



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 798**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05755214 .3**

96 Fecha de presentación : **26.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1766047**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Ensayo de actividad de la prolil hidroxilasa de HIF.**

30 Prioridad: **28.05.2004 US 575324 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.02.2010**

73 Titular/es: **Fibrogen, Inc.**  
**409 Illinois Street**  
**San Francisco, California 94158, US**

72 Inventor/es: **Brenner, Mitchell, C.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 798 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

Ensayo de actividad de la prolil hidroxilasa de HIF.

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para medir la actividad EGLN, y el uso de los procedimientos para identificar agentes que modulan la actividad EGLN.

10 **Antecedentes**

Las enzimas 2-oxoglutarato dioxigenasa son responsables de diversos procesos fisiológicos asociados con el mantenimiento celular normal y la respuesta celular los cambios en el entorno y al estrés. Las 2-oxoglutarato dioxigenasas son oxigenasas no dependientes de hemo-Fe(U) que modifican, por ejemplo, mediante hidroxilación, diversos sustratos. Además del hierro, las 2-oxoglutarato dioxigenasas requieren oxígeno, 2-oxoglutarato, y ácido ascórbico para su actividad. Algunos de los miembros de la familia mejor estudiados incluyen las enzimas lisina hidroxilasa que modifican el colágeno (EC 1.14.11.4), la prolil 3-hidroxilasa (EC 1.14.11.7) y la subunidad  $\alpha$  de la prolil 4-hidroxilasa (P4H; EC 1.14.11.2). (Véanse, por ejemplo, Majamaa y col. (1985) *Biochem J* 229:127-133; Myllyharju y Kivirikko (1997) *EMBO J* 16:1173-1180.).

Todas las enzimas 2-oxoglutarato dioxigenasa utilizan un mecanismo catalítico común que implica la coordinación del 2-oxoglutarato y el dióxigeno con el hierro unido a la enzima. El oxígeno se escinde posteriormente, y un átomo de oxígeno se transfiere al 2-oxoglutarato para producir dióxido de carbono y succinato. El restante átomo de oxígeno unido al Fe modifica a continuación un segundo sustrato; en el caso de P4H, un resto de prolina que reside dentro de una secuencia particular de aminoácidos del marco de colágeno se oxida a hidroxiprolina. De esta manera, las enzimas de esta familia requieren hierro, usan 2-oxoglutarato y dióxigeno como sustratos, y producen succinato y dióxido de carbono como productos. El sustrato adicional utilizado por cada enzima difiere entre los miembros de la familia, y distingue por tanto los diversos miembros de la familia y proporciona un contexto único para cada reacción catalizada. Las enzimas requieren también ácido ascórbico como cofactor para evitar la inactivación de la enzima.

Egl-9 es el miembro fundador de un grupo nuevamente descrito de 2-oxoglutarato dioxigenasas (Aravind y Koonin (2001) *Genome Biol* 2: RESEARCH0007; Taylor (Taylor (2001) *Gene* 275: 125-132.). Egl-9, originalmente identificado como un producto génico necesario para la puesta de huevos en *Caenorhabditis elegans*, se encontró también que era necesario para la parálisis muscular inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en el nematodo. Adicionalmente, se identificó un homólogo de rata, SM-20, expresado en tejidos y células derivadas de músculo (liso, esquelético, y cardíaco) y nervio. (Darby y col. (1999) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 96: 15202-15207; véanse también, Wax y col. (1994) *J Biol Chem* 269(17): 13041-13047; Wax y col. (1996) *Lab Invest* 74(4): 797-808.). De manera interesante, se han identificado también homólogos de Egl-9 en bacterias, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*, así como en *Drosophila*, sugiriendo la conservación evolucionaria del grupo de enzimas Egl-9 (Véase, por ejemplo, Aravind y Koonin, véase más arriba). Se ha expandido adicionalmente la familia Egl-9 para incluir los homólogos humanos y de ratón, identificados como EGLN1, EGLN2, y EGLN3. (Taylor, *más arriba*.).

Aunque no se conocía el sustrato de la familia EGLN, estas enzimas se asociaron con la regulación de la supervivencia y el crecimiento celular en respuesta a diversos factores. (Véanse, por ejemplo, Lipscomb y col. (1999) *J Neurochem* 73: 429-432; Moschella y col. (1999) *Gene Expr* 8: 59-66; y Lipscomb y col. (2001) *J Biol Chem* 276: 5085-5092.). El reconocimiento del sustrato de EGLN como la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia (HIF $\alpha$ ) ha implicado a esta familia de enzimas en la respuesta celular respecto del oxígeno. (Epstein y col. (2001) *Cell* 107: 43-54; Bruick y McKnight (2001) *Science* 294: 1337-1340.). HIF, un factor de transcripción que activa la transcripción génica en condiciones de oxígeno bajo, es un heterodímero compuesto por una subunidad beta única (HIF $\beta$ /ARNT) y una familia de subunidades HIF $\alpha$ . Todas las células parecen expresar HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  constitutivamente; sin embargo, en condiciones normóxicas, la subunidad HIF $\alpha$  está hidroxilada por EGLN y se degrada posteriormente mediante el sistema de la ubiquitina ligasa. En condiciones de oxígeno bajo, la subunidad HIF $\alpha$  es estable y capaz de acumularse en el interior de la células, en la que dimeriza con HIF $\beta$ , se transloca en el núcleo, e inicia la transcripción génica. Los genes específicos transcritos por el factor de transcripción de HIF proporcionan respuestas compensatorias locales y sistémicas que facilitan la supervivencia celular y la recuperación metabólica durante los episodios hipóxicos.

Diversas publicaciones informan de la investigación del marco del péptido en el interior del sustrato de HIF $\alpha$  que es esencial para la sensibilidad del oxígeno. Las investigaciones se centraron originalmente en la región interna de HIF $\alpha$  necesaria para la interacción con pVHL. (Véanse, por ejemplo., Huang y col. (1998) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 95: 7987-7992; Tanimoto y col. (2000) *EMBO J* 19: 4298-4309; y Poellinger y col., *Publicación Internacional N°.* WO 02/12326.). Aunque estas investigaciones identificaron un motivo básico necesario para el reconocimiento de HIF $\alpha$  por pVHL, no determinan las necesidades de la secuencia de aminoácidos para la interacción de HIF $\alpha$  con EGLN. Más recientemente, las investigaciones se centraron en la región en el interior de HIF $\alpha$  necesaria para la hidroxilación por EGLN (véanse, por ejemplo., Hirsila y col. (2003) *J Biol Chem* 278: 30772-30780; y Huang y coll. (2002) *J Biol Chem* 277: 39792-39800.). Aunque esta región solapa con la región que interactúa con pVHL, el marco específicos de los aminoácidos parece mostrar diferentes requerimientos estructurales.

Huang y col (2002) *J Biol Chem* 277(42): 39792-800 dan a conocer los determinantes de las secuencias en HIF-1 $\alpha$  para la hidroxilación mediante las prolil hidroxilasas PHD1, PHD2, y PHD3.

## ES 2 332 798 T3

El documento WO 03/049686 da a conocer un ensayo de cribado para compuestos que inhiben la actividad de la prolin hidroxilasa específica de HIF y estabilizan por tanto HIF $\alpha$ . El ensayo implica la medida de la hidroxilación de un péptido HIF, tal como [metoxi-cumarina]-DLDLEALAPYIPADDDFQL-amida.

5 Oehme y col (2004) Anal Biochem 330(1): 74-80 dan a conocer un ensayo no radioactivo en placas de 96 pocillos para la detección de la actividad de la prolin hidroxilasa del factor inducible por hipoxia.

El documento 02/074981 se refiere a un tipo de hidroxilasas y variantes y fragmentos de las mismas que tienen actividad de hidroxilación de HIF. Se dice que los polipéptidos tienen en concreto actividad prolin hidroxilasa. Un  
10 procedimiento de ensayo vigila la interacción de la hidroxilasa de HIF con un sustrato.

Sería ventajoso un procedimiento para medir la actividad de EGLN, especialmente en un formato de alto rendimiento, para el estudio de la cinética de la enzima y la selección y el diseño de los inhibidores de la enzima. Adicionalmente, la identificación de los motivos de reconocimiento del sustrato que muestren preferencia por un miembro  
15 de la familia EGLN en relación con otros miembros de la familia proporcionaría una nueva percepción en el diseño del inhibidor para dirigir a los miembros individuales de la familia. La presente invención proporciona dicho procedimiento, y define sustratos que muestran selectividad en la interacción con diversos medios de la familia EGLN. La presente invención proporciona también el uso de procedimientos para identificar agentes que modulan la actividad de una enzima EGLN.

### 20 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos para medir la actividad de una enzima EGLN. En un aspecto, la invención proporciona el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. En diversas formas de realización, el  
25 2-oxoglutarato se proporciona en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 100  $\mu$ M, por ejemplo, entre 10 y 100  $\mu$ M; y se puede suministrar en cualquier forma adecuada que incluya, por ejemplo, una sal.

En otro aspecto, la invención proporciona el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2.

En diversas formas de realización, la enzima EGLN usada en los procedimientos de la invención comprende la  
30 secuencia de la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 1, en otras formas de realización, la enzima EGLN comprende la secuencia de la SEC de N<sup>o</sup>: 3. En forma de realización particulares, la enzima EGLN comprende además la secuencia de la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 2. En diversos aspectos, la enzima EGLN se selecciona entre el grupo constituido por EGLN1, EGLN2, EGLN3, y los fragmentos activos de EGLN1, EGLN2, y EGLN3. Las enzimas de estas formas de realización y aspectos se pueden obtener de cualquier especie, o se pueden producir usando una enzima EGLN expresada a partir de un polinucleótido  
35 recombinante que codifica la enzima EGLN o un fragmento funcional de la misma.

En diversos aspectos, el péptido usado en los procedimientos de la invención tiene al menos 10 aminoácidos de longitud, más concretamente al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, e incluso más concretamente al  
40 menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En diversas formas de realización, el péptido comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62-78. En formas de realización concretas, el péptido tiene 20 aminoácidos de longitud y se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62-78. En diversos aspectos, los péptidos están compuestos por aminoácidos que incluyen ambos isómeros L y D. En otros aspectos, los péptidos están compuestos por isómeros L de aminoácidos. En algunas formas de realización, Z es  
45 prolina y es un isómero D. En otras formas de realización, Z se selecciona entre el grupo constituido por isómeros L y D de acetidina-2-carboxilato, 3,4-deshidroprolina, y b-tioprolina. En formas de realización concretas, Z se selecciona entre los isómeros L de acetidina-2-carboxilato, 3,4-deshidroprolina, y b-tioprolina.

En una forma de realización, los procedimientos de la invención comprenden combinar una enzima seleccionada entre el grupo constituido por EGLN1, un fragmento activo de EGLN1, EGLN2, y un fragmento activo de EGLN2.  
50 En diversas formas de realización de la anterior, el péptido para uso en el procedimiento comprende la secuencia X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-Z-X<sub>6</sub>, en la que X<sub>1</sub> se selecciona entre tirosina, triptófano, metionina, isoleucina, fenilalanina, aspartato, alanina, glutamato, cisteína, prolina, glicina, y leucina; X<sub>2</sub>, y X<sub>3</sub> se seleccionan independientemente entre cualquier aminoácido; X<sub>4</sub> se selecciona entre isoleucina, valina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, lisina, triptófano, cisteína, asparagina, histidina, serina, alanina, glicina, glutamato, glutamina, o leucina; X<sub>5</sub> se selecciona entre  
55 treonina, serina, lisina, glutamina, metionina, o alanina; X<sub>6</sub> se selecciona entre fenilalanina o tirosina; y Z es un análogo de prolina que no es susceptible de hidroxilación por la prolin hidroxilasa de HIF, por ejemplo, acetidina-2-carboxilato, 3,4-deshidroprolina, o b-tioprolina. En diversas formas de realización, el 2-oxoglutarato se proporciona en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 100  $\mu$ M, por ejemplo, entre 10 a 100  $\mu$ M; y se puede suministrar en cualquier forma adecuada incluyendo, por ejemplo, una sal. En formas de realización concretas, el péptido se selecciona entre el grupo  
60 constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62 y 63. En formas de realización específicas, el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62 y 63. En algunas formas de realización, se incluye un agente de ensayo en el ensayo, y se determina la capacidad del agente de ensayo para modular la actividad de la enzima.

En otra forma de realización, los procedimientos de la invención comprenden combinar una enzima seleccionada  
65 entre EGLN3 o un fragmento activo de EGLN3. En diversas formas de realización, el 2-oxoglutarato se proporciona en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 100  $\mu$ M, por ejemplo, entre 10 y 100  $\mu$ M; y se puede suministrar en cualquier forma adecuada incluyendo, por ejemplo, una sal. En formas de realización concretas, el péptido comprende

una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62, 63, 69 y 72. En formas de realización específicas, el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62, 63, 69 y 72. En algunas formas de realización, se incluye un agente de ensayo en el ensayo, y se determina la capacidad del agente de ensayo para modular la actividad de la enzima.

Los procedimientos de la invención comprenden un agente reductor. El agente reductor se puede seleccionar entre el grupo constituido por, pero sin limitarse a, ascorbato y ferrocianuro de potasio. El agente reductor se puede proporcionar en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 10 mM, por ejemplo, entre 0,5 y 5 mM; y se puede suministrar en cualquier forma adecuada que incluya, por ejemplo, una sal, por ejemplo, ascorbato de sodio, ferrocianuro de potasio, etc. Los procedimientos pueden comprender también hierro, por ejemplo, iones ferrosos proporcionados como cloruro ferroso, sulfato ferroso, etc. En diversas formas de realización, se proporcionan iones ferrosos en un intervalo de entre aproximadamente 0 a 500  $\mu$ M, por ejemplo, entre 25 y 250  $\mu$ M, y en concreto entre 50 y 200  $\mu$ M.

