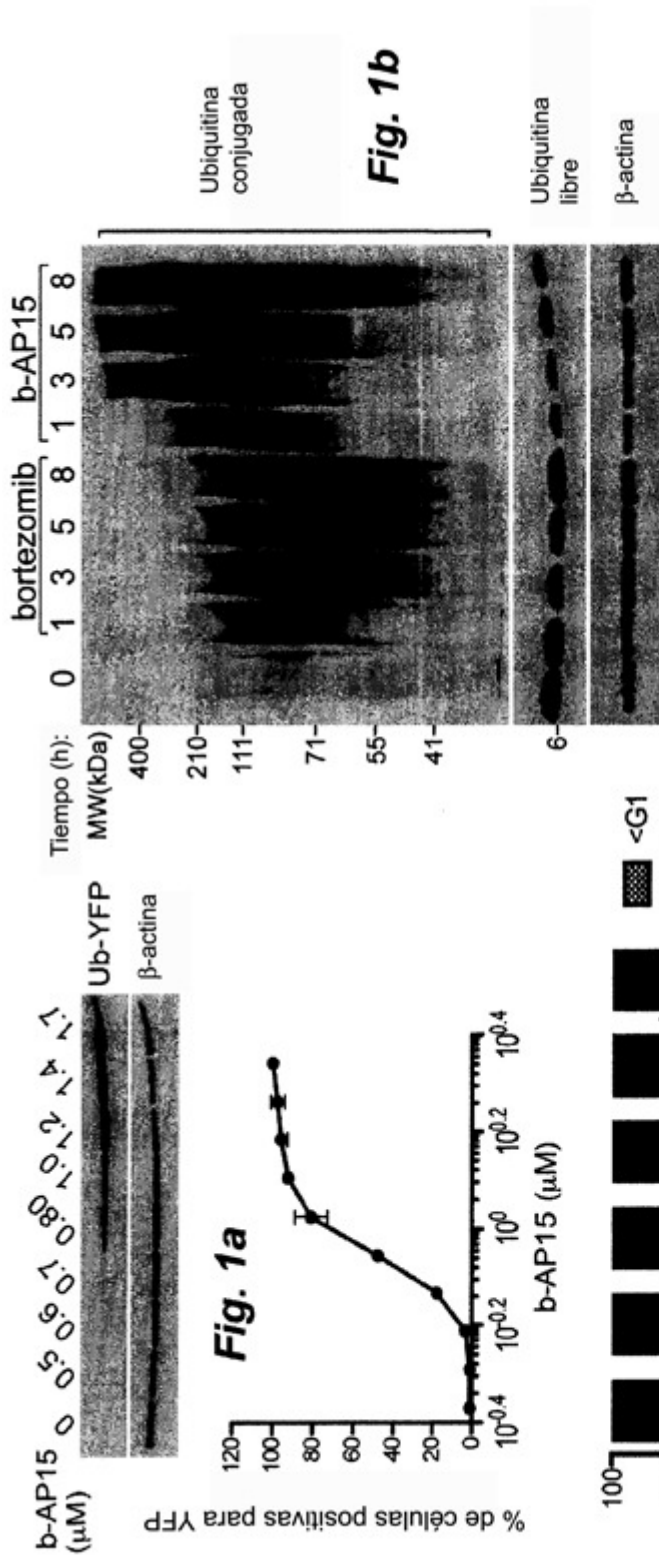
- Masdehors, P *et al.*, Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome- specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol* 105, 752-757, doi:bjh1388 [pii] (1999).
- DeMartino, G N *et al.*, PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide binding protein family. *J Biol Chem* 269, 20878-20884, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed &dopt=Citation&list\\_uids=8063704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed &dopt=Citation&list_uids=8063704) (1994).
- Rechsteiner, M *et al.*, The multicatalytic and 26 S proteases. *J Biol Chem* 268, 6065-6068, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8454582](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8454582) (1993).
- Adams, J & Kauffman, M, Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 22, 304-311, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi? cmd=Retrieve &db =PubMed&dopt=Citation& list\\_uids=15199612](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve &db =PubMed&dopt=Citation& list_uids=15199612) (2004).
- Erdal, H *et al.*, Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 192-197, doi:0408592102 [pii]10.1073/pnas.0408592102 (2005).
- Berndtsson, M *et al.*, Induction of the lysosomal apoptosis pathway by inhibitors of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Cancer* 124, 1463-1469, doi:10.1002/ijc.24004 (2009).
- Lamb, J *et al.*, The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929-1935, doi:313/5795/1929 [pii]10.1126/science.1132939 (2006).
- Adams, J *et al.*, Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 333-338 333-338, doi:S0960894X98000298 [pii] (1998).
- Shibata, T *et al.*, An endogenous electrophile that modulates the regulatory mechanism of protein turnover: inhibitory effects of 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 on proteasome. *Biochemistry* 42, 13960-13968, doi:10.1021/bi035215a (2003).
- Yang, H *et al.*, Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res* 66, 4758-4765 4758-4765, doi:66/9/4758 [pii]10.1158/0008-5472.CAN05-4529 (2006).
- Yang, H *et al.*, The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry". *Mol Pharmacol* 71, 426-437, doi:mol.106.030015 [pii]10.1124/mol.106.030015 (2007).
- Menendez-Benito, V *et al.*, Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* 14, 2787-2799, doi:ddi312 [pii]10.1093/hmg/ddi312 (2005).
- Mimnaugh, E G *et al.*, Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry* 36, 14418-14429, doi:10.1021/bi970998j [pii] (1997).

14. Shieh, S Y *et al.*, DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334, doi:S0092-8674(00)80416-X [pii] (1997).
- 5 15. Rogakou, E P *et al.*, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9488723](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9488723) (1998).
16. Ling, X *et al.*, Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with surviving expression and p53 status but not cancer cell types. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 8 (2010).
- 10 17. Paoluzzi, L *et al.*, The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the antineoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies. *Blood* 112, 2906-2916 (2008).
18. Borissenko, L & Groll, M, 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* 107, 687-717, doi:10.1021/cr0502504 (2007).
- 15 19. Eytan, E *et al.*, ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7751-7755, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2554287](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2554287) (1989).
- 20 20. Chu-Ping, M *et al.*, Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 269, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8106396](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8106396) (1994).
- 25 21. Mullally, J E & Fitzpatrick, F A, Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death. *Mol Pharmacol* 62, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12130688](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12130688) (2002).
- 30 22. Guterman, A & Glickman, M H, Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 17291-1738, doi:10.1074/jbc.M307050200 [pii] (2004).
23. Glickman, M H & Ciechanover, A, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428, doi:10.1152/physrev.00027.2001 (2002).
- 35 24. Hofmann, R M & Pickart, C M *et al.*, Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-653, doi:S0092-8674(00)80575-9 [pii] (1999).
25. Vong, Q P *et al.*, Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of surviving cells. *Science* 310, 1499-1504, doi:10.1126/science.1120160 (2005).
- 40 26. Borodovsky, A *et al.*, A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J* 20, 5187-5196, doi:10.1093/emboj/20.18.5187 (2001).
- 45 27. Lam, Y A *et al.*, Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes. *J Biol Chem* 272, 28438-28446, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9353303](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9353303) (1997).
- 50 28. Verma, R *et al.*, Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615, doi:10.1126/science.1075898 [pii] (2002).
29. Yao, T & Cohen, R E, A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407, doi:10.1038/nature01071 [pii] (2002).
- 55 30. Olofsson, M H *et al.*, Specific demonstration of drug-induced tumour cell apoptosis in human xenograft models using a plasma biomarker. *Cancer Biomarkers* 5, 117-125, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407366> (2009).
31. Kramer, G *et al.*, Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytochrome c. *Cancer Res* 64, 1751-1756, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14996736](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14996736) (2004).
- 60 32. Reyes-Turcu, F E *et al.*, Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78, 363-397, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19489724](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19489724) (2009).
- 65

