



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 685**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07K 5/08** (2006.01)

**A61K 38/55** (2006.01)

**A61K 31/22** (2006.01)

**A61K 31/40** (2006.01)

**A61K 31/135** (2006.01)

**C07C 271/22** (2006.01)

**C07C 311/17** (2006.01)

**C07D 207/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94913099 .1**

86 Fecha de presentación : **31.03.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0693129**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.01.1996**

54

Título: **Procedimiento de inhibición de la transcripción de genes.**

30

Prioridad: **07.04.1993 DE 4311835**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73

Titular/es:  
**Boehringer Ingelheim International GmbH**  
**Binger Strasse 173**  
**55218 Ingelheim am Rhein, DE**

72

Inventor/es: **Baeuerle, Patrick y**  
**Henkel, Thomas**

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 268 685 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

Procedimiento de inhibición de la transcripción de genes.

5 La invención se refiere a la influencia en la transcripción de genes.

La expresión inducible de genes se basa entre otros en la activación inducible de proteínas, que regulan la transcripción, para ello interaccionan con elementos de DNA cis-reguladores. La actividad de estas proteínas, denominadas factores de transcripción, puede regularse mediante su síntesis “*de novo*”; esta estrategia requiere factores adicionales, que influyen en el gen del factor de transcripción. A diferencia de ello, los mecanismos post-traduccionales de la activación de los factores de transcripción tienen la ventaja de que transcurren con mayor rapidez que los mecanismos del plano de transcripción. Para el control de la actividad de los factores de transcripción desempeñan un papel importante, entre otros, las subunidades de proteínas inhibitoras. En ejemplo de ello es la IP-1, una proteína cremallera (zipper) de leucina, que inhibe la AP-1. En este caso, la subunidad inhibitora tiene la función de un regulador negativo transdominante en base a la homología estructural con el activador. El sistema NF- $\kappa$ B es un sistema, en el que las subunidades inhibitoras no presentan homología alguna con las subunidades que se fijan sobre el DNA. Las subunidades inhibitoras del NF- $\kappa$ B y los factores afines se denominan proteínas I $\kappa$ B, ya que inhiben de forma reversible la fijación de los factores de transcripción sobre el DNA (Baeuerle y Baltimore, 1988a, b).

20 El NF- $\kappa$ B, un factor heterodímero, que consta de una subunidad de 50 kDa (p50) y una subunidad de 65 kDa (p65) que se fija sobre el DNA, participa en la activación llamada “immediate-early” (inmediata-precoz) de los genes de defensa, cuando las células con la activación del NF- $\kappa$ B y la estabilización del I $\kappa$ B- $\alpha$  han manifestado que este inhibidor impide la activación del NF- $\kappa$ B en células HeLa después de la estimulación del TNF, con lo cual la ID<sub>50</sub> se sitúa en un mismo orden de magnitud que la inhibición de proteasa observada anteriormente en este inhibidor. Por ello, este inhibidor presenta la peculiaridad de producir una acumulación de una forma más fosforilada del I $\kappa$ B- $\alpha$ . La aparición y la estabilización de esta forma fosforilada no guarda relación temporal con la activación del NF- $\kappa$ B, lo cual refuerza la hipótesis de que no basta la fosforilación de células intactas para la activación del NF- $\kappa$ B. Esto apunta al hecho de que la forma fosforilada inducible del I $\kappa$ B- $\alpha$  sigue estando presente en el complejo con el NF- $\kappa$ B; la fosforilación del I $\kappa$ B- $\alpha$  no conduce, pues, a una separación del I $\kappa$ B- $\alpha$  del complejo, como se suponía anteriormente a raíz de ensayos realizados “*in vitro*”. Los resultados obtenidos con la NBIG indican en conjunto que el proteasoma provoca la degradación selectiva de la forma fosforilada del I $\kappa$ B- $\alpha$ .

35 En base a los resultados obtenidos puede suponerse que la función de la fosforilación consiste solamente en marcar el I $\kappa$ B- $\alpha$  para la siguiente degradación proteolítica de curso rápido. La labilidad de la forma fosforilada, debida a esta función, proporciona una explicación del hecho de que hasta el presente no se ha observado la activación del NF- $\kappa$ B fuera de las células.

40 Como inhibidores de la activación del NF- $\kappa$ B se toman, pues, en consideración aquellas sustancias que inhiben indirectamente la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$  por el hecho de que inhiben la modificación que los I $\kappa$ B- $\alpha$  provocan en la forma accesible a la degradación proteolítica, es decir, la fosforilación, en especial aquellas sustancias que inhiben a las quinasas que la provocan.

45 Otra posibilidad de un mecanismo indirecto de la inhibición de proteasas consiste en que el inhibidor impide la activación de la proteasa propiamente dicha, por el hecho de que la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$  impide que se libere un hipotético inhibidor de proteasa.

Los inhibidores identificables de la invención se diferencian por su mecanismo de acción de aquellas sustancias que impiden la activación del NF- $\kappa$ B, por el hecho de que inhiben la disociación del I $\kappa$ B- $\alpha$  del heterodímero p50/Rel-A.

50 Los métodos propuestos hasta el presente para encontrar sustancias, que influyan negativa o positivamente en la activación del NF- $\kappa$ B, se basan en estudiar la capacidad de las sustancias químicas de estabilizar el complejo o de propiciar su disociación (WO 94/20795, WO 89/08147).

55 Otros procedimientos de exploración se basan en estudiar la capacidad de las sustancias de modular la transcripción de un gen especialmente interesante, en tal caso la modulación de la transcripción tiene lugar en el plano de fijación del DNA (WO 91/01379).

60 En relación con lo anterior, la presente invención tiene como objetivo, partiendo de los conocimientos logrados sobre el mecanismo de la activación del NF- $\kappa$ B, la preparación de un procedimiento de exploración que permita encontrar sustancias de alta especificidad de activación del NF- $\kappa$ B, encontrando para ello sustancias que inhiban la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ .

65 La invención se refiere, pues, a un procedimiento para identificar sustancias que inhiban la activación del NF- $\kappa$ B, que está caracterizado porque se estudia la capacidad de las sustancias de ensayo de inhibir específicamente la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ , para ello se trata un sustrato que contenga el I $\kappa$ B- $\alpha$  en presencia de una sustancia de ensayo con una preparación que posea actividad proteolítica para el I $\kappa$ B- $\alpha$  y se determina si y en qué medida la sustancia de ensayo inhibe la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ .

## ES 2 268 685 T3

En relación al procedimiento anterior o paralelamente al mismo se induce (en lo sucesivo: “paso a)”) con preferencia en presencia de la sustancia de ensayo la activación del NF- $\kappa$ B en células eucariotas superiores, en especial humanas, transformadas con un constructo de gen informante (reporter) que provoque la activación del NF- $\kappa$ B y se mide (en lo sucesivo: “paso b)”) la expresión del gen informante.

5

En una forma preferida de ejecución del procedimiento, en el paso a) se utiliza como sustrato el I $\kappa$ B- $\alpha$  puro en un ensayo denominado “sin células”.

10 Para ello se puede actuar p.ej. fijando una cantidad definida del I $\kappa$ B- $\alpha$  con preferencia recombinante (Henkel y col., 1992; Zabel y col., 1993), provisto de un marcador medible, sobre un soporte sólido.

15 Sobre el I $\kappa$ B- $\alpha$  inmovilizado y en presencia de la sustancia de ensayo se aplica una preparación que tenga actividad proteolítica para el I $\kappa$ B- $\alpha$ . Esta preparación puede ser un extracto celular llamado “activado” o bien, en el supuesto de que esté disponible, una proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$  obtenida por métodos recombinantes. En caso de confirmarse la hipótesis de que la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$  es parte integrante del proteasoma (Orlowski, 1990; Rivett, 1989), entonces el proteasoma en forma purificada o una parte del mismo puede utilizarse como actividad proteolítica.

20 Un extracto celular activado, que posea actividad de degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , se obtiene a partir de células que se han tratado con un inductor conocido de NF- $\kappa$ B, por ejemplo el LPS, forbolésteres, TNF, etc. La inducción de la actividad del NF- $\kappa$ B efectúa la activación del sistema que provoca la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ . En su estado no activado, el extracto celular empleado no posee una actividad específica de degradación del I $\kappa$ B- $\alpha$ .

25 Con el extracto celular activado se detectan inhibidores directos e indirectos de la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ , empleando la proteasa de I $\kappa$ B- $\alpha$  purificada solamente se detectan los inhibidores que actúan directamente sobre la proteasa.

30 En los ensayos sin células, como preparación de actividad proteolítica sobre el I $\kappa$ B- $\alpha$  puede utilizarse también una preparación obtenida a partir de células inducidas, con preferencia una fracción del extracto celular activado, en el que se haya detectado actividad proteolítica de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Los métodos de química de proteínas para el fraccionamiento de los extractos celulares ya son conocidos de los expertos. Se estudia la capacidad de las fracciones obtenidas p.ej. después de la precipitación con sulfato amónico, de la cromatografía en tamices moleculares y/o la cromatografía de intercambio iónico, el enfoque isoeléctrico, etc., para la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$  y la fracción correspondiente se emplea en el ensayo, de modo que la cantidad se coordina con el sustrato de ensayo I $\kappa$ B- $\alpha$ , con el fin de que sea posible detectar la degradación con técnicas de medición.

35

40 El I $\kappa$ B- $\alpha$  inmovilizado se degrada proteolíticamente en ausencia de sustancia de ensayo (control) o en presencia de una sustancia de ensayo, que no tenga ninguna acción inhibitoria sobre la actividad proteolítica. Este hecho puede observarse porque el marcador del I $\kappa$ B- $\alpha$  (p.ej. un marcador radiactivo o un marcador fluorescente) pasa total o parcialmente (según sea total o parcial la degradación del I $\kappa$ B- $\alpha$ ) del sustrato al líquido sobrenadante. La porción de marcador, que ha pasado del sustrato al líquido sobrenadante, es proporcional a la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ . En presencia de una sustancia de ensayo, que inhiba la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ , el I $\kappa$ B- $\alpha$  inmovilizado no resulta atacado, el marcador continúa siendo detectable sobre el sustrato y no pasa marcador alguno al líquido sobrenadante.

45 Como alternativa, en el paso a) puede estar también presente una cantidad predeterminada del I $\kappa$ B- $\alpha$  marcado en forma soluble, en lugar de estar inmovilizado sobre un sustrato, en tal caso los demás parámetros de ensayo pueden ser idénticos a los mencionados en el ensayo anterior. Cuando se aplica un preparado de actividad proteolítica, el I $\kappa$ B- $\alpha$  que se halla en solución se degrada, rompiéndose en fragmentos menores. A continuación pueden separarse los componentes de la solución, p.ej. mediante diálisis o filtración a través de gel, eligiendo el tamaño de poro de la membrana o de la resina de tal manera que el I $\kappa$ B- $\alpha$  intacto se separe de los fragmentos proteolíticos. Los fragmentos marcados o el sustrato de I $\kappa$ B- $\alpha$  marcado no degradado se encuentran ahora en el líquido eluido, en tal caso la porción de marcador total que se halla en los fragmentos es proporcional a la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ . En presencia de una sustancia de ensayo, que inhiba la actividad proteolítica, no se degrada el I $\kappa$ B- $\alpha$  que se halla en solución, por consiguiente no se podrá detectar fragmento marcado alguno.