En algunas formas de realización, Z es acetidina-2-carboxilato. En formas de realización concretas de la anterior, el péptido comprende una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, y 78: En formas de realización específicas, el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, y 78. En otras formas de realización, Z es 3,4-deshidroprolina. En formas de realización concretas de la anterior, el péptido comprende la secuencia de la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 62. En una forma de realización específica, el péptido es la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 62. En otras formas de realización más, Z es b-tioprolina. En formas de realización concretas de la anterior, el péptido comprende la secuencia de la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 72. En una forma de realización específica, el péptido es la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 72.

En diversas formas de realización de la presente invención, la medida de la actividad de EGLN comprende medir el dióxido de carbono producido mediante la reacción de la enzima EGLN sobre el sustrato del 2-oxoglutarato, en el que la cantidad de dióxido de carbono producido es directamente proporcional a la actividad de la enzima EGLN. En otras formas de realización la medida de la actividad de EGLN comprende medir la conversión del agente reductor a su forma oxidada durante la reacción, en la que la cantidad de agente reductor que se oxida es directamente proporcional a la actividad de la enzima EGLN.

Estas y otras formas de realización de la invención sujeto se producirán fácilmente por las personas expertas en la técnica a la luz de la descripción realizada en el presente documento, y se contemplan específicamente todas las mencionadas formas de realización.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 (1A, 1B, 1C, 1D, 1E, y 1F) muestra una alineación de las subunidades HIF $\alpha$  de diversas especies. La alineación se generó usando el programa CLUSTALW (versión 1.81; Thompson y col. (1994) Nucleic Acids Res 22: 4673-4680).

La Figura 2 muestra una alineación de la región activa de diversos miembros de la familia EGLN. La alineación se generó usando el programa CLUSTALW (v.1.81; Thompson y col., véase más arriba). En la figura, PF03171 denota un motivo de la superfamilia 2-oxoglutarato Fe(II) oxigenasa identificado mediante la alineación de múltiples secuencias y el análisis del Modelo Hidden Markov (HMM) tal como se generó mediante la base de datos PFAM (versión 13,0; Bateman y col (2002) Nucleic Acids Research 30(1): 276-280); y CDD13071 denota una región de la Egl-9 prolina hidroxilada identificada mediante la alineación de múltiples secuencias tal como se generó por la Base de Datos de la Región Conservada (CDD, versión 2.00; Marchler-Bauer y col. (2003) Nucleic Acids Res 31: 383-387).

La Figura 3 muestra una representación gráfica de la actividad peptídica del sustrato en relación con el péptido control ordenado con respecto a EGLN1. La tendencia de las líneas en la figura muestra la actividad en relación con EGLN1 (línea sólida) y EGLN2 (línea punteada).

La Figura 4 muestra una representación gráfica de la actividad peptídica del sustrato en relación con un péptido control ordenado con respecto a EGLN3. La tendencia de la línea en la figura muestra la actividad en relación con EGLN3.

La Figura 5 muestra diversas modificaciones que se pueden hacer en la estructura básica del sustrato preservando a la vez la actividad enzimática. El panel en la parte superior ilustra las modificaciones en el resto de prolina (1) y los aminoácidos adicionales (2 a 10) que preservan la actividad adecuada de EGLN1 y EGLN2. El panel en la parte inferior ilustra las modificaciones en el resto de prolina (1) y los aminoácidos adicionales (2 a 10) que preservan la actividad adecuada de EGLN3. Únicamente se ilustra en la figura una porción de cada secuencia peptídica.

La Figura 6 (6A y 6B) muestra el porcentaje de renovación del 2-oxoglutarato en relación con diversas concentraciones de ferrocianuro de potasio. La Figura 6A muestra la actividad de EGLN1 en presencia de un péptido que contiene acetidina de acuerdo con la reacción modificada (II). Cada punto de datos representa el promedio de tres experimentos. La Figura 6B muestra la actividad de EGLN2 en presencia del péptido DLD19. La reacción en presencia de ascorbato 1 mM se llevó a cabo como control. Cada punto de datos representa el promedio de tres experimentos.

La Figura 7A muestra el porcentaje de renovación del 2-oxoglutarato en relación con la concentración de ferrocianuro de potasio usando dos concentraciones diferentes de EGLN1, La Figura 7B muestra la velocidad de formación

del producto de ferricianuro en relación con la concentración inicial de ferrocianuro en la reacción modificada (II). Se vigiló la formación de ferricianuro siguiendo la densidad óptica de  $\text{Fe}^{3+}$  a una longitud de onda de 405 nm. La densidad óptica de las reacciones sin enzima se sustrajo de la DO de las reacciones con enzima para corregir la formación no enzimática de producto.

5

### Descripción detallada de la invención

Antes de que se describan los presentes procedimientos, debe entenderse que la invención no se limita a los reactivos concretos descritos, ya que estos pueden variar. Debe entenderse también que se pretende que la terminología usada en el presente documento describa las formas de realización particulares de la presente invención, y no se pretende en ningún modo que limite el alcance de la presente invención tal como se muestra en las reivindicaciones adjuntas.

10

Debe señalarse, tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, que las formas singulares “un”, “uno/a”, y “el/la” incluyen las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, una referencia a “un péptido” puede incluir una pluralidad de dichos péptidos y sus equivalentes conocidos por las personas expertas en la técnica, y así sucesivamente.

15

A no ser que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que una persona normalmente experta en la técnica entiende comúnmente a la cual ésta invención pertenece. Aunque se puede usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen ahora los procedimientos, dispositivos, y materiales preferidos.

20

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, los procedimientos convencionales de la química, bioquímica, biología molecular, biología celular, genética, etc., comprendidos dentro del conocimiento de la persona experta en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía.

25

### Invención

La presente invención proporciona un procedimiento para medir la actividad de diversas enzimas EGLN que utilizan sustratos desconocidos hasta este momento, que muestran un intervalo de especificidad y variabilidad para las isoformas EGLN, y parámetros de reacción novedosos. Aunque los sustratos que se dan a conocer en el presente documento comparten algunas similitudes con el polipéptido  $\text{HIF}\alpha$ , contienen cambios sustanciales y no obvios en la estructura del sustrato y proporcionan condiciones de ensayo únicas, cinética del enzima y lecturas de salida del ensayo. Los ensayos son útiles para caracterizar más completamente la especificidad sustrato-enzima, y para rastrear e identificar los agentes que modifican la capacidad de los enzimas EGLN específicos de interactuar con sus respectivo sustratos.

30

En un aspecto, la invención proporciona el procedimiento de la reivindicación 1. Las condiciones adecuadas para la actividad de la enzima EGLN incluyen generalmente la presencia de oxígeno, y pueden incluir opcionalmente hierro añadido. En algunas formas de realización, el agente reductor es ácido ascórbico, mientras que en otras formas de realización el agente reductor es ferrocianuro de potasio. En algunos aspectos, el péptido sustrato muestra especificidad similar por las diversas enzimas EGLN. En otros aspectos, el péptido sustrato muestra mayor especificidad para una enzima EGLN en relación con los otros miembros de la familia EGLN. En formas de realización específicas, el péptido sustrato muestra mayor especificidad para EGLN1 y EGLN2 que para EGLN3. Alternativamente, en otras formas de realización específicas, el péptido sustrato muestra mayor especificidad para EGLN3 que para EGLN1 y EGLN2. En otras formas de realización más, la invención contempla péptidos sustratos que muestran mayor afinidad para, por ejemplo, EGLN1 que para EGLN2, o para EGLN2 que para EGLN1.

35

En otro aspecto, la invención proporciona el procedimiento de la reivindicación 2.

### EGLN

EGLN son las enzimas 2-oxoglutarato dioxigenasa que, entre otros sustratos potenciales, se conocen por hidroxilar restos de prolina específicos en las proteínas  $\text{HIF}\alpha$  nativas. Los restos de prolina hidroxilados por EGLN incluyen los restos de prolina que se producen en la secuencia natural de la  $\text{HIF-1}\alpha$  humana en los restos 402 ( $\text{P}_{402}$ ) y 564 ( $\text{P}_{564}$ ), y que corresponden a restos de prolina en las subunidades  $\text{HIF}\alpha$  obtenidos de otras especies tal como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1. En las formas de realización preferidas, la EGLN utilizada en el ensayo se selecciona entre los miembros de la familia de la enzima Egl-9 descrita por Taylor (*véase más arriba*), y caracterizada por Aravind y Koonin (*véase más arriba*), Epstein y col (*véase más arriba*), y Brick y McKnight (*véase más arriba*). En algunas formas de realización de la presente invención, la enzima EGLN se puede seleccionar entre una isoforma de EGLN1, EGLN2, y/o EGLN3. La isoforma de EGLN1 se puede seleccionar entre el grupo que incluye, pero no se limita a EGLN1 humana (hEGLN1, N° de Acceso del GenBank N° AAG33965; Dupuy y col. (2000) Genomics 69:348-54), EGLN1 de ratón (N° de Acceso del GenBank CAC42515); y la EGLN1 de rata (N° de Acceso del GenBank N° P59722); la isoforma de EGLN2 se puede seleccionar entre el grupo que incluye, pero no se limita a, la isoforma 1 de la EGLN2 humana (N° de Acceso del GenBank CAC42510; Taylor, *véase más arriba*), la isoforma 3 de la EGLN2 humana (N° de Acceso del GenBank NP\_542770), la EGLN2 de ratón (N° de Acceso del GenBank CAC42516), y la EGLN2 de rata (N° de Acceso del GenBank AA046039); y la isoforma de EGLN3 se puede seleccionar entre el grupo que incluye, pero no se limita a, la EGLN3 humana (N° de Acceso del GenBank CAC42511; Taylor, *véase más arriba*),

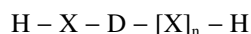
40

45

## ES 2 332 798 T3

la EGLN3 de ratón (N° de Acceso del GenBank CAC42517); y la EGLN3 de rata (SM-20) (N° de Acceso del GenBank AAA19321). En otras formas de realización de la presente invención, EGLN puede incluir EGL-9 de *Caenorhabditis elegans* (N° de Acceso del GenBank AAD56365) y el producto génico CG1114 de *Drosophila melanogaster* (N° de Acceso del GenBank AAF52050).

En otras formas de realización, la EGLN utilizada en los ensayos de la presente invención puede comprender un fragmento activo de cualquiera de los miembros de la familia de la enzima EGLN descritos anteriormente o conocidos por las personas expertas en la técnica. Un fragmento activo comprendería preferiblemente una región que contenga la secuencia



en la que X es cualquier aminoácido y n está entre aproximadamente 40 y 80, preferiblemente entre aproximadamente 50 y 65, y más preferiblemente aproximadamente 58 (Véase, por ejemplo, la Figura 2). Por ejemplo, un fragmento activo de una HIF PH utilizada en el ensayo puede comprender la secuencia consenso definida por la base de datos de la Familia de Proteínas (PFAM) con número de acceso 3171 (SEC DE ID N°: 1, la secuencia de acceso definida por la Base de Datos de la Región Conservada Entrez (CDD) con n° de acceso 21489 (SEC DE ID N°: 2), o la secuencia consenso que se muestra en la Figura 2 (SEC DE ID N°: 3). (Bateman y col. (2004) *Nucleic Acids Res* 32(1): D138-141; Marchler-Bauer y col. (2003) *Nucleic Acids Res* 31:3 83-387).

La enzima usada en la presente invención puede ser producida endógenamente por una célula, en la que la célula se obtiene originalmente a partir de una fuente natural tal como un organismo celulado único o multicelular. Por ejemplo, la enzima se puede obtener mediante digestión del organismo completo, tal como un nematodo, por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*, o insecto, por ejemplo, *Drosophila melanogaster*, digestión del órgano o tejido aislado, por ejemplo, obtenida a partir de riñón de ratón o rata, pulmón, hígado, cerebro, etc., o lisis de una población celular clonal, por ejemplo, una línea celular establecida. Alternativamente, la enzima se puede producir usando tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, el gen o el transcrito de polinucleótido que codifica la enzima se puede insertar en una célula u organismo huésped, y el huésped puede, constitutivamente o en condiciones específicas, expresar la proteína codificada por la secuencia de polinucleótidos exógena.

Independientemente de si la enzima se produce a partir de polinucleótidos endógenos o exógenos, la enzima se puede usar en el presente ensayo contenida a la vez dentro de las células huéspedes intactas o dentro de un lisado celular producido a partir de las células. Por ejemplo, una célula que produce endógenamente la enzima, tal como hepatocitos, por ejemplo, células Hep3B; células endoteliales, por ejemplo, células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC); fibroblastos, por ejemplo, fibroblastos de prepujio humano; etc., se pueden hacer crecer en cultivo hasta una densidad adecuada, y a continuación se pueden preparar lisados celulares usando la técnicas estándar conocidas por las personas expertas en la técnica. Las células se pueden seleccionar por su expresión endógena de las EGLN específicas; por ejemplo, se informó recientemente de la expresión específica de EGLN1 en condiciones normóxicas en las células endoteliales arteriales (Véase, por ejemplo, Takahashi y col. (2004) *Biochem Biophys Res Comm* 317:84-91). Alternativamente, se puede inducir la expresión de las EGLN, por ejemplo, haciendo crecer células durante un periodo de tiempo adecuado en condiciones de oxígeno bajo, es decir, hipóxicas. Las personas expertas en la técnica conocen generalmente dichas condiciones.

Opcionalmente, la enzima puede estar parcialmente purificada o concentrada mediante, por ejemplo, fraccionamiento del lisado que contiene la enzima. Alternativamente, la enzima puede estar purificada a partir de otros componentes en el lisado usando cualquier procedimiento conocido por las personas expertas en la técnica, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) o cromatografía de afinidad. La enzima, y particularmente los fragmentos activos de la enzima, se pueden sintetizar también químicamente utilizando, por ejemplo, la química FMOC llevada a cabo usando, por ejemplo, un sintetizador de péptidos 432A automatizado (Applied Biosystems, Inc., Foster City CA), u otras tecnologías conocidas por las personas expertas en la técnica.