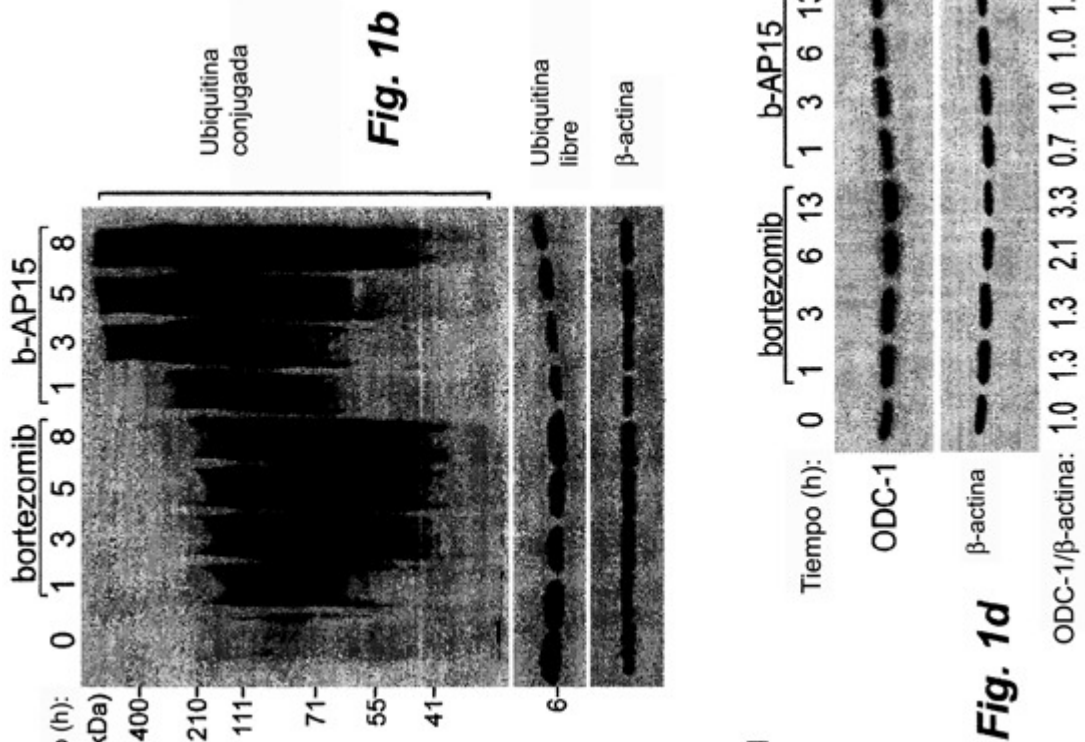
33. Koulich, E *et al.*, Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 19, 1072-1082, doi:E07-10-1040 [pii]10.1091/mbc.E07-10-1040 (2008).
- 5 34. Fennell, D A *et al.*, BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene* 27, 1189-1197, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17828309](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17828309) (2008).
- 10 35. Noonan, E J *et al.*, Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress Chaperones* 12, 393-402, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18229458](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18229458) (2007).
- 15 36. Bunz, F. *et al.*, Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501 (1998).
- 20 37. Pietenpol, J A *et al.*, Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. *Cancer Res* 54, 3714-3717 (1994).
- 25 38. Menendez-Benito, V *et al.*, Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* 14, 2787-2799, doi:ddi312 [pii]10.1093/hmg/ddi312 (2005).
- 30 39. Bodnar, A G *et al.*, Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352 (1998).
- 35 40. Lamb, J *et al.*, The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929-1935, doi:313/5795/1929 [pii] 10.1126/science.1132939 (2006).
- 40 41. Elsasser, S *et al.*, Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 398, 353-363, doi:S0076-6879(05)98029-4 [pii]10.1016/S0076-6879(05)98029-4 (2005).
- 45 42. Guterman, A & Glickman, M H, Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 1729-1738, doi:10.1074/jbc.M307050200M307050200 [pii] (2004).
- 50 43. Hagg, M *et al.*, A novel high-through-put assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest New Drugs* 20, 253-259 (2002).
- 55 44. Lindhagen, E *et al.*, The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc* 3, 1364-1369, doi:nprot.2008.114 [pii]10.1038/nprot.2008.114 (2008).
- 60 45. Pulaski, B A & Ostrand-Rosenberg, S, Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* capítulo 20, unidad 20 22, doi:10.1002/0471142735.im2002s39 (2001).
- 65 46. Sawada, G. A. *et al.*, Increased lipophilicity and subsequent cell partitioning decrease passive transcellular diffusion of novel, highly lipophilic antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 1317-1326 (1999).

**REIVINDICACIONES**

1. Método para examinar un compuesto para determinar si el compuesto es un inhibidor de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad, comprendiendo el método poner en contacto el compuesto con partículas reguladoras 19S (RP 19S) humanas de proteasoma 26S y determinar si el compuesto inhibe la actividad de las enzimas de desubiquitinación (DUB) UCHL5 y USP14, y una etapa adicional de determinar si el compuesto afecta a la actividad de enzimas de DUB asociadas no proteasómicas, en el que la inhibición de las actividades de UCHL5 y USP14 y la actividad no afectada de enzimas de DUB asociadas no proteasómicas indica que el compuesto es un inhibidor de desubiquitinación de proteasoma de alta especificidad.
2. Método según la reivindicación 1, en el que las enzimas de DUB asociadas no proteasómicas comprenden al menos un miembro del grupo que consiste en UCHL1, UCHL3, USP2, USP7, USP8.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la determinación de la inhibición de actividades de UCHL5 y USP14 se realiza con un ensayo realizado con RP 19S humanas, con HA-ubiquitina o ubiquitina-AMC vinilsulfona como sustrato.

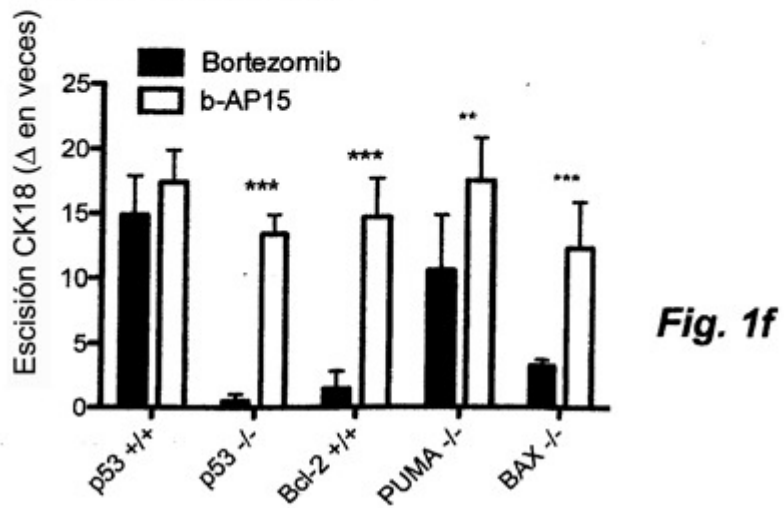
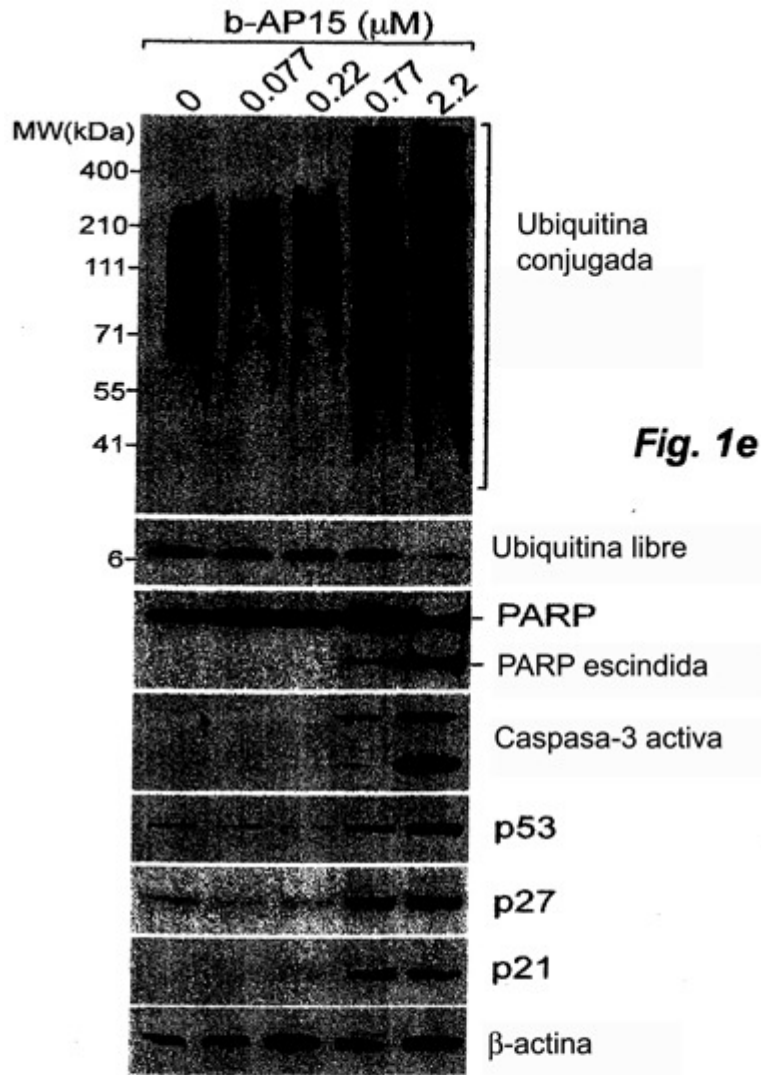


**Fig. 1c**

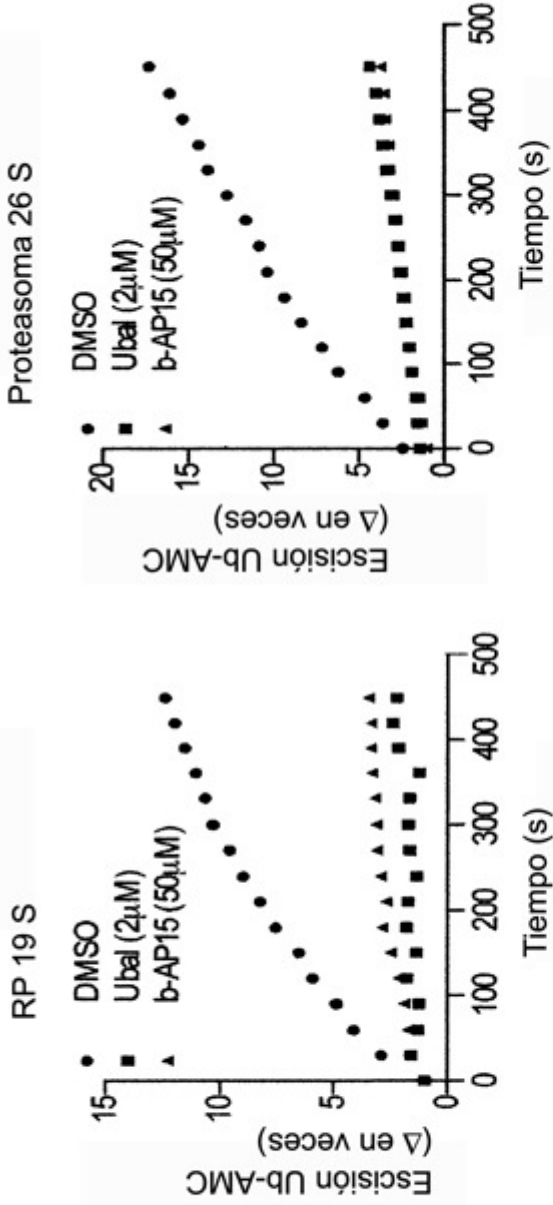


**Fig. 1d**

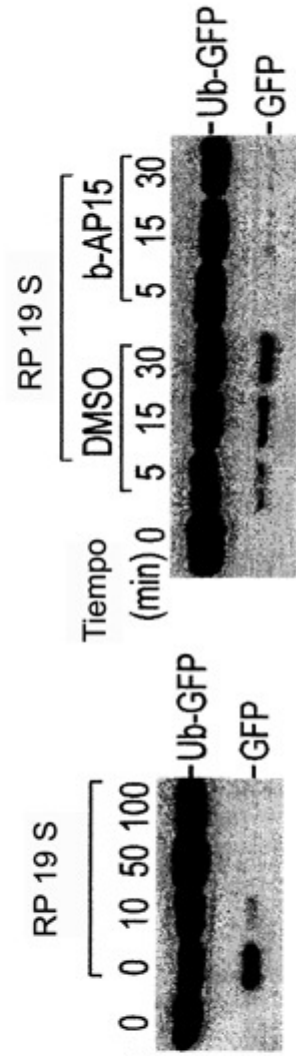
ODC-1/β-actina: 1.0 1.3 1.3 2.1 3.3 0.7 1.0 1.0 1.1