55

60 Otra alternativa del ensayo sin células del paso a) consiste en preparar un complejo del I $\kappa$ B- $\alpha$  con p50 y/o p65, cuyos componentes son con preferencia de origen recombinante, en el supuesto de que estén disponibles en conjunto, y el I $\kappa$ B- $\alpha$  no presenta marcador medible alguno, y en tratar este complejo en presencia de la sustancia de ensayo con un preparado de actividad proteolítica. Cuando se hace efectiva la actividad proteolítica, como sucede cuando la sustancia de ensayo no es capaz de inhibir esta actividad, entonces se digiere y degrada el I $\kappa$ B- $\alpha$  del complejo, el marcador se halla en los fragmentos proteolíticos, que después de la filtración pueden detectarse también en este caso en el líquido eluido. Si con la sustancia de ensayo se inhibe la actividad proteolítica, entonces el I $\kappa$ B- $\alpha$  permanece asociado al complejo y no pasa marcador alguno al líquido eluido. En principio puede hacerse el seguimiento de la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$  a través de los cambios de fluorescencia propia del complejo, dichos cambios obedecen a cambios estructurales.

65

Los resultados obtenidos en el marco de la presente invención indican que el inhibidor de proteasa NBIG produce la acumulación de una forma fosforilada del I $\kappa$ B- $\alpha$  y dan pie a una variante de ensayo sin células, en la que se utiliza

como sustrato de la proteasa una forma fosforilada del I $\kappa$ B- $\alpha$ . Una vez se ha comprobado en primer lugar mediante ensayo Western Blot con anticuerpos de I $\kappa$ B- $\alpha$  o mediante ensayo ELISA con adición de proteasa, p.ej. del proteasoma purificado o de fracciones celulares que contienen proteasa, que el I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilado constituye realmente la forma de sustrato labilizada con una proteasa (constitutiva) para la degradación, podrá obtenerse este sustrato del modo siguiente.

Se tratan las células humanas idóneas, que expresan el NF- $\kappa$ B y el I $\kappa$ B- $\alpha$ , por ejemplo las células HeLa o las células 293 (ATCC CRL 1573), con un inhibidor de proteasa, que en los ensayos previos ha evidenciado que produce la acumulación de la forma fosforilada del I $\kappa$ B- $\alpha$ , por ejemplo con el NBIG en una concentración de 75  $\mu$ M. A continuación se estimulan las células con un inductor de la activación del NF- $\kappa$ B durante un período de tiempo, que se requiere para tal activación, por ejemplo con TNF- $\alpha$  durante 15 minutos, o con PMA o con IL-1. De los extractos citoplasmáticos de las células tratadas de este modo se obtiene p.ej. por cromatografía de gradientes de glicerina, por filtración a través de gel o por cromatografía de intercambio iónico, el complejo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B- $\alpha$ , que contiene el I $\kappa$ B- $\alpha$  en forma fosforilada, eventualmente enriquecida, separándose del NBIG en exceso y de la proteasa endógena inactivada por este. Para convertir la totalidad del I $\kappa$ B- $\alpha$  en la forma fosforilada se añade con preferencia un inhibidor de fosfatasa, por ejemplo el ácido de Okada, en una concentración idónea, por ejemplo 100 nmolar.

El I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilado resultante, que constituye el sustrato para la proteasa, que conduce a la activación del NF- $\kappa$ B, puede utilizarse en los ensayos mencionados anteriormente para encontrar inhibidores de la activación del NF- $\kappa$ B (como alternativa puede proporcionarse el I $\kappa$ B- $\alpha$  en forma fosforilada, para ello se fosforila “*in vitro*” el I $\kappa$ B- $\alpha$  recombinante). El principio de este ensayo continúa siendo el mismo: en ausencia de inhibidores de proteasa (sin añadir sustancias de ensayo o en presencia de sustancias de ensayos sin actividad inhibitoria) se degrada el sustrato fosforilado, pero en presencia de inhibidores continúa siendo detectable la forma fosforilada del complejo NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Para poder concentrar los resultados positivos obtenidos en el paso a) en lo referente a la especificidad de las sustancias de ensayo para la degradación proteolítica del I $\kappa$ B- $\alpha$ , se realizan controles adicionales.

En efecto, se estudia p.ej. el inhibidor hallado en el paso a) para determinar si perjudica directamente la actividad de otras proteasas. Para ello se procede de modo conveniente para estudiar el efecto del inhibidor en la actividad de una proteasa, que tenga un sustrato distinto al del I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Para estudiar si el inhibidor actúa indirectamente, es decir sobre el sustrato del I $\kappa$ B- $\alpha$ , se analiza de modo conveniente el efecto del inhibidor sobre una proteasa conocida, p.ej. la quimotripsina (para ello deberá asegurarse mediante ensayos previos, que el inhibidor no influye directamente en la actividad de esta proteasa de control).

Los resultados obtenidos en el marco de la presente invención indican que la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$  es una serina-proteasa similar a la quimotripsina. Después de la confirmación de este resultado en un sistema sin células por el inhibidor TPCK, el procedimiento de exploración de la invención puede ampliarse al estudio de derivados principales de inhibidores de serina-proteasa. Como control se estudia de modo conveniente el efecto del inhibidor hallado por un lado sobre la serina-proteasa, p.ej. la quimotripsina y por otro lado sobre la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$ . (Para el caso, en el que contra lo esperado no se confirme este resultado, entonces podrá procederse en principio de forma similar: analizando los derivados principales de los inhibidores del grupo de las proteasas, en el que se incluye definitivamente a la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$ , y realizando los controles correspondientes.)

La elección de la variante de ensayo más apropiada se efectúa en base a los ensayos previos, p.ej. si se emplea como sustrato del ensayo la I $\kappa$ B- $\alpha$  sola, eventualmente en forma fosforilada, o en asociación con sus correactivos de complejo, el p50 y/o el p65, así como las condiciones específicas del ensayo.

Las demás condiciones del ensayo, como son el tipo y la concentración del inductor, la duración y las condiciones de la inducción, la disgregación celular, la cantidad de I $\kappa$ B- $\alpha$  o de sus correactivos de complejo eventualmente presentes, el soporte y la fijación de la I $\kappa$ B- $\alpha$  o de sus correactivos de complejo sobre el soporte (fijación sobre placas de microvaloración mediante engarces cruzados bivalentes, como son el glutaraldehído, sobre Sepharose mediante bromociano, etc.), el marcador (enzima fijada, radioisótopo, sustancia fluorescente, quimioluminiscente o bioluminiscente, etc.), la duración del tratamiento, la naturaleza y el número de controles efectuados, etc., pueden optimizarse mediante ensayos previos.

Las condiciones de ensayo del paso a) se eligen con preferencia de modo que el ensayo pueda automatizarse.

Para el caso, en el que con el ensayo realizado con el extracto celular no se logre esclarecer la especificidad del inhibidor en lo referente a la inhibición de la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$ , entonces después del ensayo sin células o paralelamente al mismo se realiza un ensayo llamado celular (paso b), en el que se determina la acción de la sustancia de ensayo sobre la activación del NF- $\kappa$ B en la célula intacta. El paso b) se realiza con preferencia en cada caso, con el fin de confirmar el efecto inhibitorio de la sustancia de ensayo, observado en el ensayo sin células, sobre la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en la célula intacta.

El constructo del gen informante (reporter), con el que se transforma la célula de ensayo utilizada en b), se denominará en lo sucesivo “DNA sensor”. Este término indica un constructo de DNA, que contiene un gen informante

controlado por secuencias reguladoras, que reaccionan o responden a una activación del NF- $\kappa$ B, por el hecho de que contienen por lo menos una secuencia de fijación para el NF- $\kappa$ B. Cuando el NF- $\kappa$ B se activa, entonces el NF- $\kappa$ B se fija sobre la secuencia de reconocimiento, seguidamente se pone en marcha la expresión del gen informante, que genera una señal medible.

5

El DNA sensor se halla con preferencia en un plásmido, que puede multiplicarse en un organismo hospedante idóneo, con preferencia en la *E. coli*, dando lugar a un número elevado de copias, y que, después de la transfección en células de animales mamíferos y de la integración en el genoma del hospedante, permite la expresión de un gen informante controlado por elementos reguladores. Es, con preferencia, un vector de tipo lanzadera (shuttle), que contiene un cassette de expresión para el gen informante (DNA sensor) y un marcador seleccionable para las células de animales mamíferos así como por lo menos un origen de replicación y un marcador para la multiplicación y la selección en *E. coli*.

10

Para la obtención de líneas celulares permanentes, que contengan el DNA sensor integrado de modo estable en su genoma, el vector deberá tener un marcador de selección dominante. No es crítico el uso de un marcador de selección dominante, son idóneos p.ej. el gen de neomicina-fosfotransferasa (neo), que confiere resistencia al antibiótico genético (G-418) (Southern y Berg, 1982), el gen DHFR (dihidrofolato-reductasa) para células deficitarias en DHFR, el gen de xantina-guanina-fosforribosil-transferasa (gpt), que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981) o el gen de higromicina-B-fosfotransferasa (hph; Gritz y Davies, 1983). Son ejemplos de promotores, que llevan el gen de marcador de selección el promotor llamado SV40-Early-Promotor, el promotor de citomegalovirus (CMV-Promotor), del promotor del gen de timidina-quinasa del virus del herpes simple (TK-Promotor), el virus del sarcoma de Rous (RSV) con repetición de terminal larga (LTR). Los plásmidos se construyen con preferencia de tal manera que los distintos elementos importantes, como son el gen informante, el promotor del gen informante, las secuencias reguladoras del marcador de selección, pueden intercambiarse o modificarse de forma sencilla, para poder adaptarse a las exigencias cambiantes que puedan producirse, derivadas de un caso especial de aplicación, p.ej. a raíz del uso de otra línea celular. Tales medidas consisten p.ej. en incorporar posiciones de multiclonación antes del o de los promotores o antes del gen informante, con el fin de permitir la clonación de secuencias reguladoras, que modulan al promotor, o la clonación de diferentes genes informantes.

25

Para la elección de un gen informante idóneo se parte de la idea de proporcionar un ensayo automatizable de alta sensibilidad, con preferencia no radiactivo.

30

En el marco de la presente invención pueden utilizarse fundamentalmente todos los genes informantes que cumplan los requisitos siguientes:

35

La fosfatasa alcalina puede medirse empleando un sustrato quimioluminiscente de gran sensibilidad, pero tiene el inconveniente de que muchas células de animales mamíferos expresan esta enzima de forma relativamente fuerte. Por lo tanto, como gen informante solamente se toman en consideración en general aquellas líneas celulares que no la expresan o que la expresan débilmente.

40

Los productos de expresión del gen de la  $\beta$ -galactosidasa o de la  $\beta$ -glucuronidasa pueden desprender el correspondiente metilumbeliferil-galactósido o -glucurónido, con formación de grupos fluorescentes. El seguimiento de estas reacciones enzimáticas se efectúa con ensayos de fluorescencia ya conocidos (Wieland y col., 1985; Kricka, 1988).

45

La expresión de la cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT) se puede detectar con sensibilidad relativamente buena, pero el ensayo tiene entre otros el inconveniente de ser radiactivo y difícilmente automatizable (Hartmann, 1991).

50

En el marco de la presente invención se utiliza como gen informante con preferencia el gen que codifica a la luciferasa del *Photinus pyralis* (De Wet y col., 1987). Esta enzima tiene las ventajas de que, con su sustrato de luciferina, genera bioluminiscencia con buen rendimiento cuando se le añade el ATP, dicha bioluminiscencia pueden medirse por métodos establecidos y automatizables y de que las células de animales mamíferos no producen esta enzima de modo endógeno. Además, la luciferasa tiene un período de vida media relativamente corto “*in vivo*” y no es tóxica, incluso cuando su concentración es elevada (Hartmann, 1991; Brasier y col., 1989). La medición de la actividad de la luciferasa de la luciérnaga mediante bioluminiscencia constituye uno de los métodos más sensibles de determinación enzimática. Por lo tanto, debido a la ausencia de actividad de luciferasa en las células normales de animales mamíferos, esta enzima es particularmente indicara como gen informante (Subramani y DeLuca, 1987).