### Péptidos

La presente solicitud da a conocer péptidos que muestran un intervalo de especificidad y variabilidad para la isoformas EGLN. Aunque esto péptidos comparten algunas similitudes con el polipéptido HIF $\alpha$ , contienen cambios sustanciales y no obvios de la estructura del sustrato y proporcionan condiciones de ensayo únicas y la cinética de la enzima.

Tal como se usa en el presente documento, el término "HIF $\alpha$ " se refiere a la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia de la proteína. HIF $\alpha$  se produce en tres formas generales, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , y HIF-3 $\alpha$ . Además, cada forma general puede existir dentro de un organismo en diferentes isoformas, por ejemplo, HIF-1 $\alpha$  incluye, pero no se limita a, la isoforma 1 de HIF-1 $\alpha$  humana (N° de Acceso del Genbank Q16665; HIF1A\_HUMANO) y la isoforma 2 (N° de Acceso del Genbank NP\_851397; HIF1v\_HUMANO), HIF-1 $\alpha$  de murino (N° de Acceso del Genbank Q61221; HIF1A\_RATÓN), HIF-1 $\alpha$  de rata (N° de Acceso del Genbank CAA70701; HIFA\_RATA), y HIF-1 $\alpha$  de vaca (N° de Acceso del Genbank BAA78675; HIF1A\_BOVINO). Similarmente, HIF-2 $\alpha$  incluye, pero no se limita a, HIF-2 $\alpha$  (N° de Acceso del Genbank AAB41495; HIF2A\_HUMANO), HIF-2 $\alpha$  de ratón (N° de Acceso del Genbank BAA20130 y AAB41496; HIF2A\_RATÓN), HIF-2 $\alpha$  de rata (N° de Acceso del Genbank CAB96612; HIF2A\_RATA) y HIF-2 $\alpha$  de bovino (N° de Acceso del Genbank BAA78676; HIF2A\_BOVINO); y HIF-3 $\alpha$  incluye, pero no se limita a

## ES 2 332 798 T3

HIF-3 $\alpha$  humano (N° de Acceso del Genbank AAD22668; HIF3A\_HUMANO), HIF-3 $\alpha$  de ratón (N° de Acceso del Genbank AAC72734), y HIF-3 $\alpha$  de rata (N° de Acceso del Genbank CAB96611M HIF3A\_RATA). Se han descrito también diversas proteínas HIF $\alpha$  no de mamíferos que incluyen, pero no se limitan a HIF-1 $\alpha$  de *Xenopus laevis* (N° de Acceso del Genbank CAB96628; HIF1A-XENLA), HIF-1 $\alpha$  de *Drosophila melanogaster* (N° de Acceso del Genbank JC4851), HIF-1 $\alpha$  de *Oncorhynchus mykiss* (N° de Acceso del Genbank Q98SW2; HIF1A\_ONCMY), y HIF-1 $\alpha$  de gallina (N° de Acceso del Genbank BAA34234; HIF1A\_CHICK).

La alineación de las subunidades HIF $\alpha$ , tal como se muestra en la Figura 1, demuestra regiones conservadas entre los diversos miembros de la familia. Las regiones conservadas se analizaron originalmente para las características funcionales compartidas por las subunidades HIF $\alpha$ , tales como su susceptibilidad a la degradación regulada por oxígeno. Los estudios de delección identificaron una región de degradación del oxígeno dentro de la porción de HIF $\alpha$  definida por los restos de aminoácidos 401 a 603 de HIF-1 $\alpha$  (Huang y col., véase más arriba). Se localizó posteriormente una región sensible al oxígeno en los aminoácidos 556 a 575 de HIF-1 $\alpha$ , más específicamente en una secuencia colineal muy conservada que corresponde a M<sub>561</sub>LAPYIPM dentro de HIF-1 $\alpha$  (556-575). (Jiang y col. (1997) J Biol Chem 272: 19253-19260; Tanimoto y col. (2000) EMBO J 19: 4298-4309; Srinivas y col. (1999) Biochem Biophys Res Commun 260: 557-561; e Ivan y col. (2001) Science 292: 464-468.). Dentro de esta secuencia, la hidroxilación del resto de prolina que se produce en el contexto del motivo LXXLAP, por ejemplo, como la que se produce en la secuencia natural de HIF-1 $\alpha$  en L<sub>397</sub>TLLAP y L<sub>559</sub>EMLAP y en las porciones correspondientes de HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ , se encontró que se requerían para la degradación normóxica de HIF-1 $\alpha$ . (Véanse Ivan y Kaelin (2001) Science 292: 464-468; Jaakkola y col. (2001) Science 292: 468-472.). Se muestran a continuación, por ejemplo, las regiones que corresponden a la región de degradación del oxígeno C terminal (C-ODD) para HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , y HIF-3 $\alpha$ .

D<sub>556</sub>LDLEMLAPYIPMD-DDFQLR                      (HIF-1 $\alpha$  C-ODD; SEC DE ID N°:4).

E<sub>522</sub>LDLETLAPYIPMDGEDFQLS                      (HIF-2 $\alpha$  C-ODD; SEQ DE ID N°:5).

A<sub>481</sub>LDLEMLAPYISMD-DDFQLN                      (HIF-3 $\alpha$  C-ODD; SEQ DE ID N°:6).

Estas secuencias representan de esta manera los sustratos endógenos para las enzimas HIF-PH. Además, los restos que se muestran en **negrita** se conservan entre las diversas isoformas de HIF $\alpha$  y pueden definir por tanto una secuencia consenso para la hidroxilación de EGLN.

La presente solicitud da a conocer la caracterización adicional de los requerimientos del sustrato de la familia de la enzima EGLN. En un aspecto, la presente solicitud da a conocer un péptido que comprende la secuencia X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-Z-X<sub>6</sub>, en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, y X<sub>3</sub> se seleccionan independientemente entre cualquier aminoácido; X<sub>4</sub> se selecciona entre isoleucina, valina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, lisina, triptófano, cisteína, asparagina, histidina, serina, alanina, glicina, glutamato, glutamina, o leucina; X<sub>5</sub> se selecciona entre treonina, serina, lisina, glutamina, metionina, isoleucina, arginina, histidina, glutamato, fenilalanina, cisteína, leucina, o alanina; X<sub>6</sub> se selecciona entre fenilalanina o tirosina; y Z es prolina, con la condición de que X<sub>1</sub> y X<sub>4</sub> no son ambos leucina, o que X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-Z-X<sub>6</sub> no son LAPY. Aunque se pueden usar péptidos de cualquier longitud, el péptido tiene preferiblemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, particularmente al menos aproximadamente 15, y más particularmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. La Tabla 1 muestra diversos ejemplos de estos péptidos. La p minúscula en cada péptido representa la prolina que se puede hidroxilar durante la reacción.

TABLA 1

SEC DE ID N°	SECUENCIA	Actividad (%)*		
		EGLN 1	EGLN 2	EGLN 3
7	DTDL <b>DLEMLAp</b> YIPMDDDFQ*	100,00	100,00	119,43
8	DTDL <b>DWBALAp</b> YIPADDDFQ	107,81	138,08	120,36
9	DTDL <b>DLEAVAp</b> YIPADDDFQ	99,16	86,85	117,27
10	DTDL <b>DYEALAp</b> YIPADDDFQ	94,17	108,03	136,12
11	DTDL <b>DLEALAp</b> YIPADDDFQ	102,11	101,92	118,57
12	DTDL <b>DLEAIAp</b> YIPADDDFQ	88,02	89,05	103,88
13	DTDL <b>DMEALAp</b> YIPADDDFQ	86,40	79,06	127,54
14	DTDL <b>DLEAFAp</b> YIPADDDFQ	82,17	73,87	76,42
15	DTDL <b>DLEARAp</b> YIPADDDFQ	78,99	78,58	68,63
16	DTDL <b>DLEAYAp</b> YIPADDDFQ	77,21	67,82	90,13

ES 2 332 798 T3

SEC DE ID Nº	SECUENCIA	Actividad (%)*		
		EGLN 1	EGLN 2	EGLN 3
17	DTDLDISAIpYIPADDDFQ	72,54	64,29	72,83
18	DTDLDLEATApYIPADDDFQ	68,16	54,88	63,19
19	DTDLDFEALApYIPADDDFQ	65,22	58,57	142,09
20	DTDLDLEAMApYIPADDDFQ	63,67	55,82	94,29
21	DTDLDLEAKApYIPADDDFQ	63,19	54,56	44,13
22	DTDLDDEALApYIPADDDFQ	51,05	42,77	64,99
23	DTDLDAEALApYIPADDDFQ	51,03	46,86	87,15
24	DTDLDIEALApYIPADDDFQ	50,67	43,73	148,95
25	DTDLDLEAWApYIPADDDFQ	50,37	42,36	37,33
26	DTDLDDEEALApYIPADDDFQ	49,63	44,26	80,78
27	DTDLDLEANApYIPADDDFQ	49,23	37,71	42,45
28	DTDLDVEAIpYIPADDDFQ	45-,33	36,60	43,26
29	DTDLDCEALApYIPADDDFQ	44,70	48,78	75,83
30	DTDLDLEACApYIPADDDFQ	41,31	40,40	49,41
31	DTDLDPEALApYIPADDDFQ	40,76	37,36	76,56
32	DTDLDQEALApYIPADDDFQ	38,74	30,09	76,44
33	DTDLDGEALApYIPADDDFQ	37,30	32,03	40,90
34	DTDLDLEAApYIPADDDFQ	36,11	30,89	30,16
35	DTDLDVEAYApYIPADDDFQ	35,48	32,36	44,54
36	DTDLDSEALApYIPADDDFQ	34,66	23,84	61,30
37	DTDLDVEAFApYIPADDDFQ	34,10	37,45	44,20
38	DTDLDAEAVApYIPADDDFQ	34,01	26,29	35,57
39	DTDLDLEAFiApYIPADDDFQ	33,95	32,27	27,04
40	DTDLDIEANApYIPADDDFQ	33,21	34,41	30,45
41	DTDLDVEALApYIPADDDFQ	31,46	29,01	115,46
42	DTDLDAEAIpYIPADDDFQ	31,26	23,96	25,67
43	DTDLDLEASApYIPADDDFQ	29,57	31,60	25,14
44	DTDLDNEALApYIPADDDFQ	27,14	21,36	57,60
45	DTDLDTEALApYIPADDDFQ	25,67	20,49	64,55
45	DTDLDTEALApYIPADDDFQ	23,36	18,04	60,23
46	DTDLDTEAYApYIPADDDFQ	24,06	25,62	35,99
47	DTDLDIEAVApYIPADDDFQ	23,85	23,76	61,30
48	DTDLDTEAIpYIPADDDFQ	23,69	25,28	18,97
49	DTDLDLEAQApYIPADDDFQ	23,41	19,11	39,44

ES 2 332 798 T3

SEC DE ID N°	SECUENCIA	Actividad (%)*		
		EGLN 1	EGLN 2	EGLN 3
50	DTDLDHSALApYIPADDDFQ	23,35	21,47	55,84
51	DTDLDVEAVApYIPADDDFQ	22,81	16,64	48,95
52	DTDLDTEAPApYIPADDDFQ	22,18	28,49	24,15
53	DTDLDTEATApYIPADDDFQ	21,90	24,82	16,49
54	DTDLDAEATApYIPADDDFQ	20,84	19,40	18,52
55	DTDLDVEATApYIPADDDFQ	20,38	13,55	23,99
56	DTDLDREALApYIPADDDFQ	19,91	15,70	49,83
57	DTDLDTEAVApYIPADDDFQ	16,62	19,01	26,79
58	DTDLDAEAAApYIPADDDFQ	12,60	8,63	7,18
59	DTDLDLEAGApYIPADDDFQ	11,34	9,84	12,15
60	DTDLDAEASApYIPADDDFQ	10,49	8,82	4,11
61	DTDLDLEAEApYIPADDDFQ	9,97	13,24	16,93
79	DTDLDLEMLKpYIPMDDDFQ	68,69	57,72	74,49
80	DTDLDLEMLQpYIPMDDDFQ	45,07	38,12	59,88
81	DTDLDLEMLMpYIPIPMDDDFQ	26,43	27,81	58,93
82	DTDLDLEMLIpYIPMDDDFQ	15,56	17,82	100,70
83	DTDLDLEMLRpYIPMDDDFQ	19,78	14,34	77,56
84	DTDLDLEMLHpYIPMDDDFQ	2,41	3,47	68,22
85	DTDLDLEMLEpYIPIPMDDPQ	2,27	3,35	52,77
86	DTDLDLEMLFpYIPMDDDFQ	4,16	0,63	59,34
87	DTDLDLEMLCpYIPMDDDFQ	1,94	0,40	63,11
88	DTDLDLEMLLpYIPMDDDPQ	2,36	-0,42	46,19

\* Péptido control DTD20; las medidas de actividad son relativas a este péptido.

