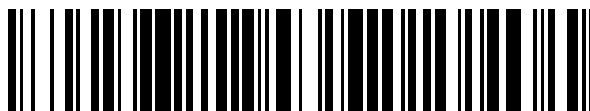


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 679**

51 Int. Cl.:
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06736983 .5**
96 Fecha de presentación: **03.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1853920**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Ensayos de polarización de fluorescencia para la actividad acetiltransferasa/desacetilasa**

30 Prioridad:
03.03.2005 US 658711 P
04.08.2005 US 705609 P
02.12.2005 US 741783 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2012

73 Titular/es:
SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC.
200 TECHNOLOGY SQUARE, SUITE 300
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:
MILNE, Jill y
CARNEY, David

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 380 679 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

Ensayos de polarización de fluorescencia para la actividad acetiltransferasa/desacetilasa

ANTECEDENTES

5 La acetilación y desacetilación de proteínas histonas, factores de transcripción y proteínas relacionadas desempeñan un papel importante en el control de los procesos celulares. En particular, el estado de acetilación de las histonas controla lo estrechamente que las proteínas histonas interactúan con el ADN, y por lo tanto lo accesible que es el ADN a los factores de transcripción. Las enzimas que añaden grupos acetilo a histonas u otras proteínas se denominan histona acetiltransferasas (HAT). Las enzimas que eliminan los grupos acetilo entran en dos familias: las histona desacetilasas (HDAC) y la familia de desacetilasas de Sir2. Actualmente, hay 11 miembros conocidos de la familia de HDAC de mamíferos (Gray y Ekstrom, Exper. Cell Res. 2001, 262, 75-83; Zhou, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 10572-10577; Kao *et al.* J. Biol. Chem. 2002, 277, 187-193; Gao *et al.* J. Biol. Chem. 2002, 277, 25748-25755) y 7 miembros de la familia de Sir2 (Gray y Ekstrom, Exper. Cell Res. 2001, 262, 75-83).

15 Las histona acetiltransferasas catalizan la transferencia de un grupo acetilo desde la acetil-CoA al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina en la proteína diana. Se han caracterizado muchas enzimas HAT a partir de organismos eucarióticos (Sterner y Berger, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000, 64, 435-459). Las enzimas HDAC utilizan un ión de cinc en el sitio activo de la proteína para catalizar la eliminación del grupo acetilo de la acetil-lisina en forma de acetato. Los miembros de la familia de Sir2 de enzimas usan NAD como cofactor en la hidrólisis de acetil-lisina.

20 El estado de acetilación de las proteínas histonas desempeña un papel importante en la expresión génica y el control del ciclo celular y parece desempeñar un papel en ciertas formas de cáncer. En particular, se ha mostrado que el agrupamiento anormal de histona desacetilasas por proteínas correpressoras promueve el desarrollo de leucemia promielocítica. En estirpes celulares tumorales, varios estudios han mostrado que el tratamiento con inhibidores de HDAC puede conducir a la inhibición del crecimiento, detención del crecimiento, diferenciación terminal y/o apoptosis. Los estudios *in vivo* han demostrado inhibición del crecimiento de tumores y reducción de la metástasis tumoral como resultado del tratamiento con inhibidores de HDAC (Kramer *et al.* Trends Endocrinol. Metab. 2001, 12, 294-300).

El estudio eficaz de la enzimología y modulación de enzimas HAT, HDAC y Sir2 depende de la disponibilidad de ensayos robustos que puedan efectuarse en formato de alto rendimiento. Se han desarrollado varias metodologías de ensayo para estas enzimas, con grados variables de utilidad para el cribado de inhibidores y activadores.