55

Como alternativa puede utilizarse como gen informante el gen de que codifica a la enzima apoecorina de la medusa *Aequoria victoria* (Tanahashi y col., 1990). Esta enzima tiene la ventaja de que, con su co-factor coelenterazina, después de la fijación de iones de calcio genera bioluminiscencia en gran rendimiento, que puede medirse mediante métodos establecidos y automatizables. Otra ventaja consiste en que las células de animales mamíferos no expresan esta enzima de forma endógena.

60

El gen informante es acarreado por un promotor que es independiente de otros factores y visualiza bien la inducción de la expresión genética, p.ej. el promotor de la timidina-quinasa. El requisito que debe cumplir el promotor es que el gen informante que acarrea se transcriba de forma correcta y medible. Como promotores se toman en consideración los promotores mínimos, p.ej. el promotor mínimo de TK y el promotor mínimo de la  $\beta$ -globina. Para los ensayos

65

celulares realizados en el marco de la presente invención se emplea el promotor la TK de -105 a +52, que posee una actividad basal relativamente alta y es fácil de estimular; en los ensayos previos han dado también buenos resultados el promotor mínimo de la TK de -30 a -87.

5 Como motivo de fijación del NF- $\kappa$ B es idóneo en principio cualquier motivo de la secuencia de consenso 5'-GGGPuNNTPyCC-3', p.ej. puede emplearse el motivo bien caracterizado de la cadena  $\kappa$  ligera de la inmunoglobulina, que tiene la secuencia 5'-GGGACTTCC-3'. El motivo de fijación NF- $\kappa$ B está presente de modo conveniente por lo menos en dos copias a una distancia pequeña (aprox. 10 nucleótidos); en el marco de los ensayos realizados se emplean seis motivos  $\kappa$ B.

10 En principio pueden emplearse secuencias de fijación de NF- $\kappa$ B de todos aquellos genes que puedan controlarse con el NF- $\kappa$ B (Baeuerle, 1991). En el caso de que los genes, además de la secuencia de fijación NF- $\kappa$ B contengan otros dominios de fijación para otros factores de transcripción, entonces preferentemente estos se eliminarán.

15 Como células de control se emplean células que, en su gen informante, no contienen motivo de fijación alguno de DNA para el NF- $\kappa$ B. Las células de control permiten encontrar un efecto inespecífico de la sustancia sobre la expresión genética; una señal generada por ejemplo en la célula de control sobresaldría de la transcripción base y por lo tanto tendría que restarse de la señal obtenida en la célula de ensayo.

20 Las células de ensayo tienen que cumplir la condición de que el NF- $\kappa$ B endógeno en ellas puede activarse fácilmente, el NF- $\kappa$ B no debe ser constitutivo de estas células.

Por otro lado, las células tienen que ser inducibles por sustancias que activan al NF- $\kappa$ B, p.ej. el PMA, LPS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, luz UV.

25 Puede estudiarse la idoneidad de las células de ensayo transformándolas con el DNA sensor y determinando la cinética de la inducción de la expresión del gen informante en función de la concentración del inductor de las células.

En lo que respecta a un procedimiento automatizado, las células deberían ser lo más adherentes posible.

30 Con el procedimiento de la invención se detecta de forma directa o indirecta la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$  y, por tanto, la activación de sustancias que inhiben el NF- $\kappa$ B; es decir, incluso aquellas sustancias que inhiben la fosforilación de la I $\kappa$ B- $\alpha$ ; es indiferente para el efecto inhibitor que la proteasa propiamente dicha sea específica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , lo importante es que sea específica con cuanto a la activación.

35 Las sustancias, que inhiben específicamente la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , pueden utilizarse para el tratamiento de estados patológicos, en los que interviene una expresión de genes controlados por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

40 Entre los estados patológicos provocados por la acción nociva de la expresión genética causada por la activación del NF- $\kappa$ B se cuentan, entre otros, las enfermedades inflamatorias, que se derivan de la activación de las células T, macrófagos o células B, el choque tóxico, las enfermedades después de la infección con virus, que posean motivos  $\kappa$ B, las lesiones por luz UV (quemaduras del sol), lesiones por radiaciones, quemaduras, rechazos de trasplantes, lesiones de reperfusión.

45 Para la aplicación terapéutica, las sustancias identificadas por el procedimiento de la invención, que en una fase posterior de desarrollo de medicamentos se caracterizarán con mayor detalle por los métodos habituales en lo referente a sus propiedades farmacológicas, p.ej. en exploraciones secundarias y en ensayos con animales, se formulan en función de cada forma de aplicación junto con materiales soporte o adyuvantes idóneos, farmacéuticamente aceptables, que garanticen la biodisponibilidad de los principios terapéuticamente activos y no ejercen ningún efecto dañino sobre el organismo. Los métodos para la formulación de preparados farmacéuticos se encontrarán en manuales monográficos, se remite por ejemplo al Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980.

55 En el marco de la presente invención se constata la acción de inhibidores de proteasa sobre la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Se confirma la inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B en células de ensayo inducidas, transformadas con un constructo de gen de luciferasa que reacciona al NF- $\kappa$ B y se confirma la inhibición de la expresión regulada por el NF- $\kappa$ B en la IL-6 e IL-8. En el marco de la presente invención se hace el seguimiento del destino de la subunidad inhibidora I $\kappa$ B- $\alpha$ , específica del NF- $\kappa$ B, después del tratamiento de las células con estímulos activadores del NF- $\kappa$ B. Para ello se emplean la I $\kappa$ B- $\alpha$  recombinante humana, muy purificada, para obtener un antisuero de conejo; la IgG específica se purifica por afinidad con la I $\kappa$ B- $\alpha$  inmovilizada. La IgG policlonal, específica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , reconoce una única banda de 38 K del tamaño previsto de la I $\kappa$ B- $\alpha$  (figura 1A, pista 1) en los ensayos Western Blot de un extracto global de células de ratón 70Z/3 pre-B. Esta banda no es reconocida por un anticuerpo de control (anticuerpo IgG anti-conejo) (figura 1A, pista 2). Entre 2 y 5 min después de la adición del forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a los cultivos celulares de 70Z/3, la banda de la I $\kappa$ B- $\alpha$  desaparece casi por completo de las células (figura 1B, compárense las pistas 3 y 4). Además, las células no presentan inmunorreactividad alguna a la I $\kappa$ B- $\alpha$ , hasta que esta vuelve a aparecer al cabo de 40 min después de la estimulación de las células (figura 1B, pista 7). Se analiza la actividad de fijación de DNA específica del  $\kappa$ B en partes alícuotas de los mismos extractos celulares mediante un ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA). Tal como se desprende la figura 1C (véanse las pistas 2 y 3), la desaparición de

la I $\kappa$ B- $\alpha$  se solapa exactamente con la aparición de la actividad de fijación de DNA del NF- $\kappa$ B, lo cual permite deducir que existe entre ambos acontecimientos un nexo causal.

El NF- $\kappa$ B puede activarse también de forma potente en las células 70Z/3 por tratamiento con IL-1 $\beta$  y LPS. La activación del NF- $\kappa$ B por el TNF- $\alpha$  puede estudiarse en células HeLa. Tal como se representa en la figura 1, la IL-1 $\beta$ , el LPS y el TNF- $\alpha$  inducen en conjunto una disgregación de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en células 70Z/3 o HeLa. Sin embargo, existen diferencias cinéticas en lo referente al inicio de la desaparición de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . La mayor de la I $\kappa$ B- $\alpha$  se ha descompuesto ya al cabo de 5 minutos de la estimulación de las células 70Z/3 con el PMA (figura 1B) o de las células HeLa con TNF- $\alpha$  (figura 2). La descomposición comienza un poco más tarde con la estimulación de las células 70Z/3 con la IL-1 $\beta$ ; después de 5 min de estimulación sigue habiendo más I $\kappa$ B- $\alpha$  que la que se observa en las células tratadas con PMA o TNF- $\alpha$  (figura 2B). En las células 70Z/3 estimuladas con LPS, la mayor parte de la I $\kappa$ B- $\alpha$  sigue sin descomponerse al cabo de 30 min de la inducción (figura 2). De nuevo, a saber en los tres inductores, la desaparición de la I $\kappa$ B- $\alpha$  se produce inmediatamente después de la aparición de la actividad de fijación de DNA del NF- $\kappa$ B en las células. Estas observaciones demuestran que los cuatro inductores del NF- $\kappa$ B utilizan un mecanismo común de inactivación del NF- $\kappa$ B, en el que interviene la descomposición de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Las diferencias cinéticas de la descomposición permiten suponer que los inductores se diferencian en los conductos de transducción de señales previos a la activación del NF- $\kappa$ B. Por el hecho de emplear un anticuerpo policlonal, es improbable que, después de la estimulación, solamente se haya perdido o modificado un epítipo de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Es mucho más probable que la pérdida de la inmunoreactividad de la I $\kappa$ B- $\alpha$  se deba a una descomposición rápida y total de la proteína, que no conduce a productos de descomposición detectables inmunológicamente. Después de una estimulación con PMA, IL-1 $\beta$ , LPS o TNF- $\alpha$  no resulta visible alteración alguna de la movilidad electroforética de la I $\kappa$ B- $\alpha$  a través de los geles de SDS, lo cual constituiría una prueba de esta descomposición, por ejemplo una modificación postraduccional previa de la I $\kappa$ B- $\alpha$ .

De la cicloheximida y de la anisomicina, inhibidores de la síntesis de proteínas, se sabe que activan el NF- $\kappa$ B en las células 70Z/3 (Sen y Baltimore, 1986). El tratamiento de una hora de las células 70Z/3 con cicloheximida, realizado en el marco de la presente invención, induce, pero débilmente, la fijación del NF- $\kappa$ B sobre el DNA (figura 3A, pista 1, recuadro superior). En los Western Blot se podían detectar todavía en estas células grandes cantidades de I $\kappa$ B- $\alpha$  (figura 3A, pista 1, recuadro inferior). De ello se deduce que la inhibición del grado de conversión normal de la I $\kappa$ B- $\alpha$  no es suficiente para una activación eficaz y rápida del NF- $\kappa$ B. Cuando las células tratadas previamente con cicloheximida se inducen con PMA, se observa una descomposición rápida de la I $\kappa$ B- $\alpha$  y a continuación la inducción de la fijación del NF- $\kappa$ B sobre el DNA (figura 3A); la cinética anterior de la disminución del I $\kappa$ B- $\alpha$ , constatada aquí, no se puede diferenciar de la observada con el PMA solo (compárese la figura 3A con la figura 1B). Sin embargo, la cicloheximida, inhibidora de la síntesis de proteínas, impide la reaparición de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , que solamente se observa 40 min después del tratamiento con PMA (compárese la figura 3A con la figura 1B), lo cual indica que esta I $\kappa$ B- $\alpha$  procede de una síntesis nueva, tal vez por el control transcripcional del mismo NF- $\kappa$ B.

Se determina también el período de vida media de las células interrumpidas en la síntesis proteica por la I $\kappa$ B- $\alpha$ , con y sin estimulación posterior de las células con PMA. El período de vida media de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en células 70Z/3 tratadas con cicloheximida se sitúa en torno a 138 min, según determinación por análisis Western-Blot cuantitativo (figura 3B). El período de vida media de la I $\kappa$ B- $\alpha$  se reduce a solo 1,5 min en el período de su degradación más rápida durante los 2-5 min después de la estimulación con PMA; esto indica que el PMA induce una degradación 90 veces más potente de la I $\kappa$ B- $\alpha$ .