Cualquier polipéptido que comprenda una de estas secuencias, o cualquiera de los péptidos que se muestran en la Tabla 1, se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento. Estos péptidos se usan en una reacción que requiere adicionalmente el co-sustrato de 2-oxoglutarato, una enzima EGLN, y oxígeno, tal como se describe a continuación. La reacción puede incluir adicionalmente Fe<sup>2+</sup>. La reacción procede de acuerdo con la reacción estándar (I), en la que el sustrato de 2-oxoglutarato se convierte a succinato y dióxido de carbono y el péptido sustrato no hidroxilado se hidroxila. La presente solicitud demuestra además que los péptidos muestran especificidad diferencial por las diversas enzimas EGLN. De esta manera, la solicitud da a conocer péptidos optimizados para EGLN1 y EGLN2, que tal como se demuestra en el presente documento, muestran especificidad similar por los diversos péptidos. Para uso en un ensayo en el que la enzima es EGLN1 o EGLN2, o en la que se desea que el péptido muestre al menos una especificidad igual para EGLN1 y/o EGLN2, se puede seleccionar un péptido tal como se ilustra en la Figura 3. Por ejemplo, tal como se puede observar en la Tabla 1 y la Figura 3, el péptido DTDLDLEARApYIPADDDFQ (SEC DE ID N°: 15) muestra mayor especificidad para EGLN1 y EGLN2 que para EGLN3.

Más aún, la presente solicitud da a conocer péptidos optimizados para EGLN3. Para uso en un ensayo en el que la enzima es EGLN3, o en el que se desea que el péptido muestre al menos igual especificidad para EGLN3, se puede seleccionar un péptido tal como se ilustra en la Figura 4. Por ejemplo, tal como se puede observar en la Tabla 1 y la Figura 4, los péptidos DTDLDMEALApYIPADDDFQ (SEC DE ID N°: 13), DTDLDFEALApYIPADDDFQ (SEC

## ES 2 332 798 T3

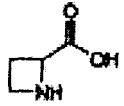
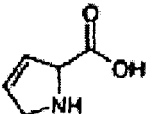
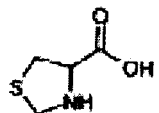
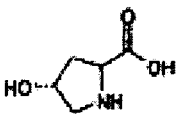
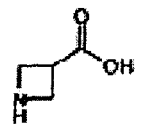
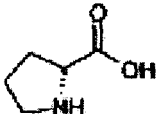
DE ID N°: 19), y DTDLDIEALApYIPADDDFQ (SEC DE ID N°: 24) muestran mayor especificidad para EGLN3 que para EGLN1 y EGLN2.

Adicionalmente, la presente solicitud da a conocer péptidos en los que la actividad mediante EGLN1, EGLN2, y EGLN3 es esencialmente equivalente. Para uso en un ensayo en el que se desea la comparación directa de EGLN1, EGLN2, y EGLN3, o en el que se desea que el péptido muestre especificidad sustancialmente igual para EGLN1, EGLN2, y EGLN3, se puede seleccionar un péptido tal como se ilustra en la Tabla 1. Por ejemplo, tal como se puede observar en la Tabla 1, el péptido DTDLDLEAFApYIPADDDFQ (SEC DE ID N°: 14) muestra especificidad similar para EGLN1, EGLN2, y EGLN3.

La presente invención puede implicar el uso de péptidos que contengan análogos de aminoácidos tal como se muestra en la Tabla 2. Estos análogos se usan en lugar de la prolina, específicamente el resto de prolina modificado mediante hidroxilación en la reacción estándar (I). La presente invención implica el uso de un péptido que comprende la secuencia  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-Z-X_6$ , en la que  $X_1$ ,  $X_2$ , y  $X_3$  se seleccionan independientemente entre cualquier aminoácido.

$X_4$  se selecciona entre isoleucina, valina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, lisina, triptófano, cisteína, asparagina, histidina, serina, alanina, glicina, glutamato, glutamina, o leucina;  $X_5$  se selecciona entre treonina, serina, lisina, glutamina, metionina, isoleucina, arginina, histidina, glutamato, fenilalanina, cisteína, leucina, o alanina;  $X_6$  se selecciona entre fenilalanina o tirosina; y Z es un análogo de prolina que no es susceptible de hidroxilación mediante protil hidroxilasa de HIF, por ejemplo, un análogo seleccionado entre acetidina-2-carboxilato, 3,4-deshidroprolina, b-tioprolina, trans-4-hidroxiprolina, o ácido acetidina-3-carboxílico. Aunque se pueden usar péptidos de cualquier longitud, el péptido tiene preferiblemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, particularmente al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, y más particularmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. La presente invención demuestra que estos análogos, que no son susceptibles de hidroxilación mediante HIF-PH, continúan para permitir la renovación del co-sustrato de 2 oxoglutarato a succinato y dióxido de carbono.

TABLA 2

Nombre	Estructura	Código
Ácido acetidina 2-carboxílico		8
3,4-deshidroprolina		4
b-Tioprolina		5
Trans-4-Hidroxiprolina		2
Ácido acetidina-3-carboxílico		3
D-prolina		d

## ES 2 332 798 T3

Además, las diversas enzimas EGLN muestran diferente afinidad por los péptidos que contienen análogos de prolina. La presente invención proporciona de esta manera, en algunas formas de realización, péptidos que contienen análogos de prolina optimizados para EGLN1 y EGLN2 tal como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

SEC DE ID N°	Secuencia	Actividad (%)*	
		EGLN1	EGLN2
7	DTDLDLEMLApYIPMDDDFQ	100,00	100,00
62	DTDLDLEALA4YIPADDDDFQ	123,94	173,02
63	DTDLDLEALA8YIPADDDDFQ	78,86	62,04
64	DTDLDVEAYABYIPADDDDFQ	32,29	27,22
65	DTDLDTEAYA8YIPADDDDFQ	25,12	16,96
66	DTDLDVEAFA8YIPADDDDFQ	21,185	13,92
67	DTDLDIEAIA8YIPADDDDFQ	18,265	10,02
68	DTDLDTEAFA8YIPADDDDFQ	17,375	8,90
69	DTDLDTEALA8YIPADDDDFQ	11,39	8,52
70	DTDLDAAEA8YIPADDDDFQ	10,32	4,16
71	DTDLDAAEAVA8YIPADDDDPQ	10,03	3,36
72	DTDLDLEALA5YIPADDDDFQ	8,925	7,90
73	DTDLDVEAIA8YIPADDDDFQ	7,955	2,81
74	DTDLDAAEATA8YIPADDDDFQ	7,6	1,55
75	DTDLDAAEIA8YIPADDDDFQ	6,68	1,88
76	DTDLDIEAVA8YIPADDDDPQ	6,35	1,96

Los péptidos que se muestran en la Tabla 3, que retienen actividad mensurable en el presente ensayo, se contemplan específicamente para uso en los ensayos reivindicados en el presente documento. Estos péptidos se usan en una reacción que requiere adicionalmente co-sustrato de 2-oxoglutarato y un agente reductor, por ejemplo, ascorbato, una enzima EGLN, y oxígeno, tal como se describe a continuación. La reacción puede incluir también Fe<sup>2+</sup>. La reacción procede de acuerdo con la reacción modificada (II), en la que el 2-oxoglutarato se convierte a succinato y dióxido de carbono, y el agente reductor se oxida posteriormente, por ejemplo, el ascorbato se oxida a deshidroascorbato. Aunque la reacción requiere la presencia del péptido, el péptido no se modifica durante la reacción y actúa como un cofactor de enzima.

Los péptidos para uso en un ensayo en el que la enzima es EGLN1 o EGLN2, o en el que se desea que el péptido muestra afinidad específica para EGLN1 y/o EGLN2, se puede seleccionar un péptido tal como se ilustra en la Tabla 3. (Véase, también, la Figura 3). Por ejemplo, tal como se puede observar en la Tabla 3 y la Figura 3, el péptido DTDLDLEALA4YIPADDDDFQ (SEC DE ID N°:62), en el que la prolina hidroxilada se sustituye por el análogo de prolina 3,4-deshidroprolina, muestra mayor especificidad para EGLN1 y EGLN2 que para EGLN3.

La presente invención proporciona además, en algunas formas de realización, péptidos que contienen análogos de prolina optimizados para EGLN3 tal como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

SEC DE ID Nº	Secuencia	Actividad (%)
		EGLN3
7	DTDLDLEMLApYIPMDDDFQ	119,42
63	DTDLDLEALA8YIPADDDFQ	168,84
69	DTDLDTEA8YIPADDDFQ	80,07
62	DTDLDLEALA4YIPADDDFQ	74,44
64	DTDLDVEAYA8YIPADDDFQ	33,45
67	DTDLDIEAIA8YIPADDDFQ	31,22
65	DTDLDTEAYA8YIPADDDFQ	29,69
66	DTDLDVEAFA8YIPADDDFQ	24,46
77	DTDLDVEAVA8YIPADDDFQ	20,61
76	DTDLDIEAVA8YIPADDDFQ	18,84
68	DTDLDTEAPA8YIPADDDFQ	18,67
71	DTDLDAEAVA8YIPADDDFQ	17,16
73	DTDLDVEAIA8YIPADDDFQ	14,76
72	DTDLDLEALA5YIPADDDFQ	11,07
78	DTDLDTEAVA8YIPADDDFQ	10,31
75	DTDLDAEIA8YIPADDDFQ	9,72

Los péptidos que se muestran en la Tabla 4, que retienen actividad mensurable en el presente ensayo, se contemplan específicamente para uso en los ensayos reivindicados en el presente documento. Estos péptidos se usan en una reacción que requiere adicionalmente 2-oxoglutarato y un agente reductor, por ejemplo, ascorbato; una enzima EGLN y oxígeno, tal como se describe a continuación. La reacción puede incluir también  $Fe^{2+}$ . La reacción procede de acuerdo con la reacción modificada (II), en la que el 2-oxoglutarato se convierte a succinato y dióxido de carbono y el agente reductor se oxida posteriormente, por ejemplo, el ascorbato se oxida a deshidroascorbato. Aunque la reacción requiere la presencia del péptido sustrato, el péptido no se modifica durante la reacción y actúa como un cofactor de enzima.

Para uso en el ensayo en el que la enzima es EGLN3, o en el que se desea que el péptido muestre mayor especificidad para EGLN3, se puede seleccionar un péptido tal como se ilustra en la Tabla 4. (Véase, también, la Figura 4). Por ejemplo, tal como se observa en la Tabla 4 y la Figura 4, el péptido DTDLDLEALA8YIPADDDFQ (SEC DE ID Nº: 63), en el que la prolina hidroxilada se sustituye por el análogo de prolina L-acetidina-2-carboxilato, muestra mayor especificidad para EGLN3 que para EGLN1 y EGLN2.

De esta manera, los péptidos para uso en los siguientes ensayos incluyen cualquiera de los péptidos sustratos anteriores, particularmente los identificados en las Tablas 1 a 4. Los péptidos contemplados para uso en los presentes ensayos incluyen también diversas combinaciones de las sustituciones ejemplificadas en los péptidos identificados en las Tablas 1 a 4. Por ejemplo, las combinaciones de sustituciones que se muestran en la Figura 5 demuestran un intervalo de péptidos posibles que tienen especificidad por las EGLN para uso en la reacción modificada (II). El panel en la parte superior de la Figura 5 demuestra diversas modificaciones que se pueden llevar a cabo para retener o potenciar la especificidad hacia EGLN1 y/o EGLN2, mientras que el panel en la parte inferior de la Figura 5 demuestra diversas modificaciones que se pueden llevar a cabo para retener o potenciar la especificidad hacia EGLN3. Una persona experta en la técnica imaginará inmediatamente, a partir de la información proporcionada anteriormente y en la Figura 5, un amplio intervalo de péptidos novedosos no dados a conocer específicamente en el presente documento. Por ejemplo, los péptidos DTDLDYEMIApYIPADDDFQ (SEC DE ID Nº: 89), DTDLDWEMVSpYIPADDDFQ (SEC DE ID Nº: 90), DTDLDWEAVSpYIPADDDFQ SEC DE ID Nº: 91), y DTDLDWEMVApYIPADDDFQ (SEC DE ID Nº: 92) se hidroxilan fácilmente mediante EGLN1 y EGLN3.

El uso de un péptido en una reacción estándar (I) o la reacción modificada de la invención (II) se determina principalmente mediante la ausencia o presencia, respectivamente, de un análogo de prolina en lugar del resto de prolina hidroxilado por la HIF-PH.

Cualquiera de los péptidos anteriormente mencionados se puede sintetizar químicamente utilizando, por ejemplo, la química Fmoc llevada a cabo usando, por ejemplo, un sintetizador de péptidos 432A automatizado (Applied Biosystems), u otras tecnologías conocidas por las personas expertas en la técnica.

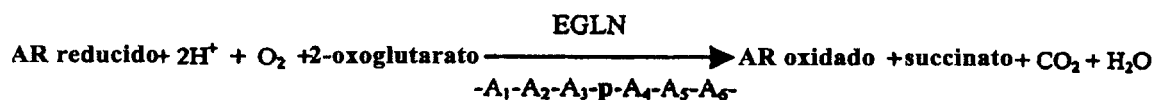
## Ensayos

La presente invención se refiere a procedimientos para medir la actividad de una enzima EGLN. En un aspecto, los procedimientos son ensayos que comprenden combinar una enzima EGLN, un sustrato de 2-oxoácido, y un péptido sustrato, tal como se proporciona anteriormente en condiciones adecuadas para la actividad de la enzima EGLN; y medir la actividad de la enzima. En algunos procedimientos descritos en el presente documento, la actividad de la enzima se mide en la Reacción Estándar (I), que convierte 3l 2-oxoglutarato en succinato y dióxido de carbono, y convierte concomitantemente el péptido no hidroxilado en péptido hidroxilado. El ensayo estándar comprende la reacción (I):



en la que  $\text{-A}_1\text{-A}_2\text{-A}_3\text{-P-A}_4\text{-A}_5\text{-A}_6\text{-}$  representa el péptido sustrato y  $\text{-A}_1\text{-A}^2\text{-A}^3\text{-P}^{\text{OH}}\text{-A}_4\text{-A}_5\text{-A}_6\text{-}$  representa el péptido hidroxilado. El resto de prolina no hidroxilada se representa como P y la prolina hidroxilada se representa como  $\text{P}^{\text{OH}}$ . La prolina concreta para uso en el sustrato es preferiblemente la L-prolina que se produce naturalmente (p), aunque se puede usar el isómero D-prolina (d) en algunos ejemplos. Los sustratos específicamente para uso en el presente ensayo incluyen los proporcionados en la Tabla 1, más arriba, y las combinaciones de estos sustratos claramente previstas en el presente documento, por ejemplo, las SEC DE ID N<sup>os</sup> 11 y 84 a 86. Los cosustratos se combinan con la enzima en condiciones adecuadas para soportar la actividad de la enzima, y a continuación se mide la actividad de la enzima. El ensayo se puede usar en ausencia o presencia de componentes adicionales, por ejemplo, se puede añadir a la reacción un agente sospechoso de aumentar o disminuir potencialmente la actividad de la enzima.