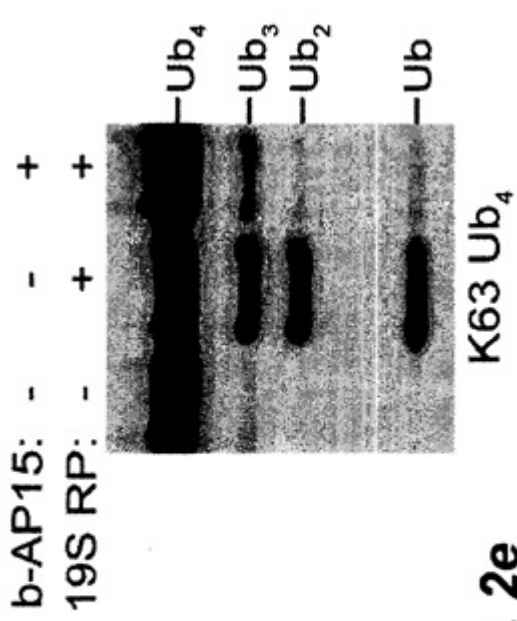


**Fig. 2a**

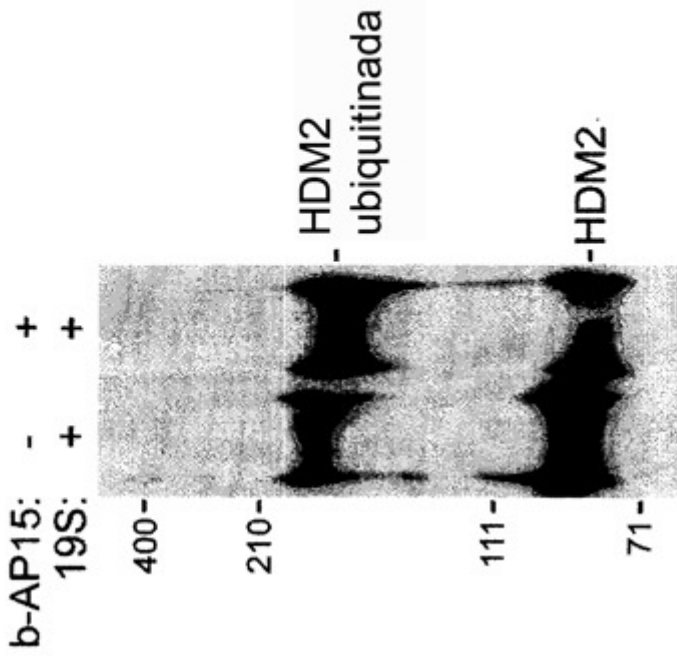
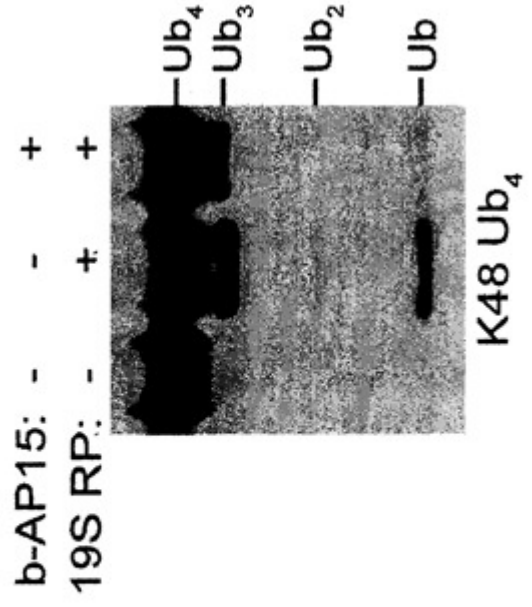