Para esclarecer si la descomposición inducible de la I $\kappa$ B- $\alpha$  es un paso necesario para la activación del NF- $\kappa$ B se exponen los cultivos celulares al tratamiento de inhibidores de proteasa. Entre las distintas sustancias, de las que se constata que son activas, el inhibidor de la quimotripsina, la p-tolil-L-fenilalaninaclorometilcetona (TPCK) resultó ser el inhibidor más potente de la activación del NF- $\kappa$ B en diversos tipos de células. Un tratamiento de una hora de las células 70Z/3 con TPCK 25  $\mu$ M resultó suficiente para reprimir por completo la aparición de la actividad de fijación de DNA del NF- $\kappa$ B, realizando a continuación un tratamiento con PMA (figura 4, recuadro superior). El valor ID<sub>50</sub> de la TPCK es de 8  $\mu$ M. No resulta mermada significativamente la actividad constitutiva de fijación de DNA, incluido el factor nuclear oct-1 (figura 4A). Tal como se vio en el ensayo Western Blot, el inhibidor de proteasa puede inhibir por completo la descomposición de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en células tratadas con PMA (figura 4A, recuadro inferior). La TPCK actúa incluso como inhibidora, cuando se añade al mismo tiempo que el PMA y es igualmente eficaz para evitar la activación del NF- $\kappa$ B por acción de la IL-1 $\beta$  y el LPS en células 70Z/3 (figura 4A, pistas 6 y 7) y por acción del TNF- $\alpha$  en otras líneas celulares diversas. Un tratamiento de las células con el inhibidor de proteasa después de la estimulación con PMA, IL-1 o LPS no perjudica en gran manera la activación del NF- $\kappa$ B, pero posiblemente interrumpe una activación ulterior (figura 4A, pistas 10-12). Esto indica que la TPCK no merma simplemente la fijación de DNA del NF- $\kappa$ B o no conduce a una descomposición del NF- $\kappa$ B, fenómenos que se habrían observado en la lisis celular. Es igualmente improbable que la TPCK inhiba la PKC, porque la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  habrán puesto de manifiesto que activan el NF- $\kappa$ B con independencia de las isoenzimas PKC inducibles por PMA (Bomsztyk y col., 1991; Meichle y col., 1990).

La p-tosil-L-lisinaclorometilcetona (TLCK) es un inhibidor de las serina-proteasas similares a las tripsina-proteasas y por su estructura y actividad química es muy afín a la TPCK. La TLCK en una concentración de 25  $\mu$ M no consigue evitar en las células 70Z/3 la activación del NF- $\kappa$ B (figura 4B, pista 3). Sin embargo, se observa que la TLCK en una concentración de 100  $\mu$ M provoca una inhibición parcial de la activación del NF- $\kappa$ B. Hay otros inhibidores de proteasas que también son activos, pero en concentraciones elevadas. El efecto selectivo y fuertemente inhibidor de la TPCK permite suponer que en la activación del NF- $\kappa$ B participa una serina-proteasa similar a la quimotripsina. Esta proteasa se denomina en lo sucesivo I $\kappa$ B- $\alpha$ -proteasa.

Se ha publicado recientemente que los compuestos oxigenados reactivos podrían actuar como sustancias mensajeras en la activación del NF- $\kappa$ B por parte de factores inductores (Schreck y col., 1991; Schreck y col., 1992a, b). Esta hipótesis se basa en parte en el hecho de que los antioxidantes, por ejemplo compuestos tiol, ditiocarbamatos y formadores de quelatos con hierro libre, reprimen la activación del NF- $\kappa$ B en células intactas. Un inhibidor anti-oxidante muy potente de la activación del NF- $\kappa$ B es el pirrolidinaditiocarbamato (PDTC; Schreck y col., 1992b). Si la descomposición de la I $\kappa$ B- $\alpha$  participa decisivamente en la activación del NF- $\kappa$ B, el PDTC, al igual que la TPCK, debería impedir la desaparición de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , aunque esta inhibición podría transcurrir en virtud de un mecanismo que actúa muy por encima de la I $\kappa$ B- $\alpha$ -proteasa. El PDTC 100  $\mu$ M reprime eficazmente la activación de la actividad de fijación del NF- $\kappa$ B en células 70Z/3 tratadas con PMA (figura 5). Como era de esperar, en el Western Blot no se detecta ninguna descomposición significativa de la proteína I $\kappa$ B- $\alpha$ . En fecha recientes se ha demostrado que el PDTC no interfiere en la asociación de membrana ni en la actividad de quinasa de la PKC inducidas por el PMA, lo cual es un argumento en contra de la acción directa de la PKC sobre la I $\kappa$ B- $\alpha$  en células intactas.

Por los resultados obtenidos en el marco de la presente invención puede concluirse que la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , como respuesta al PMA, IL-1 $\beta$ , LPS y TNF- $\alpha$ , es un paso necesario en el proceso de activación del NF- $\kappa$ B. Esto se deduce no solo del estrecho lapso temporal entre la descomposición de la I $\kappa$ B- $\alpha$  y la activación del NF- $\kappa$ B, sino también y con mayor fuerza de la acción inhibitoria selectiva que se observa en concentraciones bajas de la TPCK, inhibidor de proteasa bien caracterizado. La degradación inducible tiene como causa una disminución dramática de la estabilidad de la proteína y no por el bloqueo de su nueva síntesis. El período normal de vida media de la subunidad inhibitoria podría explicar la débil activación del NF- $\kappa$ B por los inhibidores de la síntesis de proteína, pero esto es claramente insuficiente para inducir un agotamiento rápido y total de la I $\kappa$ B- $\alpha$  y activar de forma potente al NF- $\kappa$ B, tal como se observa con el PMA y otros estímulos.

Una mayor degradación de la I $\kappa$ B podría controlar mediante diversos mecanismos: en primer lugar, una nueva modificación de la proteína I $\kappa$ B podría convertir al inhibidor en más sensible para la degradación causada a una proteasa constitutiva. En segundo lugar, es posible que se active una proteasa que degrade selectivamente a la I $\kappa$ B. Un aspecto interesante de esta posibilidad consiste en que la proteasa I $\kappa$ B- $\alpha$  o un inhibidor de proteasa podría ser la diana directa de sustancias mensajeras por encima de ello, como son las proteína-quinasa. En tercer lugar, podrían ser necesarias tanto una modificación de la I $\kappa$ B como una inducción de una actividad de proteasa. En base a los resultados presentes todavía no se puede diferenciar claramente entre estas posibilidades.

En el marco de la presente invención se plantea también la cuestión siguiente: ¿en qué medida una fosforilación directa de la I $\kappa$ B podría participar en la liberación de la I $\kappa$ B y en la activación del NF- $\kappa$ B en células intactas? En base a los ensayos realizados hasta el momento no se dispone de datos de fosforilación en células intactas que avalen la fosforilación inducible de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , a pesar de que se haya observado una fosforilación constitutiva de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Los datos presentes solamente pueden armonizarse con los datos de quinasa obtenidos “*in vitro*” (Shirakawa y Mizel, 1989; Ghosh y Baltimore, 1990; Kerr y col., 1991) suponiendo que es necesaria una degradación para eliminar rápidamente la I $\kappa$ B liberada por fosforilación. Una degradación podría ser necesaria para impedir que la I $\kappa$ B, una vez se haya desfosforilado, vuelva a inhibir otra vez al NF- $\kappa$ B. Pero, a la vista de la potente acción inhibitoria del inhibidor de proteasa, la TPCK, la fosforilación de la I $\kappa$ B- $\alpha$  podría ser demasiado fugaz para activar el NF- $\kappa$ B y permitir su absorción en los núcleos de las células o bien para poderse detectar con los métodos empleados.

Una degradación proteolítica controlada de la I $\kappa$ B sería un mecanismo excelente para convertir en reversible la activación del NF- $\kappa$ B. La única posibilidad de inhibir al NF- $\kappa$ B activado consistiría entonces en la I $\kappa$ B recién sintetizada. Una cuestión importante es la siguiente: si la I $\kappa$ B- $\alpha$ -proteasa ataca a la I $\kappa$ B- $\alpha$  en el complejo citoplasmático con el NF- $\kappa$ B; o bien, si antes es necesaria la liberación de la I $\kappa$ B del NF- $\kappa$ B. En los ensayos se ha constatado que la I $\kappa$ B- $\alpha$  sobreexpresada no se degrada de forma significativa después de una estimulación de TNF- $\alpha$ , mientras que lo contrario se cumple para la endógena. Esto significa además que solo la I $\kappa$ B asociada con el NF- $\kappa$ B es un sustrato para la I $\kappa$ B- $\alpha$ -proteasa, por lo cual queda obsoleta la necesidad de marcado, aunque no la necesidad de modificación de la I $\kappa$ B- $\alpha$  mediante una fosforilación directa. Una degradación específica de una subunidad de un regulador de transcripción se ha constatado ya para el represor  $\alpha$ 2 de la levadura (Hochstrasser y Varshavsky, 1990).

Los inhibidores específicos de la I $\kappa$ B- $\alpha$ -proteasa son idóneos como principios activos farmacéuticos para impedir la activación del NF- $\kappa$ B, al que se atribuyen numerosos estados patológicos. Son ejemplos de los numerosos estados importantes desde el punto de la biomedicina, en los que interviene decisivamente el NF- $\kappa$ B como transmisor de señales y activador de genes llamados “immediate-early” (inmediatos-precoces), son la progresión del SIDA, la activación de células T, células B y macrófagos durante la respuesta inmune, la respuesta llamada “acute phase response”, el choque tóxico, el rechazo de trasplante y la respuesta de las células a la radiación  $\gamma$  y a la luz UV. Los inhibidores específicos de la I $\kappa$ B- $\alpha$  son eficaces como medicamentos antiinflamatorios e inmunosupresores.

#### Cuadro sinópticos de las figuras

En la figura 1 se representa el destino de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en células 70Z/3 pre-B estimuladas.

En la figura 2 se representa la acción de la IL-1 $\beta$ , LPS y TNF- $\alpha$  en la activación del NF- $\kappa$ B y en la estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$ .

## ES 2 268 685 T3

En la figura 3 se representa la acción de un inhibidor de síntesis de proteínas en la estabilidad de la  $I\kappa B-\alpha$  y en la activación del NF- $\kappa B$  en células 70Z/3.

En la figura 4 se representa la acción de los inhibidores de proteasas, la TPCK y la TLCK, sobre la activación del NF- $\kappa B$  y la estabilidad de la  $I\kappa B-\alpha$  en células 70Z/3.

En la figura 5 se representa la acción de la PDTC en la activación del NF- $\kappa B$  y la estabilidad de la  $I\kappa B-\alpha$  en células 70Z/3.

En la figura 6 se representa la acción del inhibidor de proteasa, la TPCK, en la activación del gen informante por el NF- $\kappa B$  en células HeLa.

En la figura 7 se representa la acción de los inhibidores de proteasa, el Z-Ile-Glu(Ot-Bu)-Ala-Leucinal y el Z-Leu-Leucinal, en la activación del NF- $\kappa B$  y la estabilidad de la  $I\kappa B-\alpha$  en células HeLa.

En la figura 8 se representa un estudio de la acción represora de los inhibidores de proteasa, el Z-Ile-Glu(Ot-Bu)-Ala-Leucinal y el Z-Leu-Leucinal, en la degradación proteolítica de la  $I\kappa B-\alpha$  inducida por el TNF- $\alpha$ .

En la figura 9 se representa la relación entre la inducción de la activación del NF- $\kappa B$  debida al TNF- $\alpha$  y la aparición de la  $I\kappa B-\alpha$  fosforilada.