En algunas formas de realización de los procedimientos reivindicados en el presente documento, se mide la actividad de la enzima en la Reacción Modificada (II), que convierte el 2-oxoglutarato en succinato y dióxido de carbono, y convierte concomitantemente un agente reductor (AR), por ejemplo, ascorbato, en su forma oxidada, por ejemplo, deshidroascorbato. El ensayo modificado comprende la reacción (II):



en la que  $\text{-A}_1\text{-A}_2\text{-A}_3\text{-p-A}_4\text{-A}_5\text{-A}_6\text{-}$  representa el péptido; el análogo de prolina se representa como p. En esta reacción, el péptido actúa como un cofactor de enzima más bien que como un sustrato real. Los análogos de péptido preferidos incluyen, pero no se limitan a, isómeros L y D, preferiblemente los isómeros L, de acetidina-2-carboxilato, 3,4-deshidroprolina, y b-tioprolina. Adicionalmente, los análogos de prolina para uso en el sustrato puede incluir, por ejemplo, isómeros L y D, preferiblemente isómeros L, de 2,3-deshidroprolina. Los péptidos específicamente para uso en el presente ensayo incluyen los proporcionados en las Tablas 3 y 4, *más arriba*, y las combinaciones de estos sustratos claramente previstas en el presente documento (Véase, por ejemplo, la Figura 5). En diversas formas de realización, los cosustratos y cofactores se combinan con la enzima en condiciones adecuadas para soportar la actividad de la enzima, y a continuación se mide la actividad de la enzima. Se puede usar el ensayo en ausencia o presencia de componentes adicionales, por ejemplo, se puede añadir a la reacción un agente sospechoso de aumentar o disminuir potencialmente la actividad de la enzima; dicho uso del ensayo modificado es claramente abarcado por la presente invención.

El ensayo puede también incluir hierro. En general, se proporcionan iones ferrosos en un intervalo de entre aproximadamente 0 a 500  $\mu\text{M}$ , por ejemplo, entre 25 y 250  $\mu\text{M}$ , y en concreto entre 50 y 200  $\mu\text{M}$ . Se pueden suministrar iones ferrosos en cualquier forma adecuada incluyendo, por ejemplo, cloruro ferroso, sulfato ferroso, etc. Se proporciona el 2-oxoglutarato en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 100  $\mu\text{M}$ , por ejemplo, entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ ; y se puede suministrar en cualquier forma adecuada incluyendo, por ejemplo, una sal. Generalmente, y específicamente en la reacción estándar (I), se proporciona ascorbato en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 a 10 mM, por ejemplo, entre 0,5 y 5 mM; y se puede suministrar en cualquier forma adecuada incluyendo, por ejemplo, una sal, por ejemplo, ascorbato de sodio. Se puede sustituir el ascorbato por otro agente reductor, por ejemplo, ferrocianuro de potasio, en la reacción estándar (I) o, más preferiblemente, en la reacción modificada (II).

Se puede medir la actividad de la enzima vigilando el consumo de uno o más sustratos de la reacción, o la acumulación de uno o más productos de la reacción. Se puede medir, por ejemplo, la actividad de la enzima en cualquiera de la reacción estándar (I) o la reacción modificada (II) usando una versión modificada de un procedimiento descrito por Kivirikko y Myllyla (1982, *Methods Enzymol* 82: 245-304), que está basado en la descarboxilación del ácido 2-oxo[1-<sup>14</sup>C]glutámico. En este procedimiento, el <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> radioactivo producido durante la reacción se captura en papeles de filtro impregnados con base y la radioactividad capturada se determina mediante recuento por centelleo líquido. Se puede medir la actividad de la enzima en la reacción estándar (I) tal como se describe en el Ejemplo 2 (Referencia) (véase *más abajo*).

## ES 2 332 798 T3

En diversas formas de realización, se puede medir la actividad de la enzima dentro de la reacción modificada (II) mediante la desaparición de la forma reducida del agente reductor o la aparición de la forma oxidada del agente. Se puede usar cualquier agente reductor adecuado en la reacción modificada (II); se pueden seleccionar los agentes reductores contemplados específicamente para uso mediante la presente invención entre ascorbato y ferrocianuro. Por ejemplo, cuando se usa ascorbato en la reacción modificada (II), se pueden medir la desaparición del ascorbato y/o la aparición del deshidroascorbato, por ejemplo, usando HPLC. En formas de realización concretas, se puede añadir ascorbato a la reacción modificada (II) en cantidad limitante, y el ascorbato se regenera durante la reacción con oxidación concomitante de NAHD a NAD<sup>+</sup> usando una modificación del procedimiento descrito por Diliberto y Allen (1981, J Biol Chem 256: 3385-3393). La reacción incluye adicionalmente, por ejemplo, semideshidroascorbato reductasa, que cataliza la reducción dependiente de NADH de semideshidro-ascorbato a ascorbato. La actividad HIF-PH se mide indirectamente mediante el consumo de NADH, que produce una reducción en la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Cuando se lleva a cabo la reacción modificada (II) usando ferrocianuro de potasio, se puede medir directamente la conversión del agente reductor a la forma oxidada, ferricianuro de potasio usando espectrofotometría. En una forma de realización concreta, se midió la actividad de la enzima en la reacción modificada (II) tal como se describe en el Ejemplo 3 (véase más abajo).

### Agentes de ensayo

Los agentes para uso en procedimiento para identificar moduladores de la actividad de la enzima EGLN incluyen, pero no se limitan a, compuestos químicos naturales o sintéticos. Dichos compuestos o agentes se pueden obtener como extractos, que contienen diversos componentes caracterizados o no caracterizados, obtenidos de plantas, microbios, u otros organismos; o pueden ser bibliotecas complejas de polipéptidos o pequeñas moléculas, tales como moléculas de bibliotecas combinatorias comercialmente disponibles, o similares. Se pueden obtener también compuestos o agentes como una biblioteca químicamente centrada de moléculas candidatas; se han descrito, por ejemplo, bibliotecas centradas específicas de inhibidores de la quinasa (Véase, por ejemplo, Gray y col. (1998) Science 281:533-538; y Chang y col. (1999) Chem Biol 6: 361-375.).

Estas y otras formas de realización de la presente invención se producirán fácilmente para las personas normalmente expertas en la técnica a la vista de la descripción en el presente documento.

### Ejemplos

La invención se entenderá además por referencia a los siguientes ejemplos, que se pretende que sean puramente ejemplares de la invención. Estos ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención reivindicada. La presente invención no se limita en su alcance a las formas de realización ejemplificadas, que se pretenden únicamente como ilustraciones de aspectos únicos de la invención. Diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para las personas expertas en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras que la acompañan.

#### Ejemplo 1

(Síntesis)

#### Péptidos

Se sintetizaron los péptidos usados en la presente invención por Mimotopes (San Diego CA) y SynPep Corporation (Dublin CA). Se midió la actividad en relación con un péptido control, DTD20:

DTDLDLEMLAPYIPMDDDFQ (DTD20)

DTD20 es muy similar a la región C-ODD de HIF-1 $\alpha$ , sin embargo, existe homología extensiva entre todos los miembros de la familia HIF $\alpha$  dentro de esta región. En algunos ensayos proporcionados en el presente documento, se midió la actividad en presencia del péptido DLD19:

DLDLEALAPYIPADDDFQL (DLD19)

En DLD19, los restos de metionina (M) se cambiaron a restos de alanina (A) debido a la oxidación potencial de la metionina durante la reacción de ensayo. Los péptidos usados en el ensayo pueden contener adicionalmente grupos de bloqueo N terminales y/o C terminales, por ejemplo, grupos acetil N terminales, grupos amida C terminales, etc. Se proporciona más arriba la actividad de la enzima en presencia de péptidos sustrato como porcentaje de actividad de la enzima en presencia del péptido control DTD20.

## Ejemplo 2

(Referencia)

5 *Reacción estándar (I)*

En todos los experimentos, el porcentaje de actividad de la enzima, por ejemplo, como medida de la renovación del sustrato, fue menor del 30% para asegurar que todos los datos obtenidos estuvieran en el intervalo lineal. Se midió la actividad de la enzima en la reacción estándar (I) en un volumen de reacción de 1 ml que contenía la preparación de la enzima EGLN (10-400  $\mu$ l), 0,05  $\mu$ moles de péptido sustrato hidroxilable, 0,1  $\mu$ moles de ácido 2-oxo[1-<sup>14</sup>C] glutámico (160.000 dpm), 1  $\mu$ mol de ácido ascórbico, 60  $\mu$ g de catalizador y 50  $\mu$ moles de tampón HEPES ajustado a pH 7,4 a 25°C. Opcionalmente, se añadieron también 0,04  $\mu$ moles de FeSO<sub>4</sub> a la mezcla de reacción. Se llevaron a cabo las reacciones a 37°C durante 20 minutos. En diversas reacciones, se sustituyó el ascorbato por 0,1 a 15 mM de ferrocianuro de potasio. En la Tabla 1 (*véase más arriba*) y las Figuras 3 y 4, se proporcionan los resultados.

15

## Ejemplo 3

20 *Reacción modificada (II)*

Se midió la actividad de la enzima en la reacción modificada (II) tal como se describe en (referencia) el Ejemplo 2 (*véase más arriba*), excepto que se usó péptido no hidroxilable, y se añadió agente reductor a la reacción. En diversas reacciones modificadas (II), se usaron 0,1 a 5,0 mM de ferrocianuro de potasio como agente reductor, y tras la incubación de la mezcla de reacción, una alícuota de 105  $\mu$ l de la solución de reacción se transfirió a una placa transparente y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm. (Véase la Figura 6). Cuando se usa ascorbato como agente reductor, se mide la desaparición del ascorbato y/o la aparición del deshidroascorbato usando HPLC.

25

Diversas modificaciones de la invención, en adición a las que se muestran y describen en el presente documento, serán aparentes para las personas expertas en la técnica a partir de la descripción anterior.

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 332 798 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir la actividad de una enzima EGLN, comprendiendo el procedimiento

- 5 (a) combinar una enzima EGLN con 2-oxoglutarato, un agente reductor y un péptido en condiciones adecuadas para la actividad de la enzima EGLN, y  
(b) medir la actividad de la enzima,

10 en el que el péptido comprende la secuencia  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-Z-X_6$ , en la que

$X_1$ ,  $X_2$ , y  $X_3$  se seleccionan independientemente entre cualquier aminoácido;

15  $X_4$  se selecciona entre isoleucina, valina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, lisina, triptófano, cisteína, asparagina, histidina, serina, alanina, glicina, glutamato, glutamina, o leucina;

$X_5$  se selecciona entre treonina, serina, lisina, glutamina, metionina, isoleucina, arginina, histidina, glutamato, fenilalanina, cisteína, leucina, o alanina;

20  $X_6$  se selecciona entre fenilalanina o tirosina; y

Z es un análogo de prolina que no es susceptible de hidroxilación mediante la prolil hidroxilasa de HIF.

25 2. Un procedimiento para identificar un agente que modula la actividad de una enzima EGLN, comprendiendo el procedimiento

- 30 (a) combinar una enzima EGLN con un agente de ensayo, 2-oxoglutarato, un agente reductor y un péptido en condiciones adecuadas, en ausencia del agente, para la actividad del enzima EGLN,

en el que el péptido comprende la secuencia  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-Z-X_6$ , en la que

$X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$  se seleccionan independientemente entre cualquier aminoácido;

35  $X_4$  se selecciona entre isoleucina, valina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, lisina, triptófano, cisteína, asparagina, histidina, serina, alanina, glicina, glutamato, glutamina, o leucina;

$X_5$  se selecciona entre treonina, serina, lisina, glutamina, metionina, isoleucina, arginina, histidina, glutamato, fenilalanina, cisteína, leucina, o alanina,

40  $X_6$  se selecciona entre fenilalanina o tirosina, y

Z es un análogo de prolina que no es susceptible de hidroxilación mediante la prolil hidroxilasa de HIF

- 45 (b) medir la actividad de la enzima y

- (c) comparar la actividad de la enzima en presencia del agente con la actividad de la enzima en ausencia del agente, en el que un cambio en la actividad de la enzima en presencia del agente respecto de la actividad de la enzima en ausencia del agente es indicativo de un agente que modula la actividad de EGLN.

50 3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que el agente reductor se selecciona entre el grupo constituido por ascorbato y ferrocianuro de potasio.

55 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de combinación comprende adicionalmente hierro.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enzima EGLN comprende la secuencia de la SEC DE ID N°: 3.

60 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la enzima EGLN comprende la secuencia de la SEC DE ID N°: 2.

65 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la enzima EGLN se selecciona entre el grupo constituido por EGLN1, EGLN2, EGLN3, y los fragmentos activos de EGLN1, EGLN2, y EGLN3.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N°s: 62-78.