30 Los ensayos de histona acetiltransferasa están típicamente basados en la radiactividad. En estos formatos, se hace reaccionar acetil-CoA radiomarcada en el grupo acetilo con el péptido correspondiente a una secuencia aminoacídica de histona. Se cuantifica la transferencia del acetato radiomarcado al péptido mediante la unión del péptido a resina de afinidad (Ait-Si-Ali *et al.* Nucleic Acids Res. 1998, 26, 3869-3870), papel de fosfocelulosa (Tanner *et al.* J. Biol. Chem. 1999, 274, 18157-18160) o microplacas de centelleo (Wynne Aheme *et al.* Methods 2002, 26, 245-53) y la medida de la radiactividad asociada. En un formato de ensayo acoplado no radiactivo, la CoA libre formada en la reacción de acetiltransferasa sirve como sustrato para la α -cetoglutarato deshidrogenasa o la piruvato deshidrogenasa. La formación de NADH sirve como medida de la tasa de actividad acetiltransferasa (Kim *et al.* Anal. Biochem. 2000, 280, 308-314).

40 La metodología de ensayo de desacetilasa más común implica el marcaje de grupos de lisina en péptidos de histona con acetato radiomarcado. La enzima desacetilasa elimina el grupo acetilo como acetato, que se aísla posteriormente mediante extracción y se cuantifica basándose en su radiactividad (Inoue y Fujimoto, Biochim. Biophys. Acta 1970, 220, 307-316). En una variante de este enfoque, el ensayo de centelleo por proximidad, los péptidos derivatizados con grupos acetilo radiomarcados se unen a una perla que contiene agente de centelleo que emite luz tras exposición a radiación. En este formato de ensayo, la escisión de los grupos acetilo causa una reducción de la emisión de luz por el agente de centelleo (Nare, *et al.*, Anal. Biochem. 1999, 267, 390-396). Un ensayo no basado en radiactividad usa péptidos que contienen un grupo acetil-lisina y un marcador fluorescente. La reactividad se mide mediante cromatografía líquida de alta resolución, usando la diferencia en el tiempo de retención de los péptidos acetilado y no acetilado para aislar y cuantificar los productos de reacción (Hoffmann *et al.* Nucleic Acids Res. 1999, 27, 2057-8; Hoffmann *et al.* Bioconjug Chem. 2001, 12, 51-5; Hoffmann *et al.* Arch Pharm (Weinheim) 2001, 334, 248-52). Un ensayo comercial usa un protocolo de detección de dos etapas. En la primera etapa, se hace reaccionar un péptido que contiene acetil-lisina con una desacetilasa durante un periodo dado de tiempo. Después de ello, se inactiva la reacción, se hace reaccionar la lisina expuesta con un agente de revelado que produce un fluoróforo y se cuantifica la cantidad de lisina desacetilada usando la fluorescencia del producto (Biomol, Plymouth Meeting, Pa., EE.UU.). Más recientemente, se ha notificado un ensayo de dos etapas acoplado con proteasa en el que se diseñó un péptido que contenía un par donante/inactivador de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y una acetil-lisina. Después de dejar transcurrir la reacción de desacetilasa, se inactiva la reacción y se cuantifica la cantidad de péptido desacetilado mediante reacción del péptido desacetilado con una enzima proteasa que escinde específicamente después de residuos de lisina (Frey *et al.*, presentado en la 224ª reunión nacional de la American Chemical Society, Boston, Mass., agosto de 2002; artículo MEDI-121,

Marcotte *et al.*, *Anal. Biochem.*, 332: 90 (2004)). Hasta la fecha, no se han notificado ensayos de histona desacetilasa no radiactivos continuos.

El documento WO0214543 da a conocer un método de ensayo de la actividad desacetilasa/acetilasa usando un sustrato marcado con un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada. El sustrato se incuba con la acetilasa o desacetilasa. La actividad enzimática se detecta posteriormente, lo que puede efectuarse en un inmunoensayo de fluorescencia tal como un inmunoensayo de polarización de fluorescencia.