### Ejemplo 1

#### *Destino de la $I\kappa B-\alpha$ en células 70Z/3 pre-B estimuladas*

Se cultivan las células 70Z/3 (ATCC n° TIB 158) en medio RPMI-1640 (Gibco BRL), completado con un 10% de FCS (Gibco BRL) y 2-mercaptoetanol 50  $\mu M$ . Se tratan partes alícuotas de 2 ml de aprox. 2 - 3 x 10<sup>6</sup> células suspendidas con 50 ng/ml de PMA (Sigma) durante diferentes períodos de tiempo. El tratamiento se interrumpe con una centrifugación inmediata (5 s en una microcentrifugadora Eppendorf) y enfriamiento sobre hielo. Se lisan los culotes celulares con 60  $\mu l$  de un tampón de extracción de alto contenido en sal, que contiene el detergente no iónico Nonidet P-40 (Bauerle y Baltimore, 1988b). Se analizan los líquidos sobrenadantes de una centrifugación de 15 minutos a 13.000 rpm en una microcentrifugadora Eppendorf mediante ensayos Western Blot y EMSA (electrophoretic mobility shift assay = ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética). Para la SDS-PAGE y los Western Blot se mezclan partes alícuotas de 30  $\mu l$  de los extractos con 15 de los extractos con 15  $\mu l$  de tampón de muestras SDS (Laemmli, 1970), se mantienen en ebullición y se someten a una SDS-PAGE en minigeles de poliacrilamida al 12,5% (Biorad). Las proteínas se trasladan de los geles mediante un dispositivo de punteado (blot) llamado "semiseco" (Biorad; a 15 V/2,5 mA/cm<sup>2</sup> durante 1 h) al filtro Immobilon-P (0,45  $\mu m$ ; Millipore). La capacidad de resolución del Blot se comprueba con la tinción de las proteínas del filtro con el Ponceau S (Serva). Se bloquean los filtros durante una noche en solución salina tamponada con Tris, que contiene un 0,1% (v/v) de Tween 20 (TBST), un 5% de leche desnatada en polvo (Nestlé) y un 1% de BSA. A continuación se incuba el filtro a temperatura ambiente durante una hora con IgG anti- $I\kappa B-\alpha$  en un eluido dializado de la columna de afinidad de la  $I\kappa B-\alpha$ , diluido 1:100 con tampón de bloqueo. Después de un lavado de 30 minutos con TBST se incuba el filtro en una dilución 1:4000 de un conjugado de IgG de cabra anti-conejo/oxidasa de rábano rústico (Biorad) en tampón de bloqueo. Después de un lavado de 30 minutos en TBST se trata el filtro con reactivo de detección ECL (Amersham) y se expone (película Kodak XR, menos de 1 min). Para el ensayo EMSA se añaden partes alícuotas de 2  $\mu l$  de los extractos a una mezcla de fijación, lo cual da lugar a una concentración final de KCl 100 mM, HEPES 20 mM, pH 7,9, ditiotreititol 2,5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM, un 0,2% de Nonidet P-40, un 5% de Ficoll, 20  $\mu g$  de BSA, 3  $\mu g$  de poli(dI-dC) y 10.000 cpm (forma de recuento de Cerenkov) de una sonda de oligonucleótido  $\kappa B$  de doble hebra, marcado con P<sup>32</sup> (Gibco BRL). Se confirma la especificidad del complejo proteína-DNA mediante ensayos de competencia y superdesplazamiento con un anticuerpo policlonal, que reconoce los 100 aminoácidos del extremo C del Rel-A (p65). Después de una incubación de 20 minutos sobre hielo se someten las muestras a una electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 4%, realizada en 0,5 x TBE. Se exponen los geles secados (película Kodak X, -70°C, durante una noche).

Se prepara la  $I\kappa B-\alpha$  humana en *E. coli* y se purifica del modo descrito por Zabel y col., 1993. Se prepara un antisuero contra la  $I\kappa B-\alpha$  en conejos, la IgG específica en 2 ml de suero, purificada por afinidad en  $I\kappa B-\alpha$ -Sepharose (Henkel y col., 1992). Se hacen reaccionar 2 mg de  $I\kappa B-\alpha$  humana, purificada por afinidad, marcada con 6 x His, con 0,5 ml de Sepharose 4CL-B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante, después de operaciones de lavado abundante con PBS y 2 volúmenes de columna de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7, se eluyen los anticuerpos específicos con 2 volúmenes de clorhidrato de guanidina 4 M. Se dializa el líquido eluido frente a TBST abundante.

El resultado de los ensayos realizados se representa en la figura 1. A: especificidad de un anticuerpo policlonal de conejo anti- $I\kappa B-\alpha$ , purificado por afinidad, en los Western Blot. Tal como se ha indicado antes, se separan las proteínas de las células 70Z/3 no estimuladas de un extracto celular global de gran concentración salina mediante electroforesis a través de gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se trasladan a un filtro de membrana. Una tira del filtro se incuba con IgG anti- $I\kappa B-\alpha$  y una IgG anti-conejo marcada con peroxidasa (pista 1). Se incuba solo un filtro duplicado con el segundo anticuerpo (pista 2). En la figura se representa un fluorograma del filtro marcado por

quimioluminiscencia, los pesos moleculares se indica en kDa. La flecha indica la posición de las distintas bandas de 38 K. Como patrones de peso molecular se emplean el Phosphorylaseb (97), la albúmina de suero bovino (BSA, 67), la ovalbúmina (45) y la carboanhidrasa (30). B: Efecto de un tratamiento de las células con PMA en la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Se tratan las células con PMA (pistas 2-9) durante el período de tiempo (en min) que se indica en la figura. El valor en blanco (pista 1) tiene su origen en células no tratadas. Después del tratamiento se someten los extractos celulares, tal como se indicado, a una SDS-PAGE y se estudia su contenido de I $\kappa$ B- $\alpha$  empleando una IgG anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  mediante un Western Blot. La flecha indica la posición de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . En la figura se representa una sección de un fluorograma. C: Efecto de un tratamiento de las células con PMA en la actividad de fijación de DNA del NF- $\kappa$ B. Se incuban partes alícuotas de extractos de células de control (pista 1) y células tratadas con PMA (pistas 2-6; la duración del tratamiento se indica arriba, en min; los números debajo de la figura indican la pista), del modo ya indicado, con una sonda de DNA marcada con P<sup>32</sup>, que contiene el motivo de fijación al NF- $\kappa$ B del amplificador del gen de ratón para la cadena ligera  $\kappa$  de la inmunoglobulina (“mouse  $\kappa$  light chain enhancer”; Sen y Baltimore, 1986); a continuación se realiza un análisis de la actividad de fijación de DNA mediante electroforesis a través de gel. En la figura se representa un fluorograma de un gel nativo. La punta de flecha negra indica la posición del complejo NF- $\kappa$ B-DNA, la punta de flecha blanca indica la posición de la sonda de DNA no complejada.

## Ejemplo 2

### *Acción de la IL-1 $\beta$ , LPS y TNF- $\alpha$ sobre la activación del NF- $\kappa$ B y la estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$*

Los métodos aplicados en este ejemplo, el cultivo de las células 70Z/3 y la preparación de extractos celulares se llevan a cabo del modo indicado en el ejemplo 1. Se tratan las células 70Z/3 con 50 E/ml de IL-1 $\beta$  (Boehringer Mannheim) o con 15  $\mu$ g/ml de LPS (Sigma). Se cultivan las células HeLa humanas, completadas con un 10% de FCS y un 1% de L-glutamina, y se tratan con 200 E/ml de TNF- $\alpha$  humano recombinante (Genzyme).

En la figura 2 se representa el tratamiento de las células 70Z/3 en el recuadro superior y en el central, tratadas con IL-1 $\beta$  (pistas 2-4) y LPS (pistas 6-8) durante un período de tiempo diferente que se indica en cada caso (en min), a continuación se estudia la actividad de fijación al DNA del NF- $\kappa$ B del extracto celular total y se estudia la inmunorreactividad de la I $\kappa$ B- $\alpha$  aplicando un ensayo EMSA o Western Blot. En el recuadro inferior se representan los resultados del tratamiento de las células HeLa con TNF- $\alpha$  (pistas 10-13). En la figura se representan secciones del Western Blot y secciones de fluorogramas de geles nativos. La posición del complejo DNA-NF- $\kappa$ B en los ensayos EMSA se indica con la punta de una flecha negra. La posición de la banda de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en ensayos Western Blot se indica con una flecha.

## Ejemplo 3

### *Acción de un inhibidor de síntesis de proteínas en la estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$ y en la activación del NF- $\kappa$ B en células 70Z/3*

Se tratan las células 70Z/3 con 25  $\mu$ g/ml de cicloheximida (Sigma) (véase von Wall y col., 1986; se ha constatado que basta con una concentración de 10  $\mu$ g/ml para inhibir en un 90% la síntesis de proteína en las células 70Z/3). Se realizan el cultivo celular, la preparación de extracto y la SDS-PAGE y el Western Blot del modo descrito en el ejemplo 1. El análisis densitométrico se realiza en un aparato Scanmaster 3 de Howtek; los datos se evalúa empleando el programa informático Software Quantity One Version 2.2.

El resultado de los ensayos efectuados se recoge en la figura 3. A: efecto de la cicloheximida en la fijación al DNA del NF- $\kappa$ B y concentración celular de la I $\kappa$ B- $\alpha$ . Las células se tratan previamente con cicloheximida durante una hora, después tiene lugar una estimulación con PMA durante el tiempo indicado (en min). En el recuadro superior se representa el estudio de la actividad de fijación al DNA del NF- $\kappa$ B de los extractos celulares mediante ensayo EMSA, se representa una sección de un fluorograma de un gel nativo; la punta de la flecha negra indica la posición del complejo de DNA-NF- $\kappa$ B. En el recuadro inferior se representa el estudio de la I $\kappa$ B- $\alpha$  de partes alícuotas de extractos celulares mediante ensayos Western Blot; se indica la posición de la banda de I $\kappa$ B- $\alpha$  de 38 K mediante una flecha. B: estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$  en ausencia y en presencia de PMA. En el recuadro izquierdo se representa el tratamiento de células con cicloheximida sola; en el recuadro derecho se representa el tratamiento de las células con PMA (la duración del tratamiento se indica en la figura) después de un tratamiento previo de una hora con cicloheximida. (Los extractos celulares totales de alta concentración de sal se preparan a partir de partes alícuotas de cultivo celular y se someten a la SDS-PAGE cantidades iguales de proteínas. La concentración de la I $\kappa$ B- $\alpha$  se determina mediante ensayo Western Blot y cuantificación densitométrica de la banda de 38 K de los fluorogramas). En el recuadro izquierdo se representa la I $\kappa$ B- $\alpha$  detectada (en %) al comienzo del tratamiento con cicloheximida, el derecho al comienzo del tratamiento con PMA.

## Ejemplo 4

### *Acción de inhibidores de proteasa en la activación del NF- $\kappa$ B y en la estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$ en células 70Z/3*

Se realizan el cultivo celular, la preparación de extracto, la SDS-PAGE y el Western Blot del modo descrito en el ejemplo 1. Se tratan previamente las células junto con TPCK o TLCK 25  $\mu$ M (ambas de Sigma), disueltas en sulfóxido de dimetilo (DMSO). Los cultivos de control reciben una cantidad equivalente de DMSO.

## ES 2 268 685 T3

El resultado de los ensayos realizados se representa en la figura 4. A: acción de la TPCK sobre la inducción causada por el PMA. Se tratan las células en ausencia (recuadro izquierdo) o en presencia de la TPCK con PMA después de los períodos de tiempo indicados. Se estudia la actividad de fijación al DNA del NF- $\kappa$ B de los extractos celulares mediante ensayo EMSA (recuadro superior) y se estudia la cantidad de proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  mediante Western Blot (recuadro inferior). La posición del complejo NF- $\kappa$ B-DNA en una sección de un fluorograma de gel nativo se indica con la punta de una flecha negra. Una flecha indica la posición de la banda de I $\kappa$ B- $\alpha$  del 38 K en el Western Blot. La débil banda inferior no es específica; su cantidad se reduce en gran manera después de la purificación del anticuerpo por afinidad. B: acción de la TPCK sobre la activación del NF- $\kappa$ B causada por la IL-1 $\beta$  (I), LPS (L) y PMA (P) en células 70Z/3; y en células de control (Co). Se tratan las células con la TPCK durante 10 min antes de la estimulación (pistas 6-8) o durante 10 min más después de la estimulación (pistas 10-12; 30 min con IL-1 $\beta$  y PMA o 60 min con LPS). Se estudian mediante ensayos EMSA la actividad de fijación al DNA del NF- $\kappa$ B de los extractos celulares totales de las células de control (pistas 1-4) y de células tratadas con la TPCK (pistas 5-12); se representa una sección de un fluorograma de un gel nativo. La punta de flecha negra indica la posición del complejo DNA-NF- $\kappa$ B. C: acción de la TLCK en la activación del NF- $\kappa$ B causada por el PMA. Se dejan las células 70Z/3 sin tratar (pista 1) o se tratan durante 10 min con TPCK 25  $\mu$ M (pista 2) o con TLCK 25  $\mu$ M (pista 3), a continuación se realiza la adición del PMA. Se estudia la actividad de fijación al DNA del NF- $\kappa$ B de los extractos celulares totales mediante ensayos EMSA. EN la figura se representa una sección del fluorograma; la posición del complejo DNA-NF- $\kappa$ B se marca de nuevo con la punta de una flecha negra.