## ES 2 332 798 T3

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enzima EGLN se selecciona entre el grupo que comprende EGLN1, un fragmento activo de EGLN1, EGLN2, y un fragmento activo de EGLN2; y el péptido comprende la secuencia  $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-Z-X_6$ , en la que

5  $X_1$  se selecciona entre tirosina, triptófano, metionina, isoleucina, fenilalanina, aspartato, alanina, glutamato, cisteína, prolina, glicina, y leucina;

$X_2$  y  $X_3$  se seleccionan independientemente entre cualquier aminoácido:

10  $X_4$  se selecciona entre isoleucina, valina, arginina, fenilalanina, tirosina, metionina, treonina, lisina, triptófano, cisteína, asparagina, histidina, serina, alanina, glicina, glutamato, glutamina, o leucina;

$X_5$  se selecciona entre treonina, serina, lisina, glutamina, metionina, o alanina;

15  $X_6$  se selecciona entre fenilalanina o tirosina; y

Z es un análogo de prolina que no es susceptible de hidroxilación mediante prolil hidroxilasa de HIF.

20 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62 y 63.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la enzima EGLN es EGLN3 o un fragmento activo de EGLN3.

25 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 62, 63, 69 y 72.

13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que Z es acetidina-2-carboxilato.

30 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el péptido se selecciona entre el grupo constituido por las SEC DE ID N<sup>os</sup>: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, y 78.

15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que Z es 3,4-deshidroprolina.

35 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que el péptido es la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 62.

17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que Z es b-tioprolinea.

40 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el péptido es la SEC DE ID N<sup>o</sup>: 72.

19. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la medida de la actividad de EGLN comprende medir el dióxido de carbono producido por la reacción, en el que la cantidad de dióxido de carbono producido es directamente proporcional a la actividad de la enzima EGLN.

45 20. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 13 a 18, en el que la medida de la actividad de EGLN comprende medir la conversión del agente reductor en su forma oxidada durante la reacción, en el que la cantidad de agente reductor que se oxida es directamente proporcional a la actividad de la enzima EGLN.

50 21. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el péptido tiene al menos 20 aminoácidos de longitud.

22. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z se selecciona entre los isómeros L y D de acetidina-2-carboxilato, 3,4-deshidroprolina, b-tioprolinea y 2,3-deshidroprolina.

55 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que Z es un isómero L.

24. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que Z se selecciona entre trans-4-hidroxiprolina, ácido acetidina-3-carboxílico y D-prolinea.

60

65











```

consenso
HIF1A_HUMANO      GSLFQAVGIG-----TLQQPDDRAATTSLSWKRVKCKSSEQNGME 767
HIF1V_BOVINO      GSLFOAVGII-----TLQQPDDRAATTSLSWKRVKCKSSEQNGME 735
HIF1A_BOVINO      GSLFOAVGIG-----TLQQPDDRAATTSLSWKRVKCKSSEQNGME 764
HIF1A_RATA        GSLFOAVGIG-----TLQQPDDRAATTSLSWKRVKCKSSEQNGME 766
HIF1A_RATÓN      GSLFOAVGIG-----TLQQPDDCAFTMSLWKRKVGFISSSEQNGTE 777
HIF1A_GALLINA     GSLFOAVGIG-----SLFOYGDGRGNASLAWKRKVKACKINGHNGVE 752
HIF1A_XENLA       GPLFOAIGIG-----TLFQYTWVDPGPMWSLQWKRKVGSDSERLSSAE 746
HIFA_ONCMY        --LSOAVGIG-----GLLQDMHPGG-----KCLKVSELSHADAPP 703
HIF2A_HUMANO      EQAFQDLGGDPPGGSTSHLWKRKMKNLRGG-SCPLMPDKPLSANVPNDKFTQWPMRGLGHPLRHLPLPQPPSAISPGEN 794
HIF2A_BOVINO      EQAFQDMGGDPPGGSTSHLWKRKMKSLRGGTCSLMPDKLNPANVPNDEFIQMPVGRSQPLRHLSPQPPSATSPGEP 794
HIF2A_RATÓN      EQAFQDTSGGDPPGCTSSGHLWKRKMKSLMGG-TCPLMPDKTISANWAPDEFTQKSNRGLGQPLRHLPPQPPSTRSSGEN 798
HIF2A_RAJA        BPAFQDTSGGDPPGCTSSGHLWKRKMKSLMGG-TCPLMPDKTVBASMAPDEFTQKSNRGLGQPLRHLPPSQPPSTRSPGEN 798
HIF3A_HUMANO      NFLLFFLSLS-----FLLTGGPAPG-----SLODPSTFILMLINE 633
HIF3A_RATA        SVLLPPLSLS-----FLLQGRQLPG-----NQPDPRAFLVDSHE 627

consenso
HIF1A_HUMANO      QKTIILIP-----SDIACRLIQEMDESG-----LPQULSYDCEVNAPIQGSERNLQGEELLRALDQVN 826
HIF1V_HUMANO      -----
HIF1A_BOVINO      QKTIILIP-----SDIACRLIQEMDESG-----LPQULSYDCEVNAPIQGSERNLQGEELLRALDQVN 823
HIF1A_RAJA        QKTIILIP-----SDIACRLIQEMDESG-----LPQULSYDCEVNAPIQGSERNLQGEELLRALDQVN 825
HIF1A_RATÓN      QKTIILIP-----SDIACRLIQEMDESG-----LPQULSYDCEVNAPIQGSERNLQGEELLRALDQVN 836
HIF1A_GALLINA     QKTIILIS-----TDIASKLIQOSMDESG-----LPQULSYDCEVNAPIQGNRNLLQGEELLRALDQVN 811
HIF1A_XENLA       QRTIILLIS-----TDMASQLIQSFDGTV-----LPQULYDCEVNAVPHGTRNLLQGEELLRALDQAN 805
HIFA_ONCMY        NRTIILLIP-----TDLASRLIGISSEGGSPFTLPQLTRYDCEVNAVPGGRQLLQGEELLRALDQVN 766
HIF2A_HUMANO      SKSRFPQCYATQYQDYSLSAAHKVSCMASRLIGPSFESYL-----LPELTRYDCEVNVVPLGSSTLQGGDLLRALDQAT 870
HIF2A_BOVINO      TKSQFPAQCYAPQYQDYSLPAHKMSMASRLIGPSFEPYL-----LPELTRYDCEVNVVYFQSTLQGGDLLRALDQAT 870
HIF2A_RATÓN      AKTGFPQCYASQYQDYGPPCAQYSGVASRLIGPSFEPYL-----LPELTRYDCEVNVVYFQSTLQGGDLLRALDQAT 874
HIF2A_RAJA        AKSGFPQCYASLFFQDYSPPCAQKSGVASRLIGPSFEPYL-----LPELTRYDCEVNVVPEPGSSTLQGGDLLRALDQAT 874
HIF3A_HUMANO      PLG-----LQPS-----LPSYSEDTTQGGFFOPRAG-----SAQAD 667
HIF3A_RATA        PLG-----LQPS-----LPSYQHEBTTQSRNHFLPAPAG-----LAQTH 662

Alineamiento múltiple de secuencia CLUSTAL W (1.81)
ONCMY = Oncorhynchus mykiss (trucha arcoiris)

```

Figura 1F

▼

PF03171 QVARYGP-QGYTQPHVDNFVDDENGNRIATFLLYLK---DVEEGGELVFPGLRADWC  
 CDD13071 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVVKVHGILRIFFEGSTTF  
 CONSENSO MVACTPGNGGxGYVRHVDP:GD--GRC:TCIYYLNQxKxKxGGILxIFFEGxxx  
 EGLN1<sub>oma</sub> MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCVTCIYYLNKNDVAKVSGGILRIFFEGKAQF  
 hEGLN1 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCVTCIYYLNKNDVAKVSGGILRIFFEGKAQF  
 mEGLN1 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCVTCIYYLNKNDVAKVSGGILRIFFEGKAQF  
 mEGLN1v MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCVTCIYYLNKNDVAKVSGGILRIFFEGKAQF  
 rEGLN1 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCVTCIYYLNKNDVAKVSGGILRIFFEGKAQF  
 hEGLN2i1 MVACYPGNGLGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVVKVHGILLQIFFEGRPVV  
 hEGLN2i2 MVACYPGNGLGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVVKVGVVRVVRVALGLGLG  
 hEGLN2i3 MVACYPGNGLGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVVKVHGILLQIFFEGRPVV  
 mEGLN2 MVACYPGNGLGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVVKVHGILLQIFFEGRPVV  
 rEGLN2 MVACYPGNGLGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVVKVHGILLQIFFEGRPVV  
 hEGLN3 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNQNDVAKLHGILRIFFEGKSPI  
 mEGLN3 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNKNDVAKLHGCVLRIFFEGKSPV  
 rEGLN3 MVACYPGNGTGYVRHVDPHGD--GRCITCIYYLNKNDVAKLHGCVLRIFFEGKSPV  
 cEGL9 MLAIYPCNCTRYVKEVDNPKVD--GRCITTIYYCNEHNDMATDQOTLRLYPETSMTF

▼

PF03171 ATVKPKKGDLLFFPSGDGRSLRNVCPVTRGSRMAITQMPR  
 CDD13071 ADIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDAKERAAKKEGKLCFAP  
 CONSENSO AXIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDAKERAAKxKx  
 EGLN1<sub>oma</sub> ADIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDADERARAKVKYLTGERG  
 hEGLN1 ADIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDADERARAKVKYLTGERG  
 mEGLN1 ADIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDADERARAKVKYLTGERG  
 mEGLN1v ADIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDADERARAKVKYLTGERG  
 rEGLN1 ADIEPKFDRLFFWS-DRRNPHEVQPAY-ATRYAITVWYFDADERARAKVKYLTGERG  
 hEGLN2i1 ANIEPLFDRLIFWS-DRRNPHEVKPAY-ATRYAITVWYFDAKERAAARDKYQLASGQ  
 hEGLN2i2 RGWRASTPFSTLSPDSGILLFLFSTHSG-QCDLPALPGKWHLLLESGLCGGNSPLSGW  
 hEGLN2i3 ANIEPLFDRLIFWS-DRRNPHEVKPAY-ATRYAITVWYFDAKERAAARDKYQLASGQ  
 mEGLN2 ANIEPLFDRLIFWS-DRRNPHEVKPAY-ATRYAITVWYFDAKERAAARDKYQLASGQ  
 rEGLN2 ANIEPLFDRLIFWS-DRRNPHEVKPAY-ATRYAITVWYFDAKERAAARDKYQLASGQ  
 hEGLN3 ADVEPIFDRLFFWS-DRRNPHEVQPSY-ATRYANTVWYFDAKERAAKCKFRMLTRK  
 mEGLN3 ADVEPIFDRLFFWS-DRRNPHEVQPSY-ATRYANTVWYFDAKERAAKCKFRMLTRK  
 rEGLN3 ADVEPIFDRLFFWS-DRRNPHEVQPSY-ATRYANTVWYFDAKERAAKCKFRMLTRK  
 cEGL9 MDIDPRADRLVFFWS-DRRNPHEVMPVF-RHRFAITVWYNDKSERDKALANGKESDAA