Wegener y colaboradores (*Analytical Biochemistry*, 2003, vol. 321, páginas 202-208) describen sustratos peptídicos fluorogénicos específicos de HDAC (histona desacetilasa) que comprenden un resto de lisina acetilada y un resto de 4-metilcumarin-7-amida adyacente en el extremo C de la cadena peptídica para uso en un ensayo de HDAC. Tras la desacetilación del resto lisilo, se reconocen las moléculas como sustratos de tripsina, que libera moléculas altamente fluorescentes para medir.

Marcotte y colaboradores (*Analytical Biochemistry*, 2004, vol. 332, páginas 90-99) describen un sustrato peptídico de desacetilasa que comprende un fluoróforo (6-TAMRA), al menos un residuo de lisina acetilada y QSY-7 como grupo inactivador no fluorescente. El péptido desacetilado se escinde fácilmente por tripsina, dando como resultado una potenciación de la fluorescencia de 6-TAMRA

Los rasgos de los formatos de ensayo anteriores limitan su utilidad. Los ensayos basados en radiactividad tienden a ser costosos, y requieren precauciones de manejo especiales. También son a menudo difíciles de efectuar en un formato de alto rendimiento. Por consiguiente, son necesarios ensayos mejorados para medir la actividad de acetiltransferasas o desacetilasas.

SUMARIO

Se proporcionan en la presente memoria métodos para determinar la actividad de enzimas que modulan la acetilación de un sustrato proteico, incluyendo acetiltransferasas y desacetilasas. Se proporcionan también métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa.

En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una desacetilasa que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada; (b) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada y (c) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativa de actividad desacetilasa.

En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un grupo voluminoso y al menos un residuo de lisina acetilada localizado entre el fluoróforo y el grupo voluminoso. El grupo voluminoso puede ser, por ejemplo, biotina, un complejo de biotina-avidina o un complejo de biotina-estreptavidina.

En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un sitio de unión, y dicho al menos un residuo de lisina acetilada está localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión. En dichas realizaciones, el método para determinar la actividad de una desacetilasa puede comprender adicionalmente poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un resto de unión que se une a dicho sitio de unión. En diversas realizaciones, los pares de sitio de unión/resto de unión pueden ser, por ejemplo, antígeno/anticuerpo, biotina/avidina, biotina/estreptavidina y una región Fc o una porción de la misma/proteína A o proteína G.

En ciertas realizaciones, la desacetilasa puede ser, por ejemplo, una histona desacetilasa (HDAC) o una sirtuina. En ciertas realizaciones, la sirtuina puede ser, por ejemplo, una proteína SIRT1.

En ciertas realizaciones, el reactivo que escinde el sustrato peptídico puede ser una proteasa tal como, por ejemplo, lisilendopeptidasa, endoproteinasa, Lys-C, plasmina, calpaína o tripsina.

En ciertas realizaciones, el fluoróforo puede ser MR121 o 5TMR.

En ciertas realizaciones, la secuencia del sustrato peptídico puede derivar de una histona, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o TAT de VIH, o un fragmento de las mismas.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula una desacetilasa que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada; (b) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada y (c) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el

valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la desacetilasa.

5 En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un grupo voluminoso, y dicho al menos un residuo de lisina acetilada se localiza entre el fluoróforo y el grupo voluminoso. El grupo voluminoso puede ser, por ejemplo, biotina, un complejo de biotina-avidina o un complejo de biotina-estreptavidina.

10 En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un sitio de unión, y dicho al menos un residuo de lisina acetilada está localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión. En dichas realizaciones, el método para identificar un compuesto que modula una desacetilasa puede comprender adicionalmente poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un resto de unión que se une a dicho sitio de unión. En diversas realizaciones, los pares de sitio de unión/resto de unión pueden ser, por ejemplo, antígeno/anticuerpo, biotina/avidina, biotina/estreptavidina y una región Fc o una porción de la misma/proteína A o proteína G.

15 En ciertas realizaciones, la desacetilasa puede ser, por ejemplo, una histona desacetilasa (HDAC) o una sirtuina. En ciertas realizaciones, la sirtuina puede ser, por ejemplo, una proteína SIRT1.