### Ejemplo 5

#### *Acción de la PDTC sobre la activación del NF- $\kappa$ B y la estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$ en células 70Z/3*

Se realizan el cultivo celular, la preparación de extracto, el ensayo EMSA, la SDS-PAGE y el Western Blot del modo descrito en los ejemplos anteriores. Se efectúa el tratamiento de los cultivos celulares con 100  $\mu$ M de la sal de amonio de la PDTC del modo descrito por Schreck y col., 1992.

Los resultados de los ensayos realizados se representan en la figura 5. Se tratan las células durante los períodos de tiempo indicados (en min) con PMA sin incubación (recuadro superior izquierdo) o con una incubación previa de una hora en presencia de la PDTC (recuadros de la derecha). Con un ensayo EMSA se estudia la actividad de fijación al DNA del NF- $\kappa$ B (recuadro superior) de extractos celulares totales y mediante ensayos Western Blot se estudia el contenido de proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  (recuadro inferior); al igual que en las figuras anteriores se representan secciones de fluorogramas de geles nativos y se indica la posición del complejo DNA-NF- $\kappa$ B con puntas de flecha negras. Se representa una sección de un Western Blot, en el que se marca la posición de la banda de la I $\kappa$ B- $\alpha$  de 38 K mediante una flecha.

### Ejemplo 6

#### *Efecto del inhibidor de proteasa TPCK sobre la activación de un gen informante causada por el NF- $\kappa$ B en células HeLa*

Se realiza el cultivo celular del modo indicado en el ejemplo 1. Se transfectan las células por el método del fosfato cálcico (Wigler y col., 1978). Se transfectan 10<sup>5</sup> células por hoyo con 1,5  $\mu$ g de plásmido de control o con 1,5  $\mu$ g de pUC-TK-Luc o con 1,5  $\mu$ g de pUC- $\kappa$ B-TK-Luc. Como plásmido de control se emplea el plásmido pUC19 (ATCC n° 37254, New England Biolabs). El plásmido pUC-TK-Luc contiene la secuencia que codifica a la luciferasa (De Wet y col., 1987) bajo el control de la región de -105 a +52 del promotor timidina-quinasa de herpes simple. El plásmido pUC- $\kappa$ B-TK-Luc contiene antes de la región del promotor TK tres fragmentos de HIV-LTR, cada uno de ellos con 28 pares de bases, que contiene en cada caso dos puntos de fijación del  $\kappa$ B (Nabel y col., 1988). Se tratan las células con la TPCK (Sigma) 20 min antes de la estimulación. La lisis de las células y el ensayo de la luciferasa se realiza con arreglo a Brasier y col., 1989. Los resultados se representan en forma de unidades luminosas relativas (RLE).

En la figura 6 se representan los resultados de los ensayos realizados. Las partidas n° 1, 2 y 3 representan la expresión básica de la luciferasa en células no estimuladas. Las partidas 4, 5 y 6 representan la expresión de luciferasa después de la estimulación de las células con 200 U/ml de TNF- $\alpha$  humano durante 3 h. Las partidas n° 7, 8 y 9 representan la acción de la TPCK 25  $\mu$ M (en DMSO) sobre la expresión de la luciferasa después de la estimulación con TNF- $\alpha$ . En la partida 10 se representa la acción "in vitro" de la TPCK sobre la actividad de la luciferasa. Para ello se trata el extracto celular de la partida 9 con la TPCK 250  $\mu$ M (compárese la partida 9 con la 10).

### Ejemplo 7

#### *Acción de los inhibidores de proteasa Z-Ile-Glu(Ot-Bu)-Ala-Leucinal (NBIG) y Z-Leu-Leucinal sobre la activación del NF- $\kappa$ B y la estabilidad de la I $\kappa$ B- $\alpha$ en células HeLa*

El ensayo se lleva a cabo en este ejemplo de modo similar al descrito en el ejemplo 4; se cultivan las células HeLa del modo indicado en el ejemplo 2; como inductor de la activación del NF- $\kappa$ B se utiliza el TNF- $\alpha$ . Como inhibidores de proteasa se emplean el Z-Ile-Glu(Ot-Bu)-Ala-Leucinal (NBIG) y la sustancia químicamente afín Z-Leu-Leucinal (Cbz-L-L) (Z significa benciloxicarbonilo).

## ES 2 268 685 T3

a) Los ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética se llevan a cabo empleando un oligonucleótido marcado con P<sup>32</sup> con una posición de fijación para el NF-κB en extractos celulares totales de células HeLa. En la figura 7A se representa la inhibición de la activación del NF-κB después de la estimulación con el TNF-α: comparando los puntos temporales de los 5 y de los 10 minutos se pone claramente de manifiesto que, después de la estimulación con el TNF-α en presencia de NBIG 60 μM, se forman una cantidad mucho menor de complejo NF-κB-DNA que en las células de control (compárense las pistas 3 y 4 con las pistas 8 y 9; “n.s.” significa “no específico” en las figura 7 y 8). Con el Cbz-L-L no surge este efecto (pistas de 11 a 15). El valor ID<sub>50</sub> del NBIG se sitúa en 50 μM (figura 7B).

b) El análisis Western Blot pone de manifiesto que el TNF-α induce la degradación proteolítica de la IκB-α (figura 8, pistas de 3 a 5). En presencia del NBIG 60 μM, esta degradación disminuye en gran manera (figura 8, compárense las pistas 4 y 9, valor de 10 minutos). La inhibición de la activación del NF-κB después de la estimulación con TNF-α va, pues, acompañada de una inhibición de la degradación de la IκB-α (figura 8A). A diferencia del inhibidor de proteasa TPCK (ver ejemplo 4), el NBIG presenta la peculiaridad de producir la acumulación una forma modificada de la IκB-α, de avance más lento en el gel SDS, cuando la concentración de NBIG es de 60 μM (figura 8A, compárense las pistas 4 y 9). El inhibidor Cbz-L-L (50 μM) no tiene estos efectos (figura 8B). En la figura se marca con un asterisco la forma de migración más lenta de la IκB-α.

La incubación de las fracciones celulares con fosfatasa ácida de patatas tiene como efecto que la forma de migración más lenta de la IκB-α se convierta en la forma de migración más rápida. Este resultado indica que la forma de migración más lenta de la IκB-α, que se acumula después de la estimulación con TNF-α con intervención del NBIG, es una forma fosforilada de la IκB-α.

En otro ensayo se utiliza el NBIG junto con el inhibidor de fosfatasa, el ácido de Okada (100 nM). La presencia del ácido de Okada produce la desaparición total de la forma no fosforilada y de migración más rápida de la IκB-α.

La fosforilación de la IκB-α no se induce con el tratamiento con el NBIG (figura 9, pistas de 8 a 14), ni en una concentración de 125 μM (pista 14). La forma fosforilada de la IκB-α solo se forma, pues, cuando las células se inducen con el TNF-α (figura 9, pistas de 2 a 7); la cantidad de IκB-α modificada aumenta con la concentración del NBIG. La observación, de que la aparición y la estabilización de la forma fosforilada de la IκB-α no guarda relación temporal con la activación del NF-κB (compárense las pistas de 6 a 9 de la figura 8A con las pistas de 6 a 9 de la figura 7A), confirma la hipótesis de que en las células intactas la fosforilación de la IκB-α no es suficiente para la activación del NF-κB.

### Ejemplo 8

*Inhibición de la expresión de las citoquinas IL-6 e IL-8, reguladas por el NF-κB, en células HeLa por acción del inhibidor de proteasa NBIG*

El ensayo se realiza de modo similar al descrito en los ejemplos anteriores.

Se estimulan las células con el TNF (200 E/ml) o con PMA (50 ng/ml) - con o sin 30 min de tratamiento previo con 100 μmoles de NBIG y se mide la concentración de la IL-6 o al IL-8 en los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares con ELISA (British Biotechnology Products Ltd.) en diversos momentos temporales. En la tabla se recogen los valores de expresión. Los valores obtenidos indican que, después de una estimulación de 120 min en presencia del inhibidor de proteasa, se inhibe la producción de la IL-6 en un 79% o en un 73% (estimulación con TNF) y se inhibe la producción de la IL-8 en un 90% o en un 98% (estimulación con PMA).

TABLA

	IL-6 (pg/ml)			IL-8 (pg/ml)		
	0'	15'	120'	0'	15'	120'
TNF	-	875	6750	-	-	52
TNF+NBIG	-	875	1438	-	-	5
PMA	-	750	12813	-	-	410
PMA+NBIG	-	1125	3438	-	-	10

## Bibliografía técnica

- Baeuerle, P.A. y Baltimore, D.**, 1988a, *Cell* 53, 211-217.
- 5 **Baeuerle, P.A. y Baltimore, D.**, 1988b, *Science* 242, 540-546.
- Baeuerle, P.A.**, 1991, *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 63-80.
- 10 **Baeuerle, P.A. y Baltimore, D.**, 1991, In: Molecular Aspects of Cellular Regulation Vol. 6, Hormonal Control Regulation of Gene Transcription, Cohen, P. y Foulkes, J.G. (eds.), *Elsevier/North Holland Biomedical Press*, Amsterdam, pp. 409-432.
- Blank, V., Kourilsky, P. y Israel, A.**, 1992, *Trends Biochem. Sci.* 17, 135-140.
- 15 **Bomsztyk, K. et al.**, 1991, *Gen. Regul.* 2, 329-337.
- Brasier, A.R., Tate, J.E. y Hebener, J.F.**, 1989, *BioTechniques* 7, 1116-1122.
- De Wet, J.R., Wood, K., DeLuea, M., Helsinki, D. y Subramani, S.**, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737.
- 20 **Gosh, S. y Baltimore, D.**, 1990, *Nature* 344, 678-682.
- Grimm, S. y Baeuerle, P.A.**, 1993, *Biochem. J.* 290, 297-308.
- 25 **Gritz L. y Davies, J.**, 1983, *Gene* 25, 179-188.
- Hartmann, A.**, 1991, *BioTec* 5, 40-45.
- Haskill et al.**, 1991, *Cell* 65, 1281-1289.
- 30 **Henkel et al.**, 1992, *Cell* 68, 1121-1133.
- Hochstrasser, M. y Varshavsky, A.**, 1990, *Cell* 61, 697-708.
- 35 **Kerr et al.**, 1991, *Genes Dev.* 5, 1464-1476.
- Kricka, L.J.**, 1988, *Analyt. Biochem.* 175, 14-21.
- Laemmli, U.K.**, 1970, *Nature* 227, 680-685.
- 40 **Meichle, A., Schütze, S., Hensel, G., Brunsing, D. y Krönke, M.**, 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 8339-8347.
- Mulligan, R. y Berg, P.**, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2072-2076.
- 45 **Nabel et al.**, 1988, *Science* 239, 1299-1301.
- Nolen, G.P. y Baltimore, D.**, 1992, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 211-220.
- Orlowski, M.**, 1990, *Biochemistry* 29, 10289-10297.
- 50 Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980, Mack Publ. Co., Easton, PA, Osol (ed.).
- Rivett, A.J.**, 1989, *Arch. Biochem. Biophys.* 268, 1-8. **Schreck, R., Rieber, P. y Baeuerle, P.A.**, 1991, *EMBO J.* 10, 2247-2258.
- 55 **Schreck, R., Albemann, K. y Baeuerle, P.A.**, 1992a, *Free Rad. Res. Comms.* 17, 221-237.
- Schreck, R., Meier, B., Männel, D., Droge, W. y Baeuerle, P.A.**, 1992b, *J. Exp. Med.* 175, 1181-1194. **Shirakawa, F. y Mizel, S.**, 1989, *Mol. Cell Biol.* 9, 2424-2430.
- 60 **Sen, R. y Baltimore, D.**, 1986, *Cell* 47, 921-928.
- Southern, P. y Berg, P.**, 1982, *J. Mol. Appl. Gen.* 1, 327.
- 65 **Subramani, S. y DeLuca, M.**, 1987, Genetic Engineering, Principles and Methods, J.K. Sedlow ed., *Plenum Press*, New York, Band 10, 75-89.
- Tanahashi, H., Ito, T., Inouye, S., Tsuji, F.I. y Sakaki, Y.**, 1990, *Gene* 96, 249-255.