**Fig. 2b** b-AP15 (µM): 0 0 10 50 100

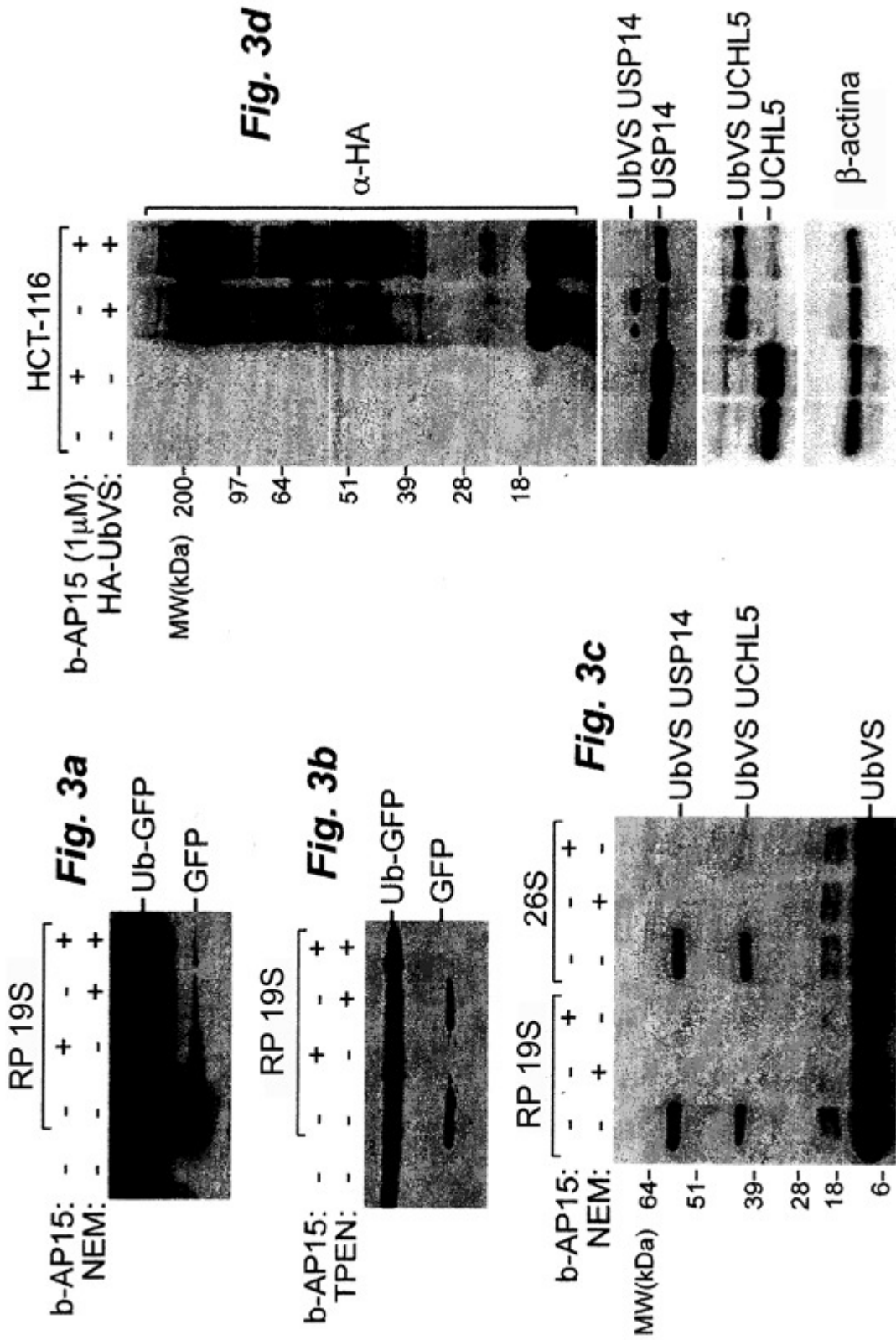
**Fig. 2c**

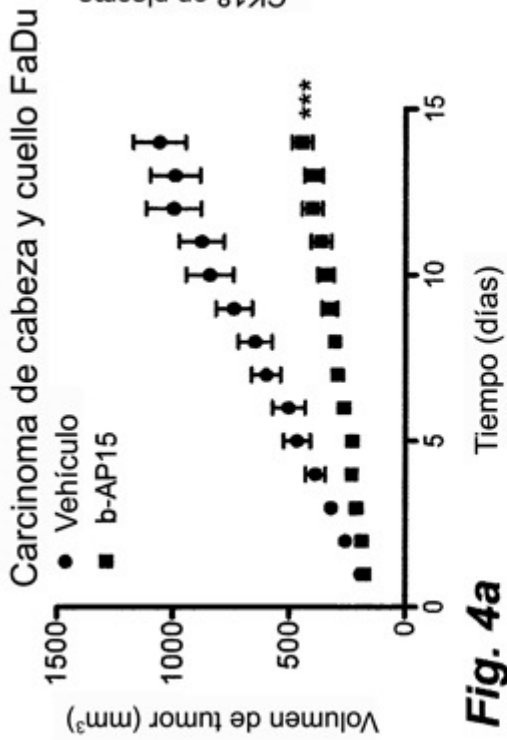


**Fig. 2e**

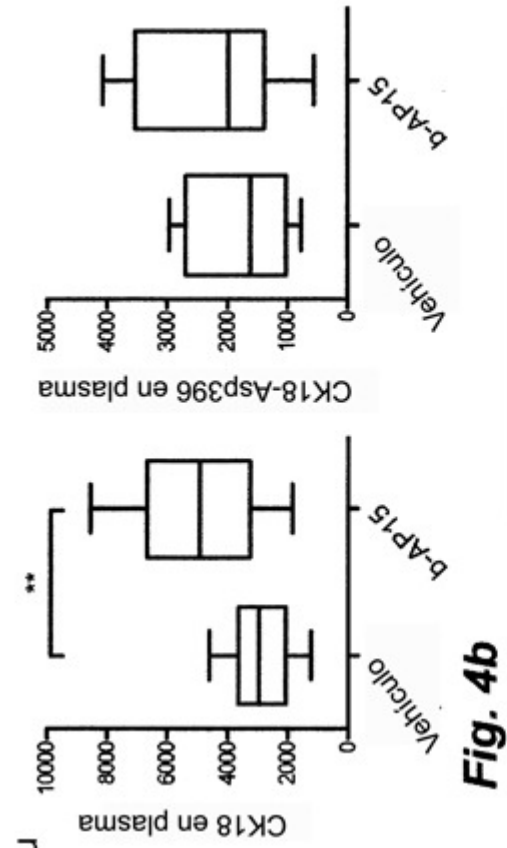


**Fig. 2d**

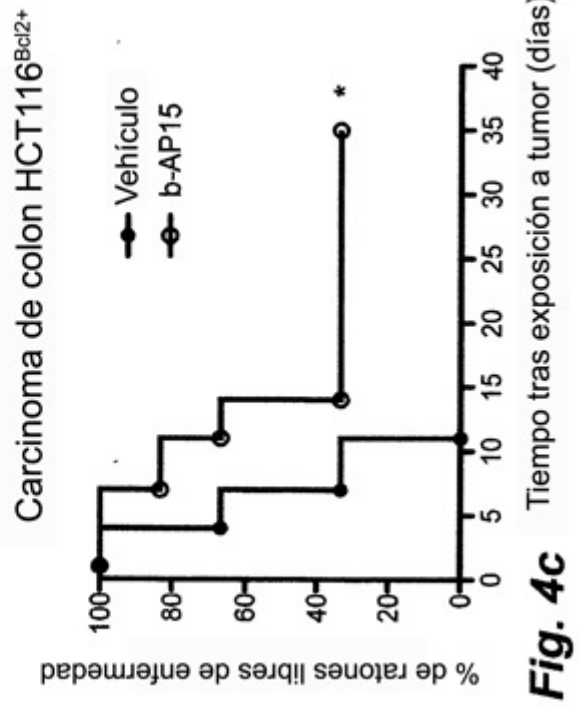




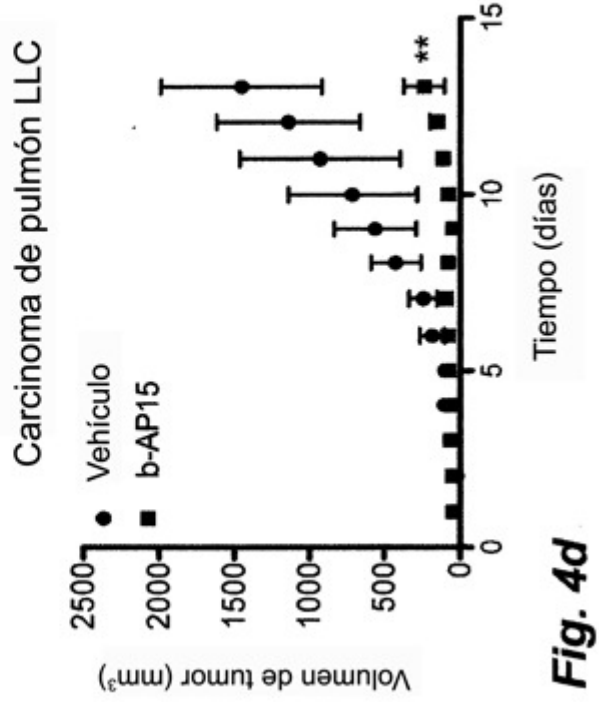
**Fig. 4a**



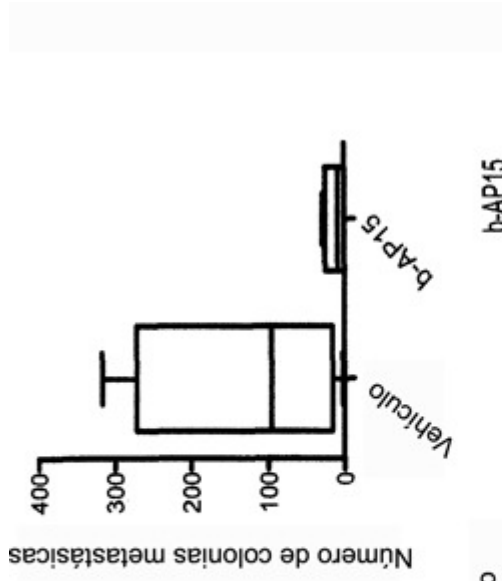
**Fig. 4b**



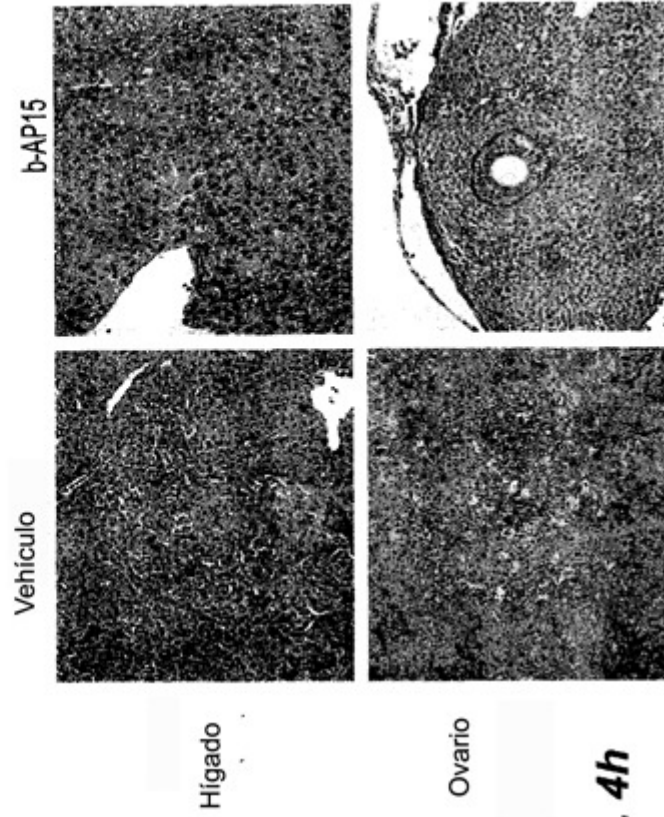
**Fig. 4c**



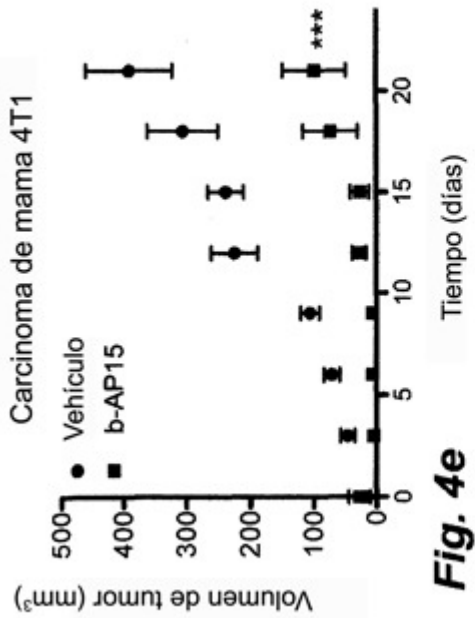