En ciertas realizaciones, el reactivo que escinde el sustrato peptídico puede ser una proteasa tal como, por ejemplo, lisilendopeptidasa, endoproteínasa, Lys-C, plasmina, calpaína o tripsina.

En ciertas realizaciones, el fluoróforo puede ser MR121 o 5TMR.

20 En ciertas realizaciones, la secuencia del sustrato peptídico puede derivar de una histona, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o Tat de VIH, o un fragmento de las mismas.

En ciertas realizaciones, se identifica un compuesto que aumenta la actividad de la desacetilasa. En dichas realizaciones, una reducción del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativa de un compuesto que aumenta la actividad de la desacetilasa.

25 En ciertas realizaciones, se identifica un compuesto que inhibe la actividad de la desacetilasa. En dichas realizaciones, un aumento en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que inhibe la actividad de la desacetilasa.

En ciertas realizaciones, el compuesto es una molécula pequeña.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una acetiltransferasa que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una acetiltransferasa, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina; (b) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada y (c) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un aumento en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativo de actividad acetiltransferasa.

35 En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un grupo voluminoso y al menos un residuo de lisina localizado entre el fluoróforo y el grupo voluminoso. El grupo voluminoso puede ser, por ejemplo, biotina, un complejo biotina-avidina o un complejo biotina-estreptavidina.

40 En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un sitio de unión y al menos un residuo de lisina localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión. En dichas realizaciones, el método para determinar la actividad de una acetiltransferasa puede comprender adicionalmente poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un resto de unión que se une a dicho sitio de unión. En diversas realizaciones, los pares de sitio de unión/resto de unión pueden ser, por ejemplo, antígeno/anticuerpo, biotina/avidina, biotina/estreptavidina y una región Fc o una porción de la misma/proteína A o proteína G.

En ciertas realizaciones, la acetiltransferasa puede ser, por ejemplo, Gcn5 o p300/CBP.

45 En ciertas realizaciones, el reactivo que escinde el sustrato peptídico puede ser una proteasa tal como, por ejemplo, lisilendopeptidasa, endoproteínasa, Lys-C, plasmina, calpaína o tripsina.

En ciertas realizaciones, el fluoróforo puede ser, por ejemplo, MR121 o 5TMR.

En ciertas realizaciones, la secuencia del sustrato peptídico puede derivar de una histona, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o Tat de VIH o un fragmento de las mismas.

- En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula una acetiltransferasa que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una acetiltransferasa en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión; (b) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde las moléculas del sustrato peptídico que tienen residuos de lisina no acetilada y (c) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la acetiltransferasa.
- En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un grupo voluminoso y al menos un residuo de lisina localizado entre el fluoróforo y el grupo voluminoso. El grupo voluminoso puede ser, por ejemplo, biotina, un complejo de biotina-avidina o un complejo de biotina-estreptavidina.
- En ciertas realizaciones, los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos pueden comprender adicionalmente un sitio de unión y al menos un residuo de lisina localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión. En dichas realizaciones, el método para identificar un compuesto que modula una acetiltransferasa puede comprender adicionalmente poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un resto de unión que se une a dicho sitio de unión. En diversas realizaciones, los pares de sitio de unión/resto de unión pueden ser, por ejemplo, antígeno/anticuerpo, biotina/avidina, biotina/estreptavidina y una región Fc o una porción de la misma/proteína A o proteína G.
- En ciertas realizaciones, la acetiltransferasa puede ser, por ejemplo, Gcn5 o p300/CBP.
- En ciertas realizaciones, el reactivo que escinde el sustrato peptídico puede ser una proteasa tal como, por ejemplo, lisilendopeptidasa, endoproteinasa, Lys-C, plasmina, calpaína o tripsina.
- En ciertas realizaciones, el fluoróforo puede ser, por ejemplo, MR121 o 5TMR.
- En ciertas realizaciones, la secuencia del sustrato peptídico puede derivar de una histona, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o Tat de VIH, o un fragmento de las mismas.
- En ciertas realizaciones, se identifica un compuesto que inhibe la actividad de la acetiltransferasa. En dichas realizaciones, una reducción en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos tras el contacto con la acetiltransferasa en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativa de un compuesto que inhibe la actividad de la acetiltransferasa.
- En ciertas realizaciones, se identifica un compuesto que aumenta la actividad de la acetiltransferasa. En dichas realizaciones, un aumento en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos tras el contacto con la acetiltransferasa en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que aumenta la actividad de la acetiltransferasa.
- En ciertas realizaciones, el compuesto es una molécula pequeña.
- En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación; (b) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión y (c) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativo de actividad de la enzima que modula la acetilación.
- En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación en presencia de un compuesto de ensayo; (b) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión y (c) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la enzima que modula la acetilación.
- La práctica de los presentes métodos empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades de la materia. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2ª Ed., ed. de Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); "DNA Cloning", volúmenes I y II (D.N. Glover ed., 1985); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.* patente de EE.UU. nº 4.683.195; "Nucleic Acid Hybridization" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); "Transcription And Translation" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); "Culture Of Animal Cells" (R.L. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); "Immobilized Cells And Enzymes"

(IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984); el tratado "Methods In Enzymology" (Academic Press, Inc., N.Y.); "Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells" (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); "Methods In Enzymology", Vol. 154 y 155 (Wuet *al.* eds.), "Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology" (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); "Handbook Of Experimental Immunology", volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); "Manipulating the Mouse Embryo", (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Definiciones

Como se usan en la presente memoria, los siguientes términos y frases tendrán los significados expuestos a continuación. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la materia.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto imponga claramente otra cosa.

Los términos "comprende" y "comprendiendo" se usan en el sentido inclusivo abierto, lo que significa que pueden incluirse elementos adicionales.

El término "residuo conservado" designa un aminoácido que es un miembro de un grupo de aminoácidos que tienen ciertas propiedades comunes. El término "sustitución aminoacídica conservativa" designa la sustitución (conceptual o de otro modo) de un aminoácido de uno de dichos grupos por un aminoácido diferente del mismo grupo. Un modo funcional de definir las propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios aminoacídicos entre las correspondientes proteínas de organismos homólogos (Schulz, G.E. y R.H. Schirmer., "Principles of Protein Structure", Springer-Verlag). Según dichos análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos en que los aminoácidos de un grupo se intercambian preferiblemente entre sí, y por lo tanto se parecen entre sí sobre todo en su impacto sobre la estructura global de la proteína (Schulz, G.E. y R.H. Schirmer, "Principles of Protein Structure", Springer-Verlag). Un ejemplo de una serie de grupos de aminoácidos definida de esta manera incluye: (i) un grupo de residuos cargados constituido por Glu y Asp, Lys, Arg y His, (ii) un grupo de residuos cargados positivamente constituido por Lys, Arg e His, (iii) un grupo de residuos cargados negativamente, constituido por Glu y Asp, (iv) un grupo de residuos aromáticos constituido por Phe, Tyr y Trp, (v) un grupo de residuos con anillo nitrogenado constituido por His y Trp, (vi) un grupo de residuos no polares alifáticos grandes constituido por Val, Leu e Ile, (vii) un grupo de residuos ligeramente polares constituido por Met y Cys, (viii) un grupo de residuos pequeños constituido por Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro, (ix) un grupo de residuos alifáticos constituido por Val, Leu, Ile, Met y Cys y (x) un grupo de residuos hidroxílicos pequeños constituido por Ser y Thr.

El término "incluye" se usa para indicar "incluye pero sin limitación". "Incluye" e "incluye pero sin limitación" se usan intercambiamente.