## ES 2 268 685 T3

**Wall, R. et al.** 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 295-298.

**Wieland, E. et al.**, 1985, *Ärztl. Lab.* 31, 203-214.

5 **Wigler et al.**, 1978, *Cell* 14, 725-731.

**Zabel, U., Henkel. T., dos Santos Silva, M. y Baeuerle, P.A.**. 1993, *EMBO J.* 12, 201-211.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la identificación de sustancias que inhiben la activación del NF- $\kappa$ B, **caracterizado** porque se estudia la capacidad de las sustancias de ensayo para inhibir específicamente la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ , para ello se trata un sustrato que contiene la I $\kappa$ B- $\alpha$  en presencia de una sustancia de ensayo con una preparación que posee actividad proteolítica sobre la I $\kappa$ B- $\alpha$  y se determina si y en qué medida la sustancia de ensayo inhibe la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$ .

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque a continuación o en paralelo en presencia de la sustancia de ensayo se induce la activación del NF- $\kappa$ B en células eucariotas superiores, en especial humanas, transformadas con un constructo de gen informante que reaccione a la activación del NF- $\kappa$ B y se mide la expresión del gen informante.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se utiliza un sistema sin células.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque como sustrato que contiene la I $\kappa$ B- $\alpha$  se utiliza una I $\kappa$ B- $\alpha$  recombinante fijada sobre un sustrato sólido.

20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque como sustrato que contiene la I $\kappa$ B- $\alpha$  se emplea una I $\kappa$ B- $\alpha$  recombinante en solución.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque como sustrato que contiene la I $\kappa$ B- $\alpha$  se emplea una I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilada.

25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque se utiliza una I $\kappa$ B- $\alpha$  fosforilada que se obtiene por tratamiento de células con una sustancia que induce la activación del NF- $\kappa$ B y con una sustancia que inhibe la degradación proteolítica de la I $\kappa$ B- $\alpha$  y produce la acumulación de la forma fosforilada de la I $\kappa$ B- $\alpha$ .

30 8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como preparación que posee actividad proteolítica sobre la I $\kappa$ B- $\alpha$  se emplea un extracto de células que se han tratado con un inductor de la activación del NF- $\kappa$ B o con una fracción de dicho extracto.

35 9. Procedimiento según la reivindicación 2 y 4, **caracterizado** porque en un sistema sin células se emplea como sustrato una I $\kappa$ B- $\alpha$  recombinante y se tratan con la sustancia de ensayo las células humanas, transformadas con un constructo de gen informante que reaccionan a la activación del NF- $\kappa$ B, estimuladas con un inductor para la activación del NF- $\kappa$ B y se mide la expresión del gen informante.

40 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el gen informante es un gen de luciferasa.

11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, **caracterizado** porque el constructo de gen informante contiene por lo menos dos motivos  $\kappa$ B.

Fig. 1

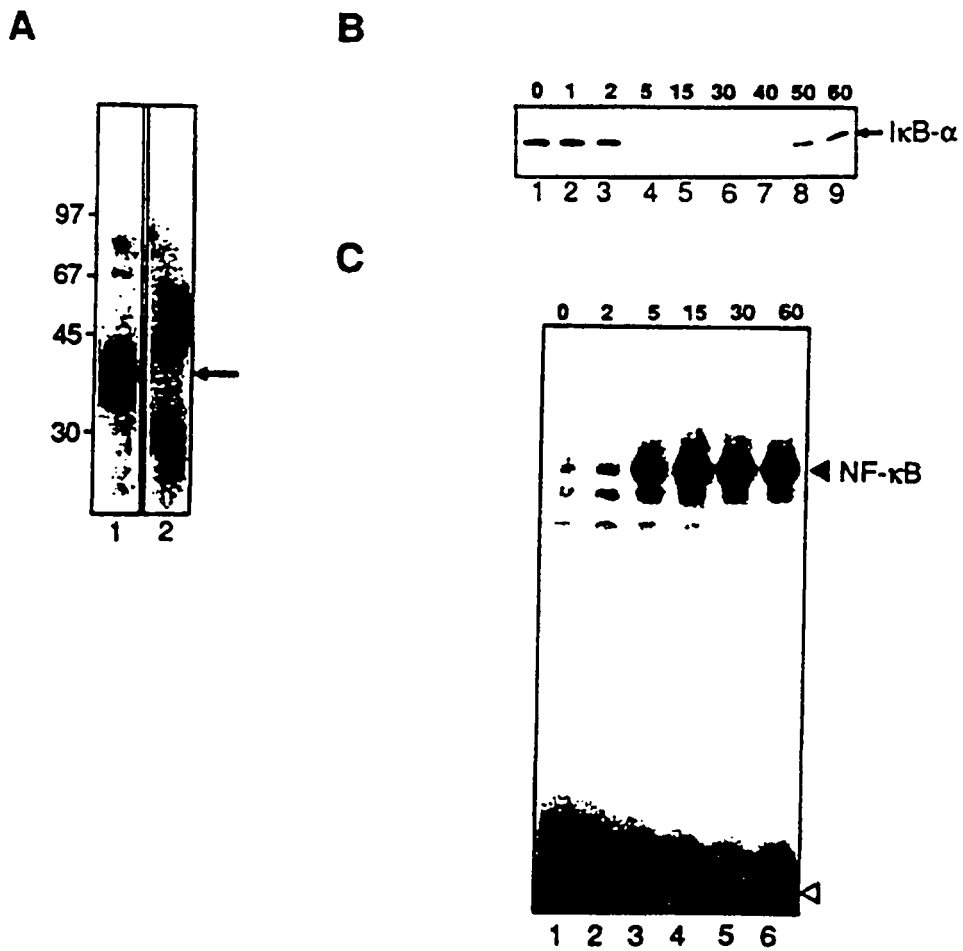


Fig. 2

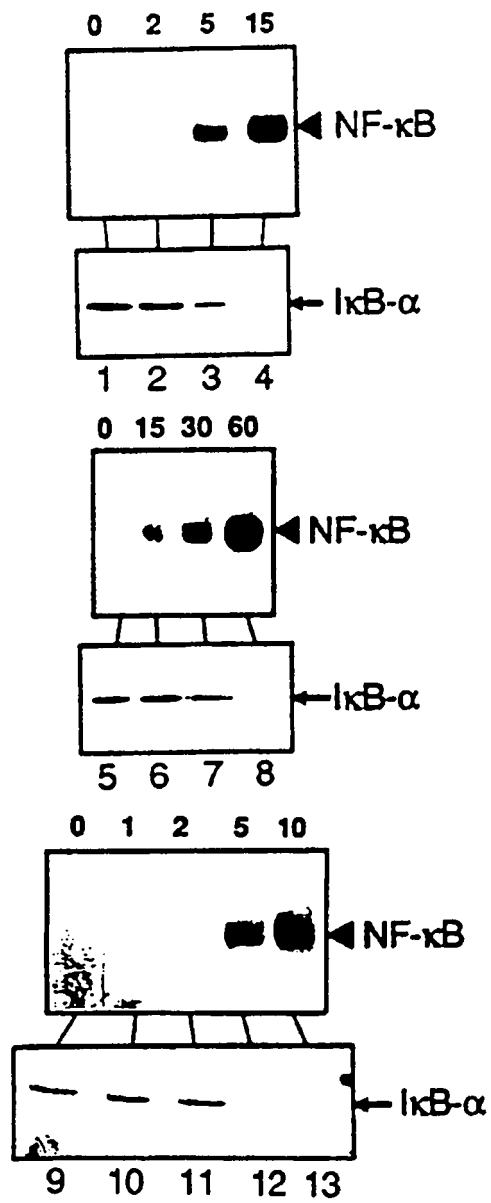
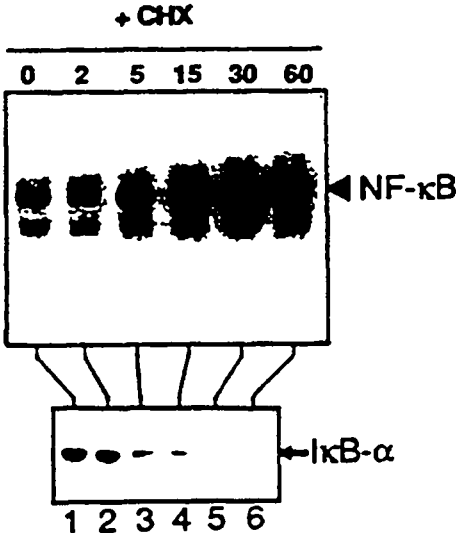