Figura 2

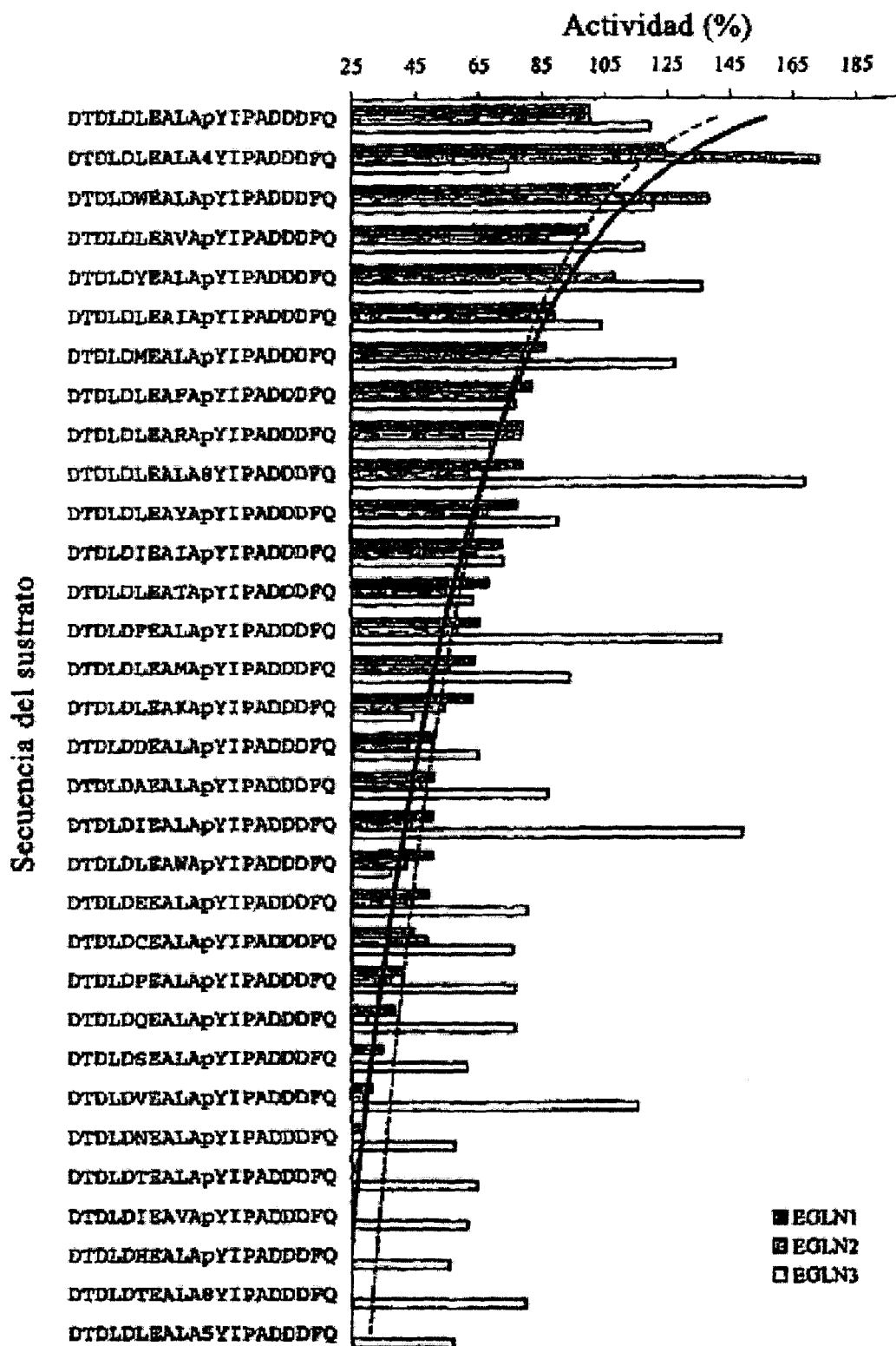


Figura 3



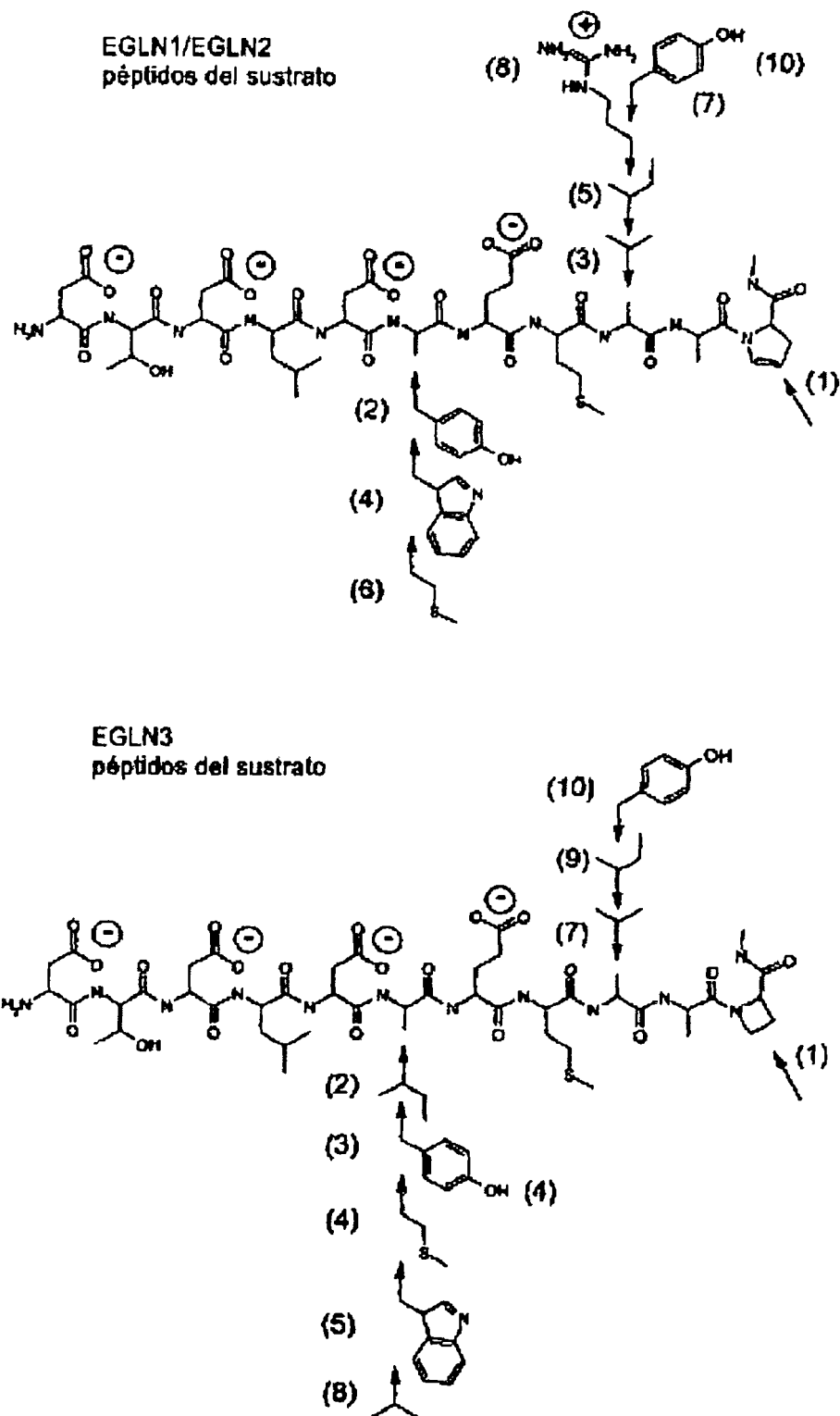
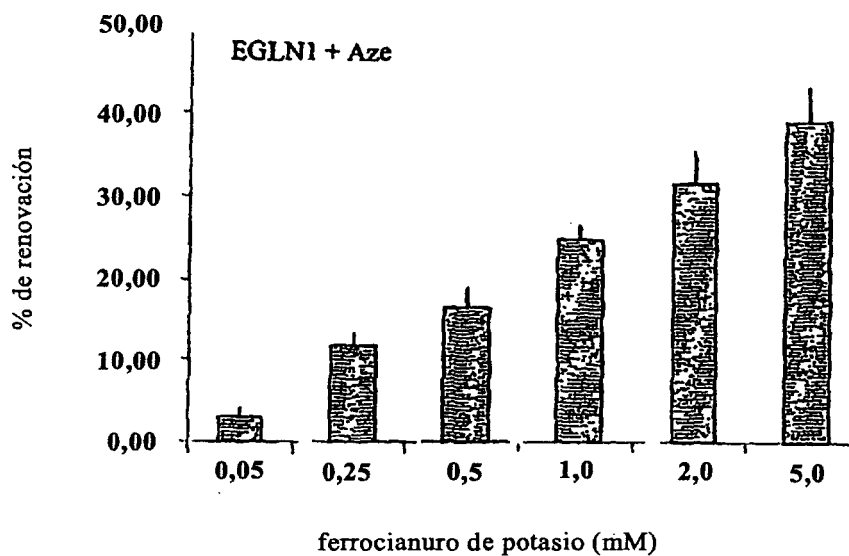


Figura 5

**A.**



**B.**

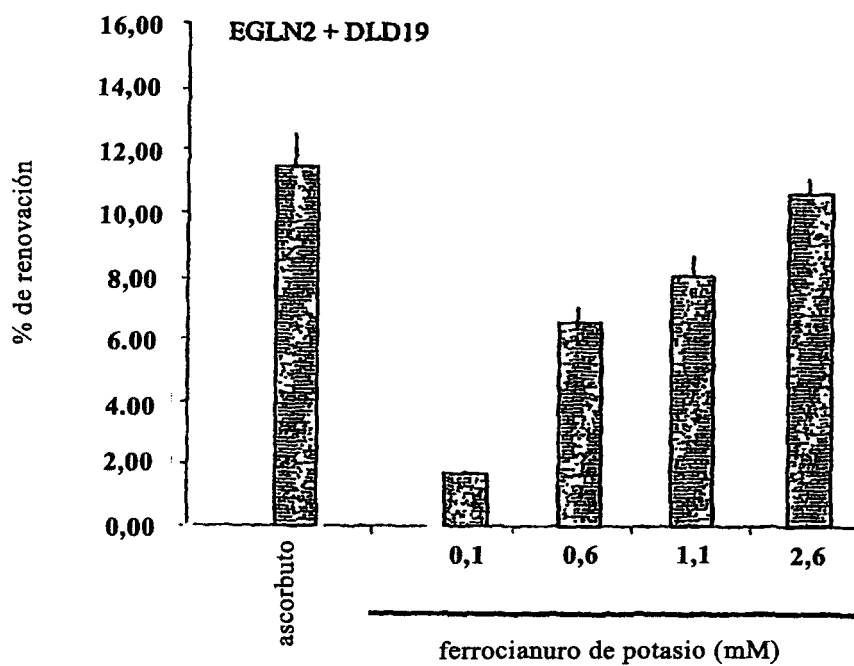


Figura 6

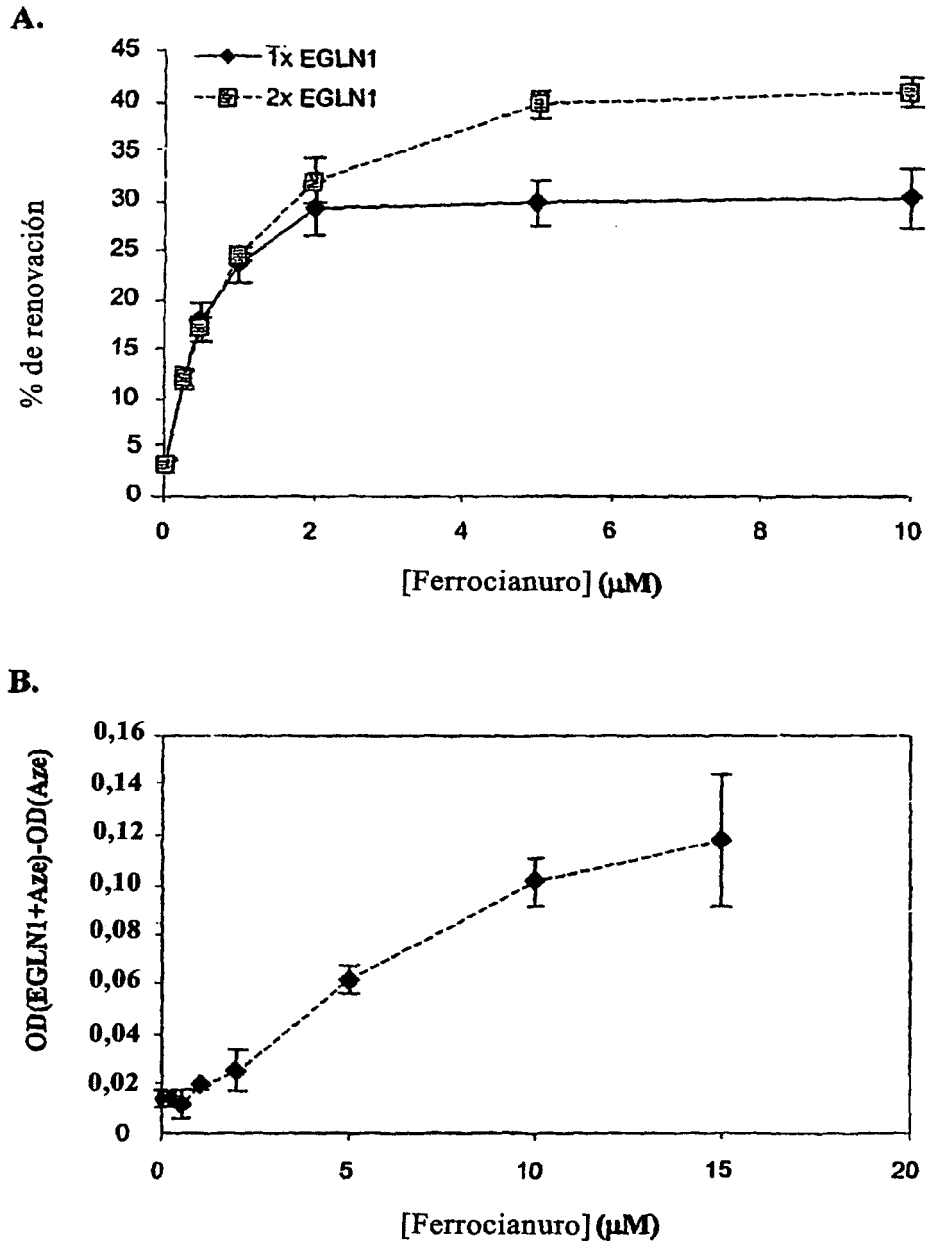


Figura 7

# ES 2 332 798 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> FIBROGEN, INC.  
Brenner, Mitchell C.
- 5
- <120> ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PROLIL HIDROXILASA DE HIF
- <130> FP0618 PCT
- <140> Sin asignar todavía
- 10 <141> Concurrentemente con la presente
- <150> US 60/575.324
- <151> 28-05-2004
- 15 <160> 92
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- 20 <211> 93
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- 25 <223> PF03171: Superfamilia de consenso de la 2OG-Fe(II) oxigenasa
- <400> 1
- 30
- Gln Val Ala Arg Tyr Gly Pro Gly Gly Tyr Tyr Gly Pro His Val Asp**  
**1 5 10 15**
- 35 **Asn Phe Val Asp Asp Glu Asn Gly Asn Arg Ile Ala Thr Phe Leu Leu**  
**20 25 30**
- 40 **Tyr Leu Asn Asp Val Glu Glu Gly Gly Glu Leu Val Phe Pro Gly Leu**  
**35 40 45**
- 45 **Arg Ala Asp Val Cys Ala Thr Val Lys Pro Lys Lys Gly Asp Leu Leu**  
**50 55 60**
- 50 **Phe Phe Pro Ser Gly Asp Gly Arg Ser Leu His Gly Val Cys Pro Val**  
**65 70 75 80**
- 55 **Thr Arg Gly Ser Arg Trp Ala Ile Thr Gly Trp Phe Arg**  
**85 90**
- <210> 2
- <211> 111
- 60 <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- 65 <223> CDD13071: Región conservada de la proteína EGL-Nueve (EGLN)