El término "mamífero" es conocido en la materia, y los mamíferos ejemplares incluyen seres humanos, primates, animales de granja (incluyendo bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (por ejemplo, caninos, felinos, etc.) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

El término "modula", cuando se usa con referencia a la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa, designa la regulación positiva (por ejemplo, activación o estimulación), regulación negativa (por ejemplo, inhibición o supresión) u otro cambio de la calidad de dicha actividad acetiltransferasa o desacetilasa.

El término "identidad porcentual" designa la identidad de secuencia entre dos secuencias aminoacídicas o entre dos secuencias nucleotídicas. La identidad puede determinarse cada vez comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo o similar residuo aminoacídico (por ejemplo, similar en la naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden designarse como homólogas (similares) en esa posición. La expresión de un porcentaje de homología, similitud o identidad designa una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Pueden usarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluyendo FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), y pueden usarse, por ejemplo, con los ajustes por defecto. ENTREZ está disponible en el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD. En una realización, la identidad porcentual de dos secuencias puede determinarse mediante el programa GCG con una ponderación de hueco de 1, por ejemplo, cada hueco aminoacídico se pondera como si fuera un desapareamiento aminoacídico o nucleotídico individual entre las dos secuencias.

Se describen otras técnicas de alineamiento en "Methods in Enzymology", vol. 266: "Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis" (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una filial de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE.UU.. Preferiblemente, se utiliza para alinear las secuencias un programa de alineamiento

que permita huecos en la secuencia. El Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en los alineamientos de secuencia. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También puede utilizarse el programa GAP, que usa el método de alineamiento de Needleman y Wunsch, para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa usa el software MPSRCH, que funciona en un ordenador MASPAR. El MPSRCH usa un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar las secuencias en un ordenador de procesamiento paralelo masivo. Este enfoque mejora la capacidad de captar coincidencias relacionadas lejanamente, y es especialmente tolerante con huecos pequeños y errores de la secuencia nucleotídica. Las secuencias aminoacídicas codificadas por ácidos nucleicos pueden usarse para buscar tanto en bases de datos de proteínas como de ADN.

El término “portador farmacéuticamente aceptable” está reconocido en la materia y destina un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar cualquier composición en cuestión o un componente de la misma. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con la composición en cuestión y sus componentes y de no ser dañino para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y celulosa acetato; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponación tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) disolución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tampón de fosfato y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El término “sustancialmente homólogo”, cuando se usa con relación a secuencias aminoacídicas, designa secuencias que son sustancialmente idénticas o similares en secuencia entre sí, dando lugar a una homología de conformación y por tanto a la retención en un grado útil de una o más actividades biológicas (incluyendo inmunológicas). No se pretende que el término implique una evolución común de las secuencias.

El término “sintético” está reconocido en la materia y designa la producción mediante síntesis química o enzimática *in vitro*.

El término “agente terapéutico” está reconocido en la materia y designa cualquier resto químico que sea una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúe local o sistémicamente en un sujeto. El término significa también cualquier sustancia pretendida para uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad o en la potenciación del desarrollo y/o condiciones físicas o mentales deseables en un animal o ser humano.

El término “efecto terapéutico” está reconocido en la materia y designa un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos, y más particularmente seres humanos, causado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” significa aquella cantidad de dicha sustancia que produce algún efecto local o sistémico deseado a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de dicha sustancia variará dependiendo del sujeto y de la afección patológica que se esté tratando, y del peso y edad del sujeto, la gravedad de la afección patológica, el modo de administración y similares, que pueden determinarse fácilmente por un especialista en la materia.

2. Ensayos de acetiltransferasa/desacetilasa

Se proporcionan en la presente memoria métodos para determinar la actividad de enzimas acetiltransferasa (acetilasa) y desacetilasa. Los métodos pueden implicar, por ejemplo, poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima acetiltransferasa o desacetilasa, escindir el conjunto de sustratos peptídicos y determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos. En otras realizaciones, la invención proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de la enzima acetiltransferasa o desacetilasa. Los métodos pueden implicar, por ejemplo, poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima acetiltransferasa o desacetilasa en presencia de un compuesto de ensayo, escindir el conjunto de sustratos peptídicos y determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos.