Fig. 3

**A**



**B**

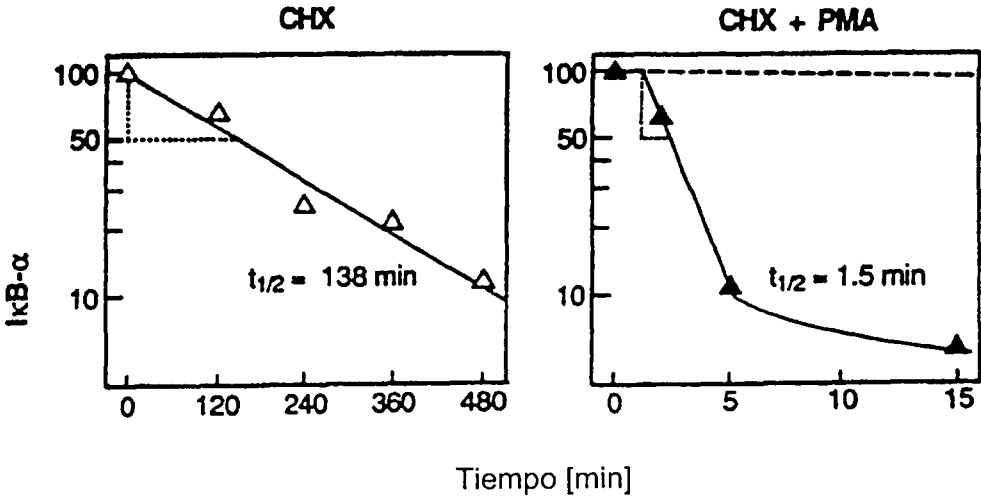


Fig. 4

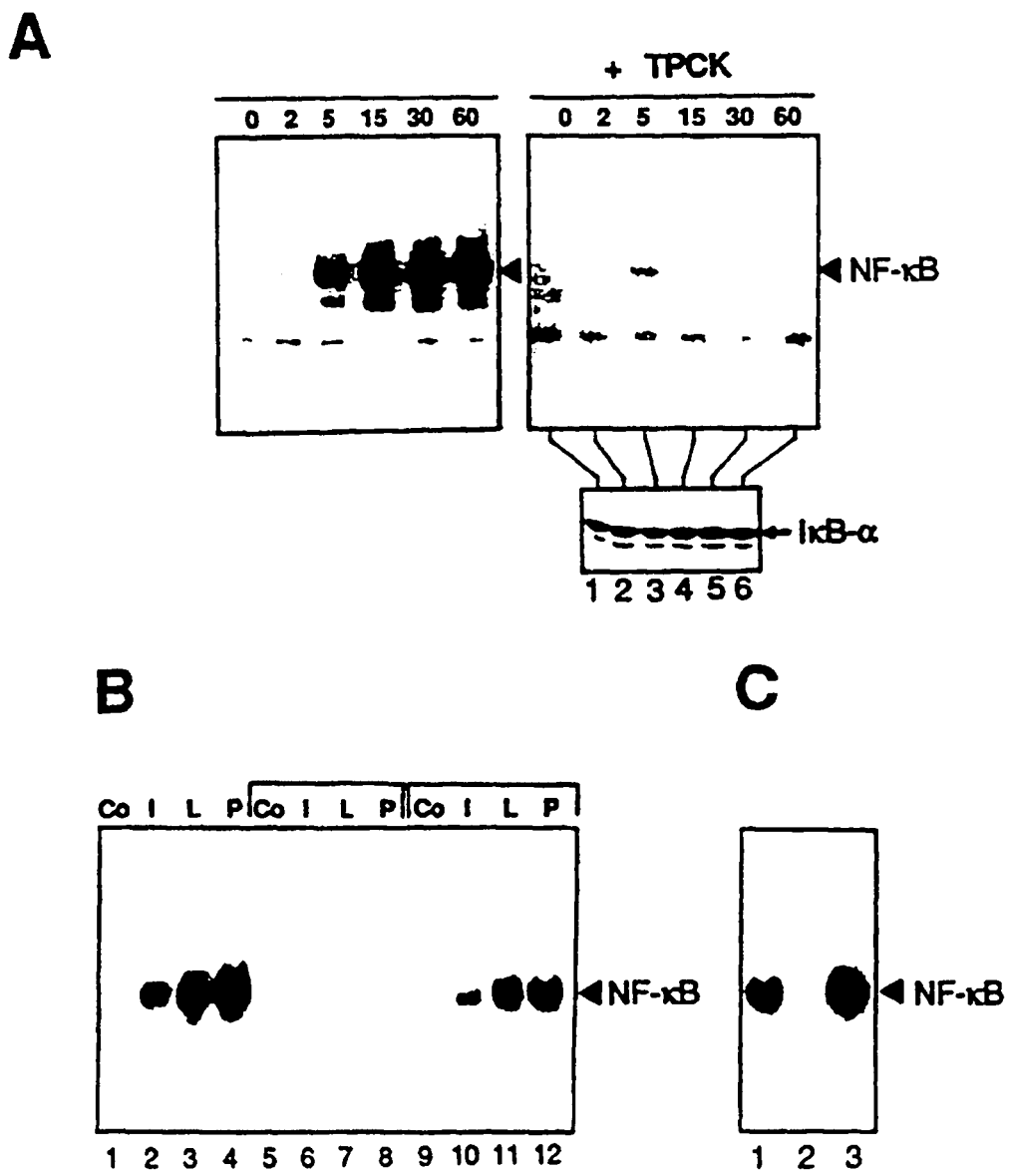


Fig. 5

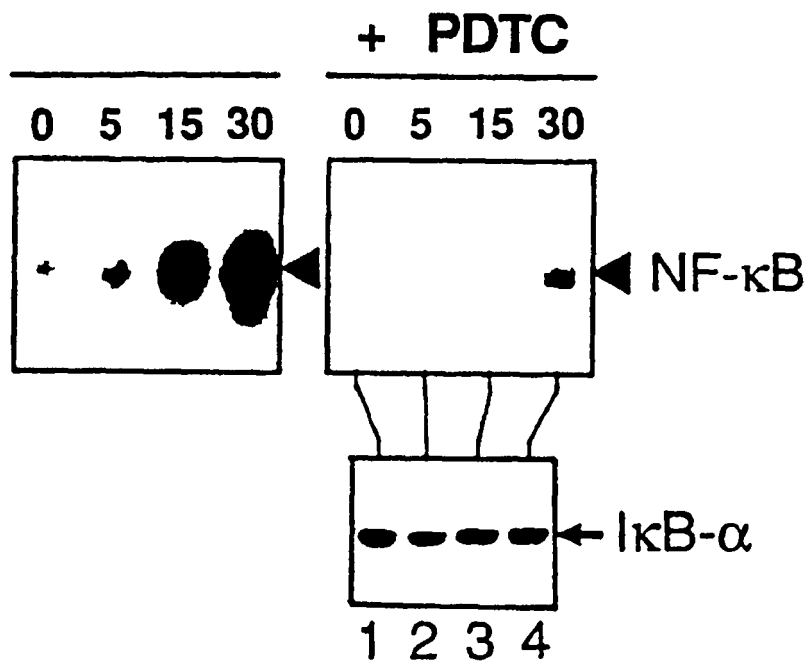


Fig. 6

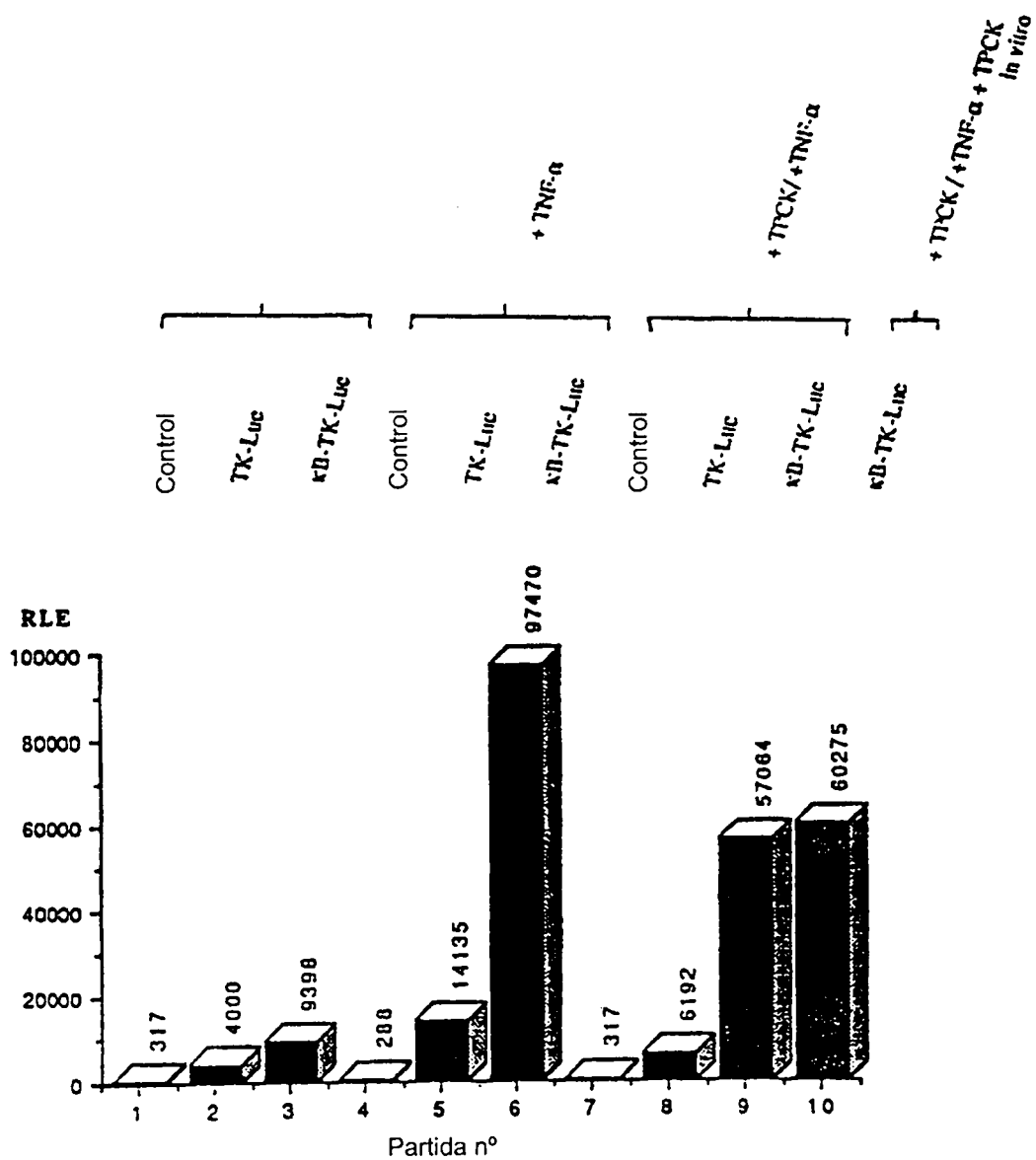




Fig. 8

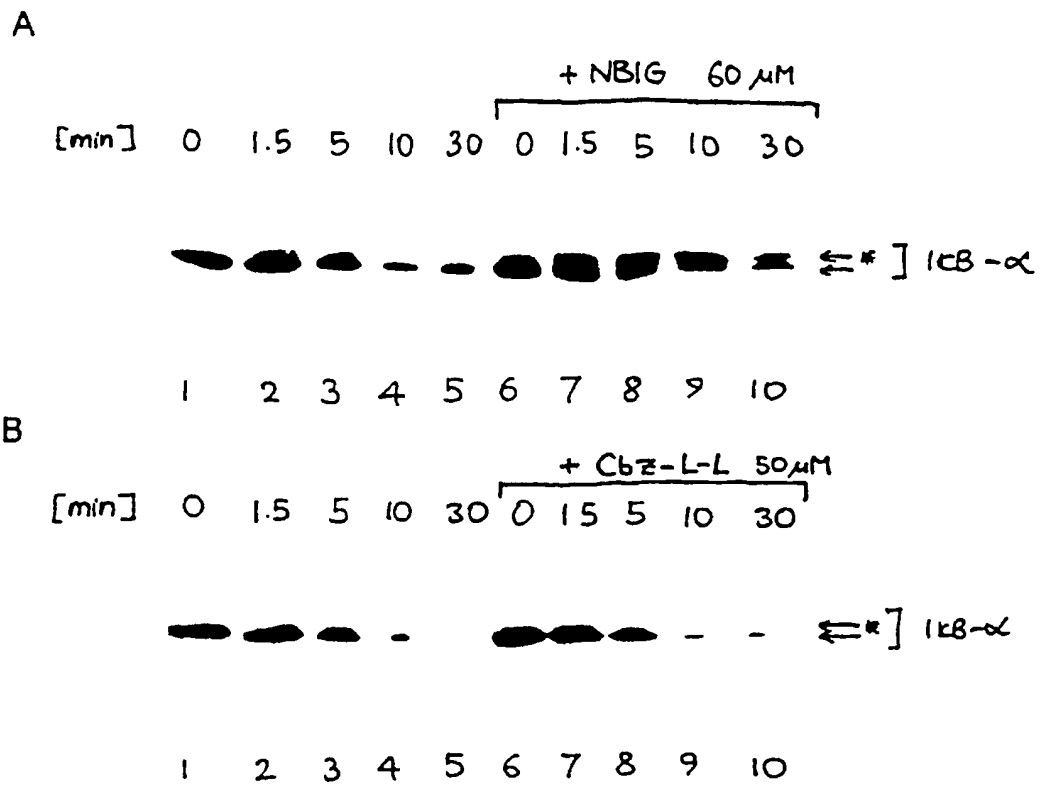


Fig. 9