**Fig. 4d**



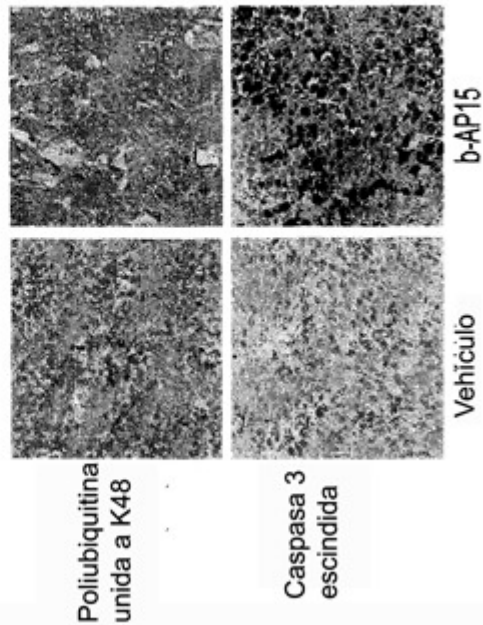
**Fig. 4f**



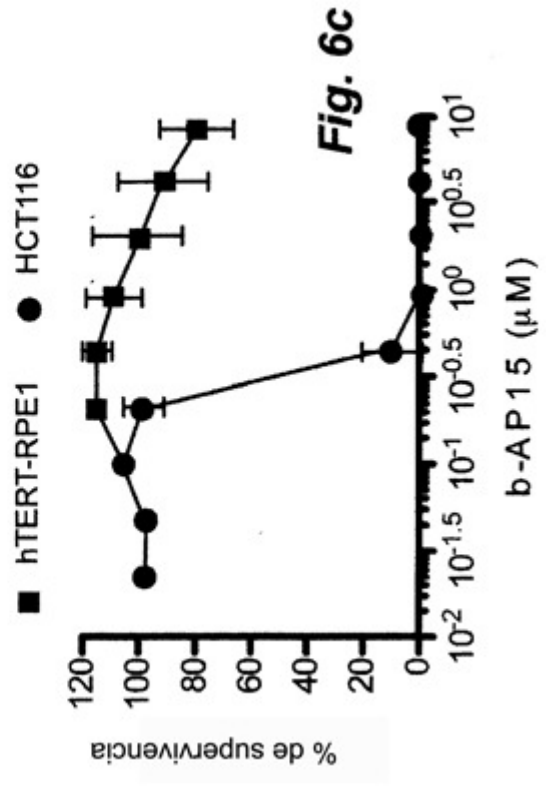
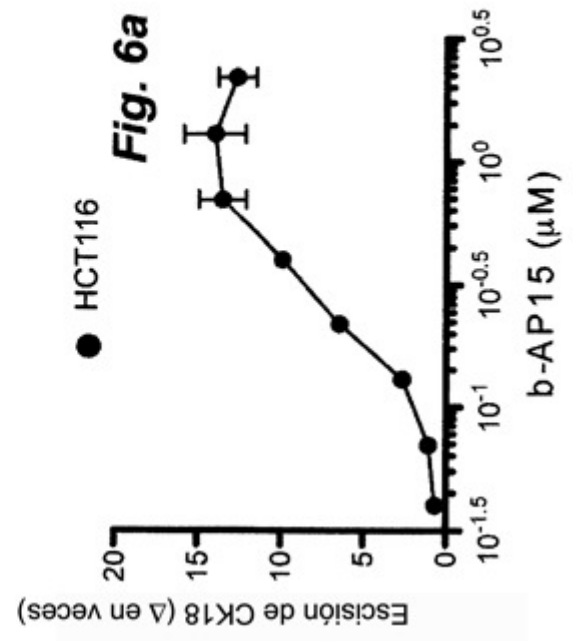
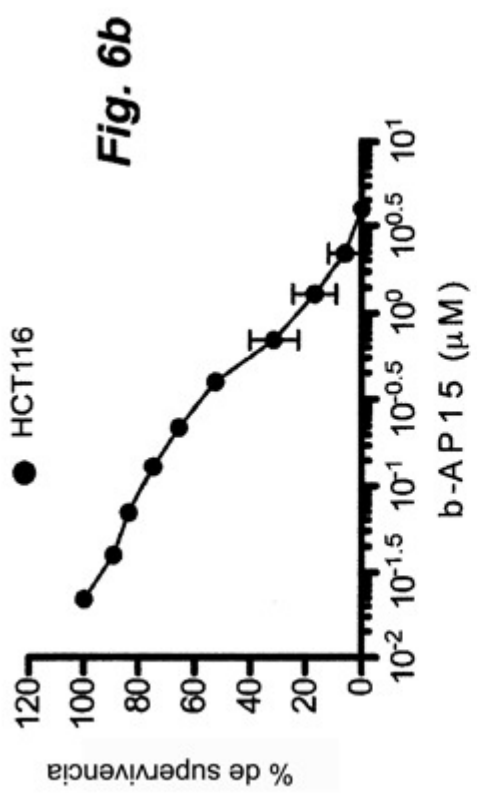
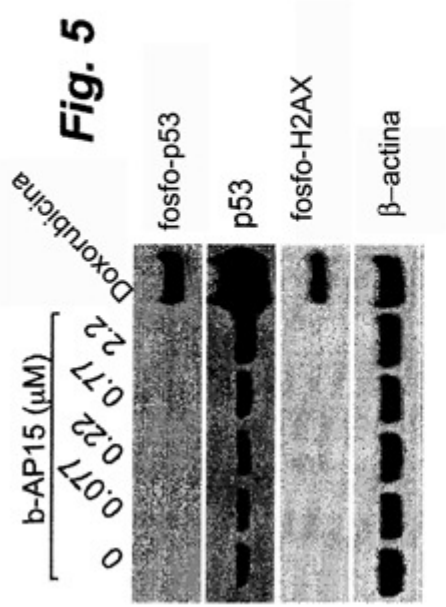
**Fig. 4h**

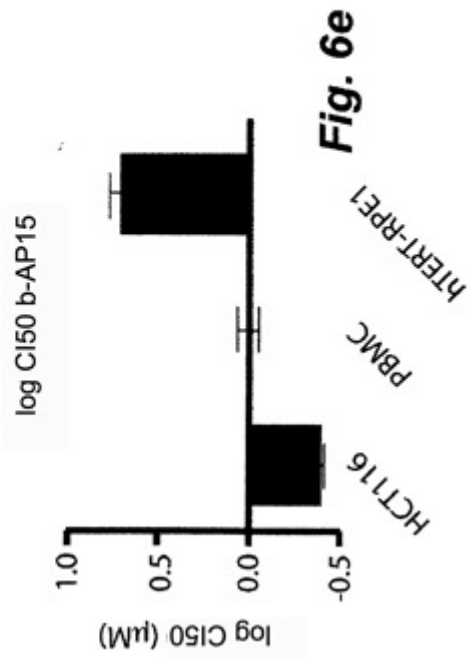
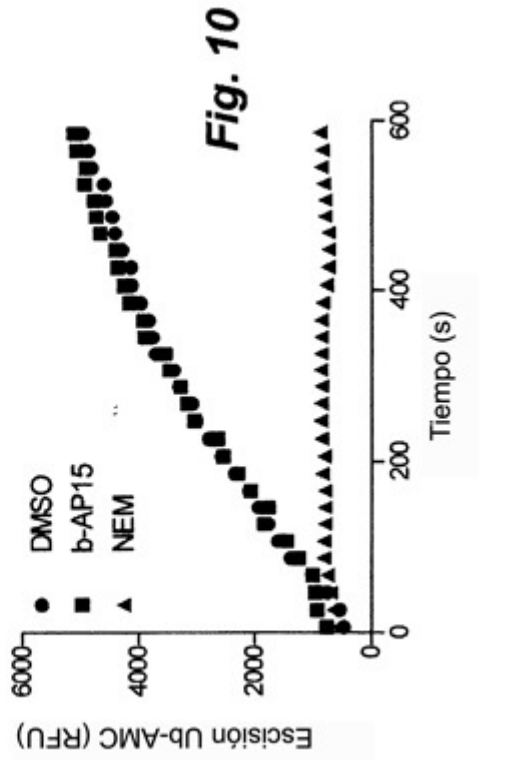
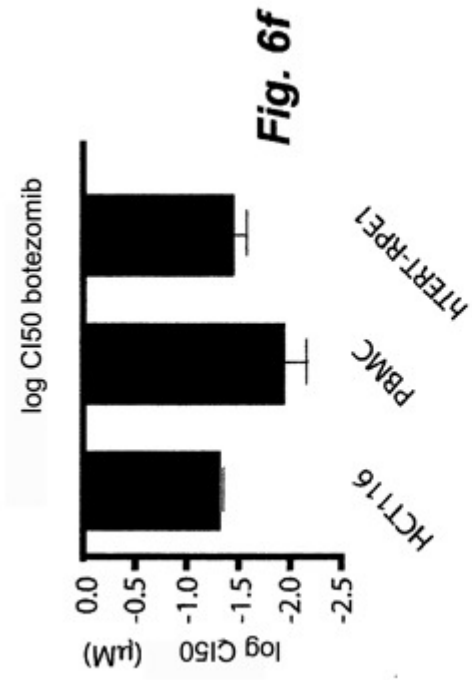
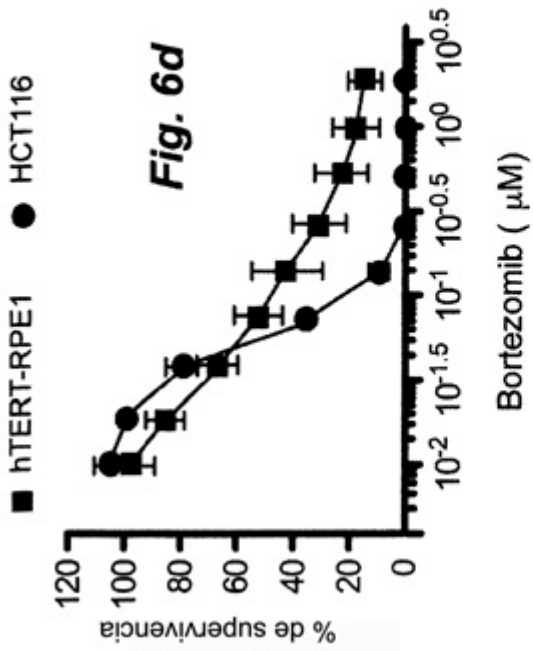