Se determina la actividad de una enzima acetiltransferasa (o acetilasa) usando los métodos descritos en la presente memoria. Una acetilasa es una enzima que cataliza una reacción mediante la cual se transfiere un grupo acetilo (CH₃CO-) desde una cierta sustancia (por ejemplo, acetil-CoA) hasta un péptido. Las acetilasas ejemplares incluyen, por ejemplo, miembros de la superfamilia GNAT (*N*-acetiltransferasa relacionada con Gcn5) tales como, por ejemplo, Hat1, Gcn5, PCAF, Eip3 y Hpa2; miembros de la familia MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60) tales como, por ejemplo, Sas2, Sas3, Esa1, MOF, Tip60, MOZ, MORF y HBO1; p300/CBP; coactivadores de receptor nuclear tales como, por ejemplo, SRC-1, ACTR, y TIF2; TAFII250; proteínas TFIIC tales como, por ejemplo, TFIIC220, TFIIC110 y TFIIC90. Pueden usarse también homólogos, por ejemplo, ortólogos y parálogos, dominios, fragmentos, variantes

y derivados de los anteriores según los métodos descritos en la presente memoria. Las acetilasas y sus sustratos se revisan, por ejemplo, en Sterner y Berger, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 453-459 (2000).

Se determina la actividad de una enzima desacetilasas usando los métodos descritos en la presente memoria. Una desacetilasa es una enzima que libera un grupo acetilo a partir de un péptido acetilado. Las enzimas desacetilasa ejemplares incluyen, por ejemplo, histona desacetilasas (HDAC) de clase I o II y HDAC de clase III (o sirtuinas). Las HDAC de clase I (HDAC 1, 2, 3 y 8) muestran similitud con la proteína RPD3 de levadura, están localizadas en el núcleo y se encuentran en complejos asociados con correpresores transcripcionales. Las HDAC de clase II (HDAC 4, 5, 6, 7 y 9) son similares a la proteína HDA1 de levadura, y tienen localización subcelular tanto nuclear como citoplasmática. Tanto las HDAC de clase I como II se inhiben por inhibidores de HDAC basados en ácido hidroxámico tales como SAHA. Las HDAC de clase III forman una clase estructuralmente lejana de enzimas dependientes de NAD que están relacionadas con las proteínas SIR2 de levadura y no se inhiben por inhibidores de HDAC basados en ácido hidroxámico.

Las enzimas HDAC ejemplares de clase I o II que pueden usarse según los métodos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, las HDAC 1-8 humanas, por ejemplo, HDAC-1 (nº de acceso a GenBank AAC50475 (nucleotídica), U50079 (aminoacídica)), HDAC-2 (nº de acceso a GenBank AAC50814 (nucleotídica), U31814 (aminoacídica)), HDAC-3 (nº de acceso a GenBank AAB88241 (nucleotídica), U75697 (aminoacídica)), HDAC-4 (nº de acceso a GenBank BAA22957 (nucleotídica), AB006626 (aminoacídica)), HDAC-5 (nº de acceso a GenBank BAA25526 (nucleotídica), AB011172 (aminoacídica)), HDAC-6 (nº de acceso a GenBank AAD29048 (nucleotídica), AJ011972 (aminoacídica)), HDAC-7 (nº de acceso a GenBank AAF63491.1 (nucleotídica), AF239243 (aminoacídica)) o HDAC-8 (nº de acceso a GenBank AAF73076.1 (nucleotídica), AF230097 (aminoacídica)), así como homólogos, por ejemplo, ortólogos y parálogos, dominios, fragmentos, variantes y derivados de las anteriores.