ES 2 332 798 T3

<400> 2

5 Met Val Ala Cys Tyr Pro Gly Asn Gly Thr Gly Tyr Val Arg His Val  
1 5 10 15

10 Asp Asn Pro His Gly Asp Gly Arg Cys Ile Thr Cys Ile Tyr Tyr Leu  
20 25 30

15 Asn Gln Asn Trp Asp Val Lys Val His Gly Gly Ile Leu Arg Ile Phe  
35 40 45

20 Pro Glu Gly Ser Thr Thr Phe Ala Asp Ile Glu Pro Lys Phe Asp Arg  
50 55 60

25 Leu Leu Phe Phe Trp Ser Asp Arg Arg Asn Pro His Glu Val Gln Pro  
65 70 75 80

30 Ala Tyr Ala Thr Arg Tyr Ala Ile Thr Val Trp Tyr Phe Asp Ala Lys  
85 90 95

35 Glu Arg Ala Glu Ala Lys Gly Lys Gly Lys Leu Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

<210> 3

<211> 104

40 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

45 <223> Prolil 4-hydroxylasa de HIF de consenso

<220>

<221> MISC\_RASGO

50 <222> (10)..(10)

<223> T o L

<220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (20) .. (20)

<223> V o N

60 <220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (26)..(26)

<223> V o I

65

## ES 2 332 798 T3

<220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (34)..(34)  
5 <223> K, Q, o E

<220>  
<221> MISC\_RASGO  
10 <222> (35)..(35)  
<223> D o N

<220>  
15 <221> MISC\_RASGO  
<222> (38)..(38)  
<223> V, A, o M

20 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (40)..(40)  
<223> V, L, o T

25 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (41)..(41)  
30 <223> S, H, o D

<220>  
35 <221> MISC\_RASGO  
<222> (46)..(46)  
<223> R o Q

40 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (52)..(52)  
<223> K, R, o S

45 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (53)..(53)  
50 <223> A, P, S, o M

<220>  
55 <221> MISC\_RASGO  
<222> (54)..(54)  
<223> Q, V, F, o T

60 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (55)..(55)  
<223> F, V, I, o P

65

## ES 2 332 798 T3

<220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (57)..(57)

5 <223> D o N

<220>

<221> MISC\_RASGO

10 <222> (61)..(61)

<223> K, L, I, o R

<220>

15 <221> MISC\_RASGO

<222> (79)..(79)

<223> Q, K, o M

20 <220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (81)..(81)

25 <223> A, S, o V

<220>

<221> MISC\_RASGO

30 <222> (88).. (88)

<223> I o M

<220>

35 <221> MISC\_RASGO

<222> (96)..(96)

<223> D, K, E, o S

40 <220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (100)..(100)

45 <223> R, E, A, o K

<220>

<221> MISC\_RASGO

50 <222> (103)..(103)

<223> V, D, K, o A

55

60

65

ES 2 332 798 T3

<400> 3

5 Met Val Ala Cys Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Gly Tyr Val Arg His Val  
1 5 10 15

10 Asp Asn Pro Xaa Gly Asp Gly Arg Cys Xaa Thr Cys Ile Tyr Tyr Leu  
20 25 30

15 Asn Xaa Xaa Trp Asp Xaa Lys Xaa Xaa Gly Gly Ile Leu Xaa Ile Phe  
35 40 45

20 Pro Glu Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Ile Glu Pro Xaa Phe Asp Arg  
50 55 60

25 Leu Leu Phe Phe Trp Ser Asp Arg Arg Asn Pro His Glu Val Xaa Pro  
65 70 75 80

30 Xaa Tyr Ala Thr Arg Tyr Ala Xaa Thr Val Trp Tyr Phe Asp Ala Xaa  
85 90 95

35 Glu Arg Ala Xaa Ala Lys Xaa Lys  
100

35 <210> 4  
<211> 20

40 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

45 Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Asp Asp  
1 5 10 15

50  
55 Phe Gln Leu Arg  
20

60 <210> 5  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 332 798 T3

<400> 5

5           Glu Leu Asp Leu Glu Thr Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp Gly Glu  
          1                   5                   10                   15

          Asp Phe Gln Leu Ser  
                  20

10

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

20           Ala Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Ser Met Asp Asp Asp  
          1                   5                   10                   15

25           Phe Gln Leu Asn  
                  20

<210> 7

30 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético DTD20

<400> 7

40

          Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Met Asp  
          1                   5                   10                   15

45           Asp Asp Phe Gln  
                  20

<210> 8

50 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 8

60

          Asp Thr Asp Leu Asp Trp Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp  
          1                   5                   10                   15

65           Asp Asp Phe Gln  
                  20

# ES 2 332 798 T3

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

10 <400> 9

15       **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Val Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                   5                   10                   15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

20 <210> 10  
<211> 20  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

30 <400> 10

35       **Asp Thr Asp Leu Asp Tyr Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                   5                   10                   15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

40 <210> 11  
<211> 20  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

50 <400> 11

55       **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                   5                   10                   15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

60 <210> 12  
<211> 20  
<212> PRT  
65 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético







# ES 2 332 798 T3

<400> 22

5           **Asp Thr Asp Leu Asp Asp Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          **1                           5                           10                           15**

10           **Asp Asp Phe Gln**  
                          **20**

<210> 23

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 23

25

**Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          **1                           5                           10                           15**

30           **Asp Asp Phe Gln**  
                          **20**

35 <210> 24

<211> 20

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45 <400> 24

50           **Asp Thr Asp Leu Asp Ile Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          **1                           5                           10                           15**

**Asp Asp Phe Gln**  
                          **20**

55

<210> 25

<211> 20

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Péptido sintético



ES 2 332 798 T3

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> péptido sintético

10 <400> 29

15       **Asp Thr Asp Leu Asp Cys Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
           1                           5                           10                           15  
           **Asp Asp Phe Gln**  
   20

20 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <400> 30

35       **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Cys Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
           1                           5                           10                           15  
           **Asp Asp Phe Gln**  
   20

40 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> péptido sintético

50 <400> 31

55       **Asp Thr Asp Leu Asp Pro Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
           1                           5                           10                           15  
           **Asp Asp Phe Gln**  
   20

60 <210> 32  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 65 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

# ES 2 332 798 T3

<400> 32

5           **Asp Thr Asp Leu Asp Gln Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

10

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20

<400> 33

25           **Asp Thr Asp Leu Asp Gly Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

30

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

40

<400> 34

45           **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Ala Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

50

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

60

<400> 35

65           **Asp Thr Asp Leu Asp Val Glu Ala Tyr Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

ES 2 332 798 T3

<210> 36  
<211> 20  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

10 <400> 36

15       **Asp Thr Asp Leu Asp Ser Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                   5                   10                   15  
  
          **Asp Asp Phe Gln**  
                          20

20 <210> 37  
<211> 20  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

30 <400> 37

35       **Asp Thr Asp Leu Asp Val Glu Ala Phe Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                   5                   10                   15  
  
          **Asp Asp Phe Gln**  
                          20

40 <210> 38  
<211> 20  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

50 <400> 38

55       **Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Val Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                   5                   10                   15  
  
          **Asp Asp Phe Gln**  
                          20

60 <210> 39  
<211> 20  
<212> PRT  
65 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético





## ES 2 332 798 T3

<210> 46  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

10 <400> 46

```

    Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Tyr Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp
15      1           5           10           15
    Asp Asp Phe Gln
           20
  
```

20 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <400> 47

```

    Asp Thr Asp Leu Asp Ile Glu Ala Val Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp
35      1           5           10           15
    Asp Asp Phe Gln
           20
  
```

40 <210> 48  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Péptido sintético

50 <400> 48

```

    Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Ile Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp
55      1           5           10           15
    Asp Asp Phe Gln
           20
  
```

60 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>  
 <223> Péptido sintético



ES 2 332 798 T3

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <400> 53

**Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Thr Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

15

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

20 <210> 54

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <400> 54

**Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Thr Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

35

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

40 <210> 55

<211> 20

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 55

50

**Asp Thr Asp Leu Asp Val Glu Ala Thr Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

55

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

<210> 56

60

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> Péptido sintético

ES 2 332 798 T3

<400> 56

5           **Asp Thr Asp Leu Asp Arg Glu Ala Leu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

10 <210> 57

<211> 20

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <400> 57

25           **Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Val Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

30 <210> 58

<211> 20

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40 <400> 58

**Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Ala Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**

45           **Asp Asp Phe Gln**  
                          20

<210> 59

50 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido sintético

<400> 59

60           **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Gly Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          1                           5                           10                           15

**Asp Asp Phe Gln**  
                          20

65

ES 2 332 798 T3

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <400> 60

**Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Ser Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

15

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

20 <210> 61

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <400> 61

**Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Glu Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

35

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

40 <210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético

<220>

50 <221> MISC\_RASGO

<222> (11)..(11)

<223> 3,4-deshidroprolina

55 <400> 62

**Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Leu Ala Lys Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

60

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

65 <210> 63

<211> 20

ES 2 332 798 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Péptido sintético  
<220>  
<221> MISC\_RASGO  
10 <222> (11)..(11)  
<223> Ácido acetidina-2-carboxílico  
  
<400> 63  
15  
Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Leu Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp  
1 5 10 15  
20 Asp Asp Phe Gln  
20  
  
<210> 64  
25 <211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Péptido sintético  
<220>  
<221> MISC\_RASGO  
35 <222> (11).. (11)  
<223> Ácido acetidina-2-carboxílico  
  
40 <400> 64  
45 Asp Thr Asp Leu Asp Val Glu Ala Tyr Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp  
1 5 10 15  
Asp Asp Phe Gln  
20  
  
50 <210> 65  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
55 <220>  
<223> Péptido sintético  
<220>  
60 <221> MISC\_RASGO  
<222> (11)..(11)  
<223> Ácido acetidina-2-carboxílico  
65



ES 2 332 798 T3

<210> 68  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

10 <220>  
 <221> MISC\_RASGO  
 <222> (11)..(11)  
 15 <223> Ácido acetidina-2-carboxílico  
 <400> 68

20       **Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Phe Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
           1                   5                   10                   15  
           **Asp Asp Phe Gln**  
                                   20

<210> 69  
 <211> 20  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_RASGO  
 40 <222> (11)..(11)  
 <223> Ácido acetidina-2-carboxílico  
 <400> 69

45       **Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Leu Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
           1                   5                   10                   15  
           **Asp Asp Phe Gln**  
                                   20

<210> 70  
 55 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Péptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_RASGO  
 65 <222> (11)..(11)  
 <223> Ácido acetidina-2-carboxílico

ES 2 332 798 T3

<400> 70

5           **Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Ala Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
             1                           5                           10                           15  
             **Asp Asp Phe Gln**  
   20

10

<210> 71

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20 <220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (11)..(11)

25 <223> Ácido acetidina-2-carboxílico

<400> 71

30           **Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Val Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
             1                           5                           10                           15  
             **Asp Asp Phe Gln**  
   20

35

<210> 72

<211> 20

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

45

<220>

<221> MISC\_RASGO

<222> (11)..(11)

50

<223> b-tioprolina

<400> 72

55

**Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Ala Leu Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
           1                           5                           10                           15

60

**Asp Asp Phe Gln**  
   20

<210> 73

65 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

# ES 2 332 798 T3

<220>  
<223> Péptido sintético

5 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (11) .. (11)  
<223> Ácido acetidina-2-carboxílico

10 <400> 73

15       **Asp Thr Asp Leu Asp Val Glu Ala Ile Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          **1                  5                                  10                                  15**

**Asp Asp Phe Gln**  
20                           **20**

<210> 74  
25 <211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Péptido sintético  
<220>  
<221> MISC\_RASGO  
35 <222> (11) .. (11)  
<223> Ácido acetidina-2-carboxílico

40 <400> 74

**Asp Thr Asp Leu Asp Ala Glu Ala Thr Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp**  
          **1                  5                                  10                                  15**

45       **Asp Asp Phe Gln**  
          **20**

50 <210> 75  
<211> 20  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Péptido sintético

60 <220>  
<221> MISC\_RASGO  
<222> (11)..(11)  
65 <223> Ácido acetidina-2-carboxílico



ES 2 332 798 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

5  
 <220>  
 <221> MISC\_RASGO  
 <222> (11)..(11)

10  
 <223> Ácido acetidina-2-carboxílico

<400> 78

15  
 Asp Thr Asp Leu Asp Thr Glu Ala Val Ala Xaa Tyr Ile Pro Ala Asp  
 1 5 10 15

20  
 Asp Asp Phe Gln  
 20

25  
 <210> 79  
 <211> 20  
 <212> PRT

30  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

35  
 <400> 79

40  
 Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Lys Pro Tyr Ile Pro Met Asp  
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Gln  
 20

45  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> PRT

50  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético

55  
 <400> 80

60  
 Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Gln Pro Tyr Ile Pro Met Asp  
 1 5 10 15

Asp Asp Phe Gln  
 20

65  
 <210> 81  
 <211> 20  
 <212> PRT



ES 2 332 798 T3

<400> 84

5           **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu His Pro Tyr Ile Pro Met Asp**  
               1                               5                               10                               15

**Asp Asp Phe Gln**  
   20

10

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

20

<400> 85

25           **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Glu Pro Tyr Ile Pro Met Asp**  
               1                               5                               10                               15

**Asp Asp Phe Gln**  
   20

30

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 86

45           **Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Phe Pro Tyr Ile Pro Met Asp**  
               1                               5                               10                               15

**Asp Asp Phe Gln**  
   20

50

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

60

<400> 87

**Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Cys Pro Tyr Ile Pro Met Asp**  
               1                               5                               10                               15

65

**Asp Asp Phe Gln**  
   20

## ES 2 332 798 T3

<210> 88

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <400> 88

**Asp Thr Asp Leu Asp Leu Glu Met Leu Leu Pro Tyr Ile Pro Met Asp**  
**1 5 10 15**

15

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

20 <210> 89

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <400> 89

**Asp Thr Asp Leu Asp Tyr Glu Met Ile Ala Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

35

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

40 <210> 90

<211> 20

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

50 <400> 90

**Asp Thr Asp Leu Asp Trp Glu Met Val Ser Pro Tyr Ile Pro Ala Asp**  
**1 5 10 15**

55

**Asp Asp Phe Gln**  
**20**

60 <210> 91

<211> 20

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