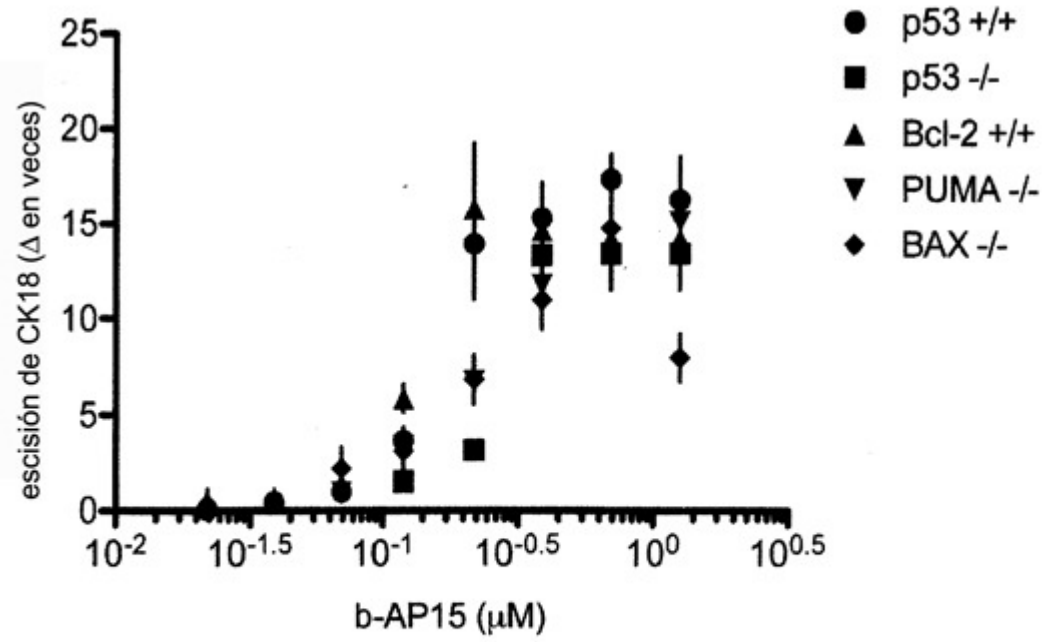
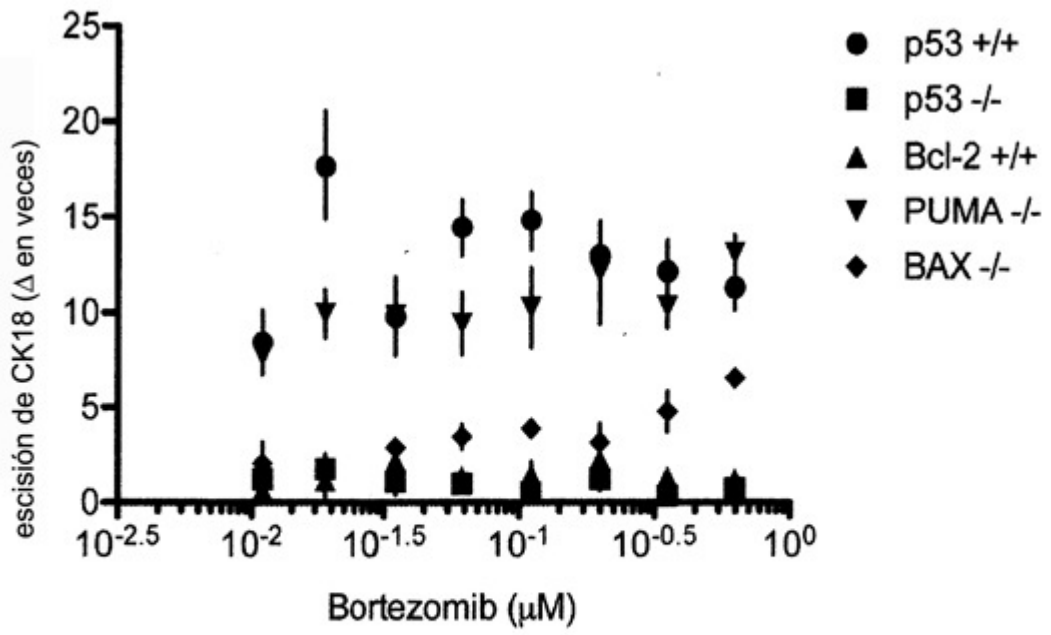
**Fig. 4e**



**Fig. 4g**

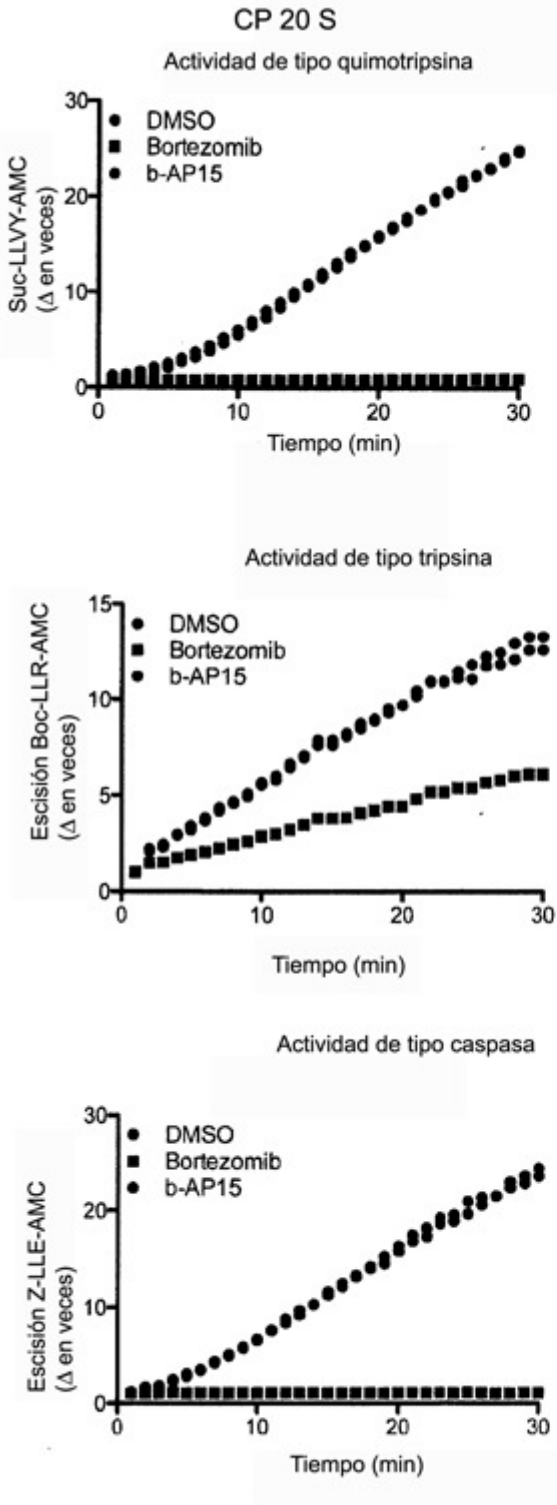




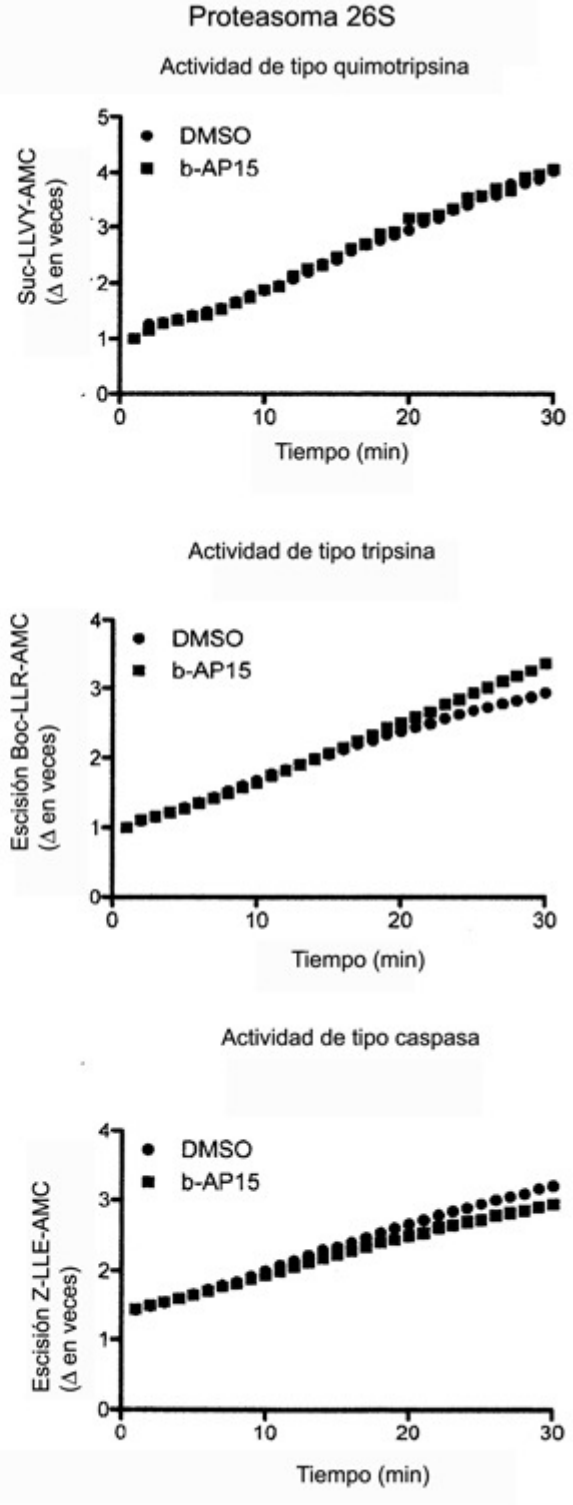


**Fig. 7**

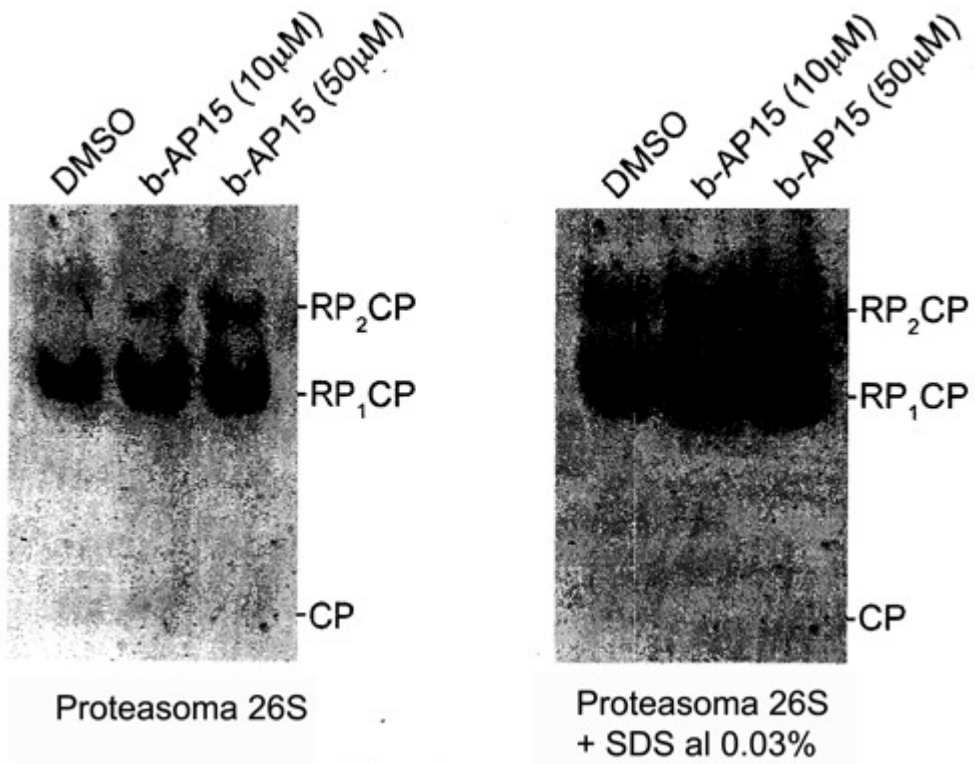




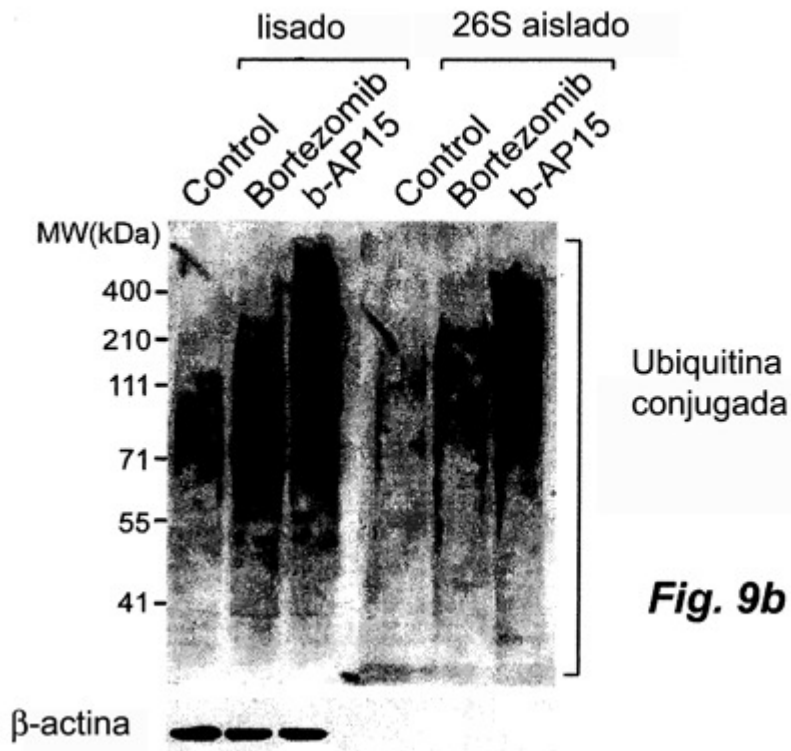
**Fig. 8a**



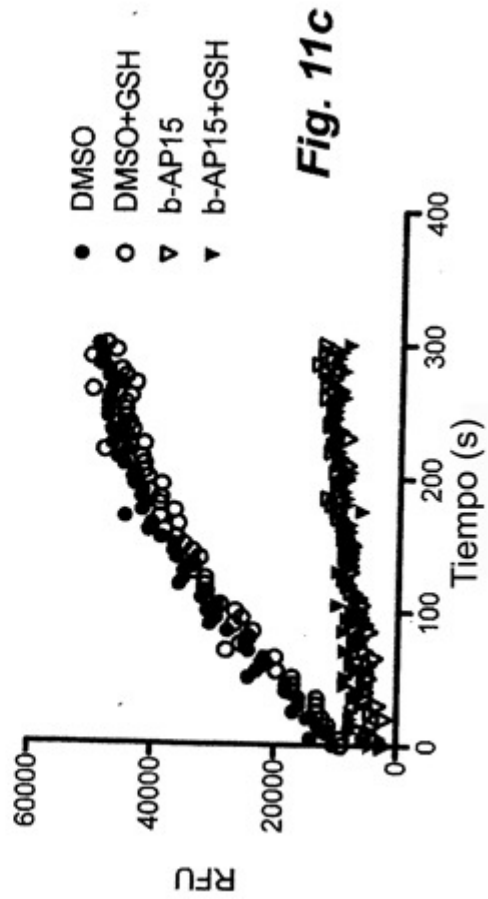
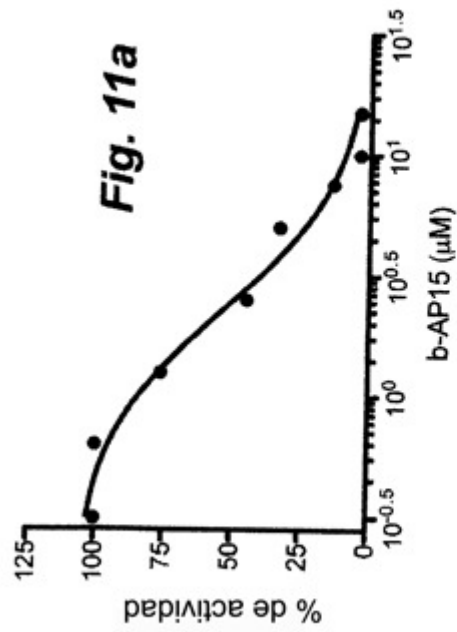
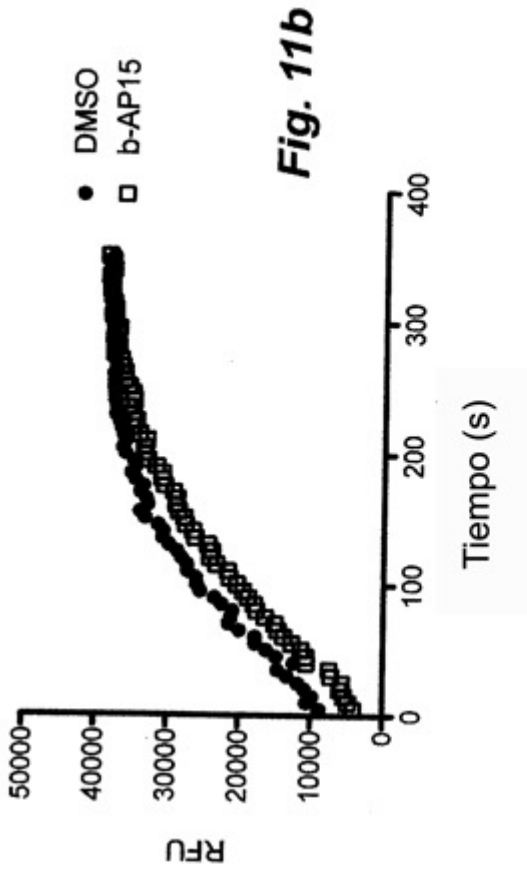
**Fig. 8b**

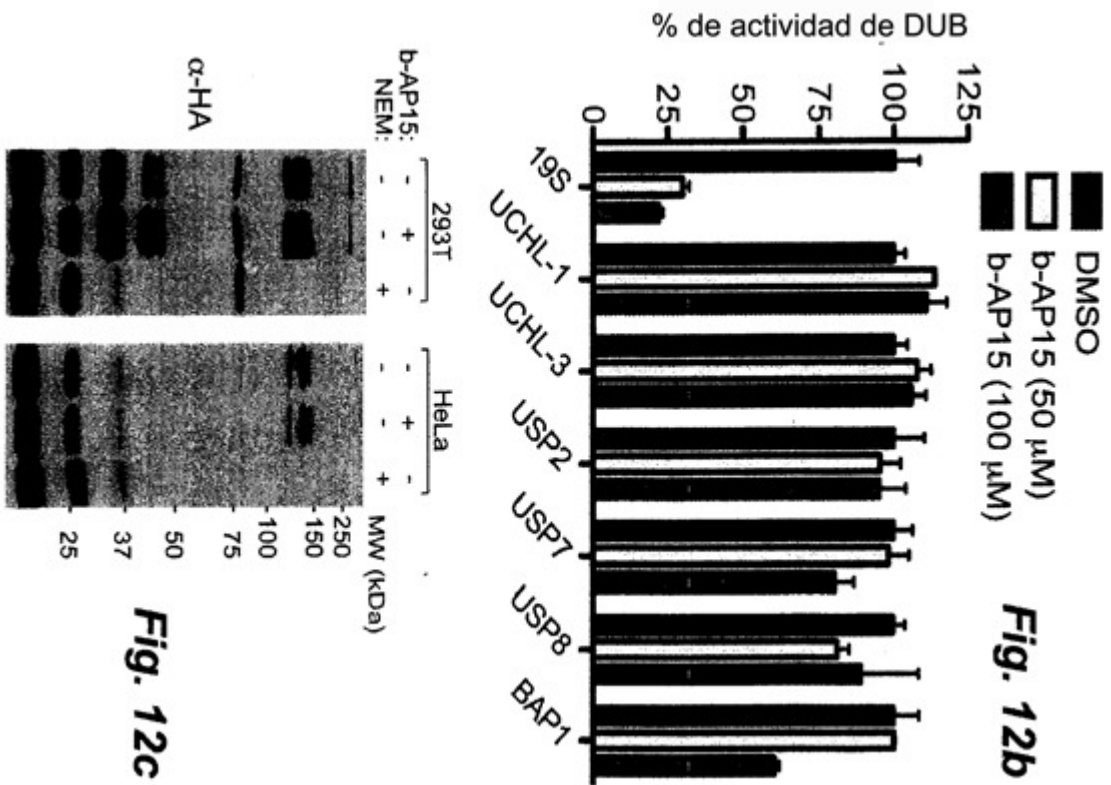
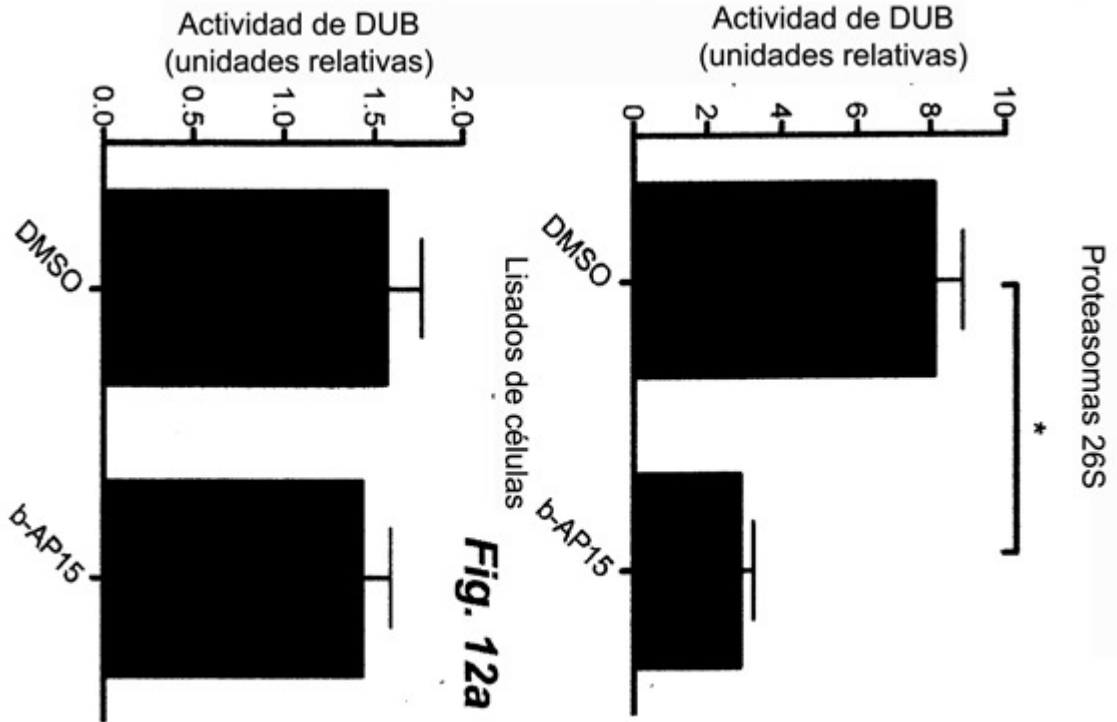


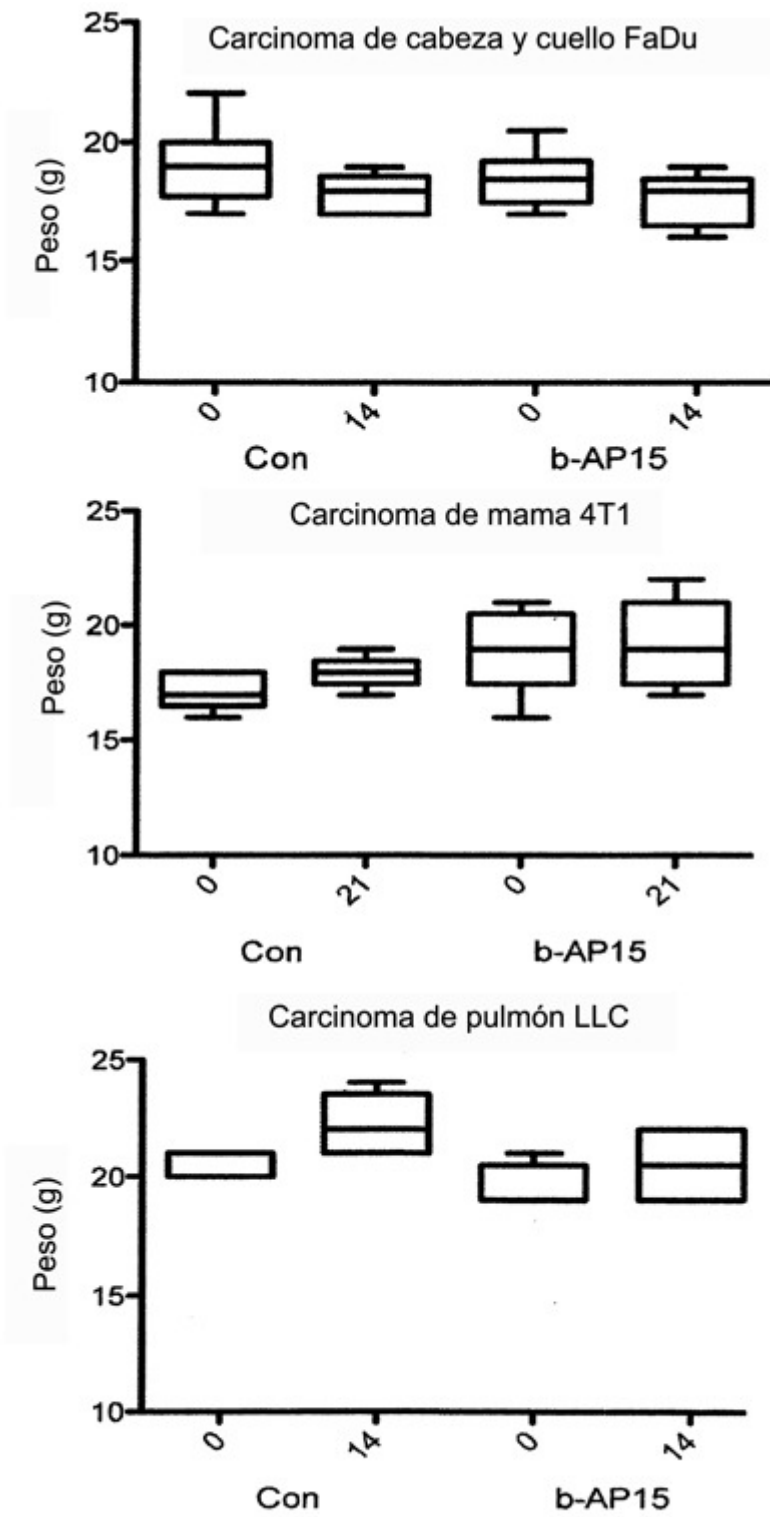
**Fig. 9a**



**Fig. 9b**







**Fig. 13**

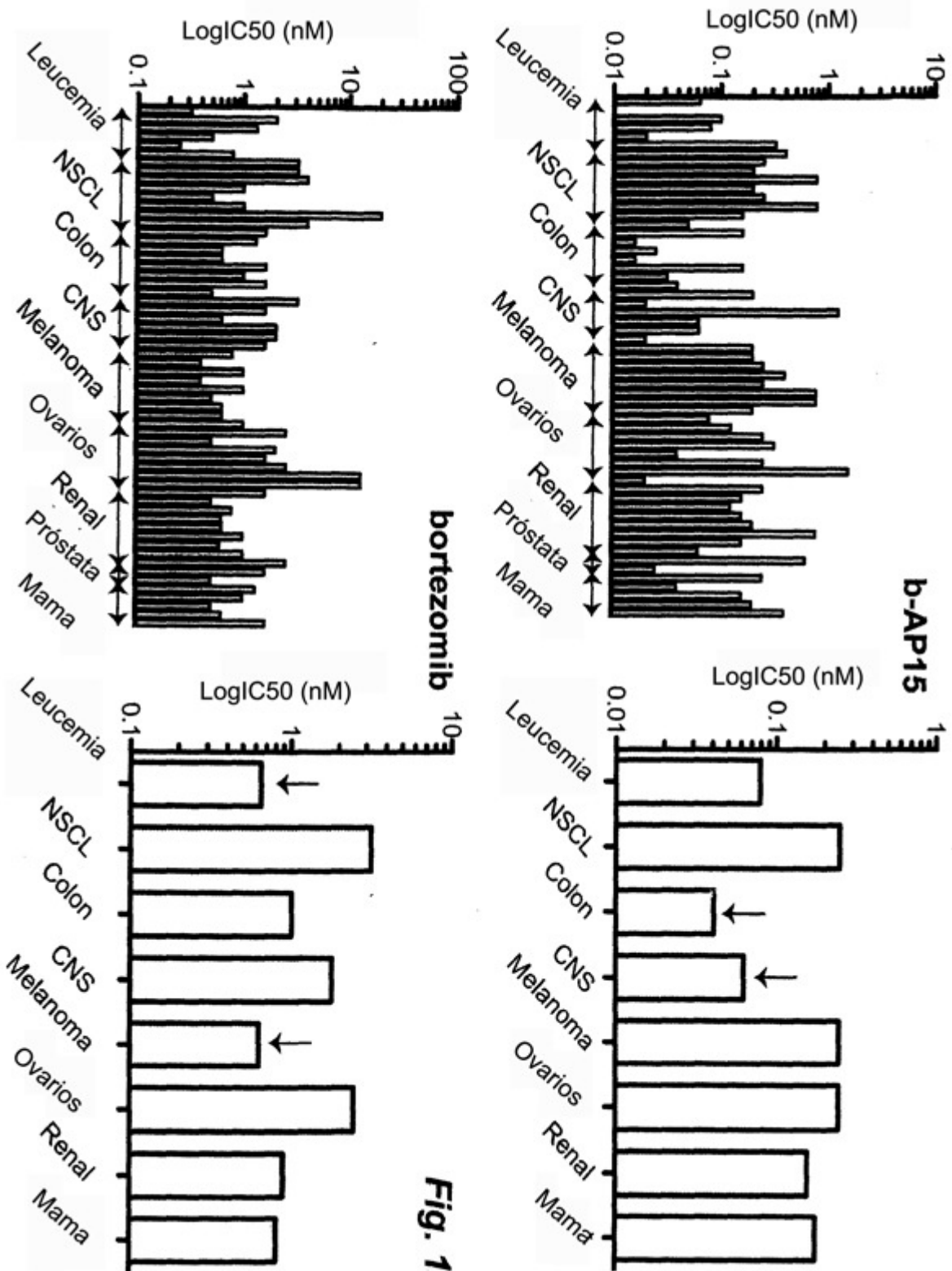


Fig. 14