En otras realizaciones, una desacetilasa que puede usarse según los métodos descritos en la presente memoria es una proteína sirtuina. Una proteína sirtuina designa un miembro de la familia de proteínas desacetilasas sirtuinas, o preferiblemente la familia sir2, que incluye las proteínas Sir2 de levadura (nº de acceso a GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (nº de acceso a GenBank Nip_501912) y SIRT1 (nº de acceso a GenBank NM_012238 y NP_036370 (o AF083106)) y SIRT2 (nº de acceso a GenBank NM_012237, NM_030593, NP_036369, NP_085096 y AF083107) humanas. Otros miembros de la familia incluyen los cuatro genes de tipo Sir2 de levadura adicionales denominados "genes *HST*" (homólogos de Sir2) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los cinco otros homólogos humanos hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 y hSIRT7 (Brachmann *et al.* (1995) *Genes Dev.* 9:2888 y Frye *et al.* (1999) *BBRC* 260: 273). Pueden usarse también homólogos, por ejemplo, ortólogos y parálogos, dominios, fragmentos, variantes y derivados de las anteriores según los métodos descritos en la presente memoria.

En una realización ejemplar, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para determinar la actividad de una proteína SIRT1. Una proteína SIRT1 designa un miembro de la familia sir2 de desacetilasas sirtuinas. En una realización, una proteína SIRT1 incluye las proteínas Sir2 de levadura (nº de acceso a GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (nº de acceso a GenBank NP_501912), SIRT1 humana (nº de acceso a GenBank NM_012238 o NP_036370 (o AF083106)) y SIRT2 humana (nº de acceso a GenBank NM_012237, NM_030593, NP_036369, NP_085096 o AF083107), y equivalentes y fragmentos de las mismas. En otra realización, una proteína SIRT1 incluye un polipéptido que comprende una secuencia constituida, o constituida esencialmente, por la secuencia aminoacídica expuesta en los nº de acceso a GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 o P53685. Las proteínas SIRT1 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una porción de la secuencia aminoacídica expuesta en los nº de acceso a GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 o P53685; la secuencia aminoacídica expuesta en los nº de acceso a GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 o P53685, con 1 a aproximadamente 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones aminoacídicas conservativas; una secuencia aminoacídica que es al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la de los nº de acceso a GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 o P53685 y fragmentos funcionales de las mismas. Las proteínas SIRT1 incluyen también homólogos (por ejemplo, ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de los nº de acceso a GenBank NP_036370, NP_501912, NP_085096, NP_036369 o P53685.

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para determinar la actividad de una proteína SIRT3. Una proteína SIRT3 se refiere a un miembro de la familia de proteínas desacetilasas sirtuinas y/o a un homólogo de una proteína SIRT1. En una realización, una proteína SIRT3 incluye las proteínas SIRT3 humana (nº de acceso a GenBank AAH01042, NP_036371 o NP_001017524) y SIRT3 de ratón (nº de acceso a GenBank NP_071878), y equivalentes o fragmentos de las mismas. En otra realización, una proteína SIRT3 incluye un polipéptido que comprende una secuencia constituida, o constituida esencialmente, por la secuencia aminoacídica expuesta en los nº de acceso a GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 o NP_071878. Las proteínas SIRT3 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una porción de la secuencia aminoacídica expuesta en los nº de acceso a GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 o NP_071878; la secuencia aminoacídica expuesta en los nº de acceso a GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 o NP_071878, con 1 a aproximadamente 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones aminoacídicas conservativas; una secuencia aminoacídica que es al menos un 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los nº de acceso a GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 o NP_071878 y fragmentos funcionales de las mismas. Las

proteínas SIRT3 incluyen también homólogos (por ejemplo, ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de los nº de acceso a GenBank AAH01042, NP_036371, NP_001017524 o NP_071878.

En otra realización, puede usarse una porción biológicamente activa de una sirtuina según los métodos descritos en la presente memoria. Una porción biológicamente activa de una sirtuina designa una porción de una proteína sirtuina que tiene actividad biológica, tal como la capacidad de desacetilar. Las porciones biológicamente activas de las sirtuinas pueden comprender el dominio central de una sirtuina. Las porciones biológicamente activas de SIRT1 que tienen el nº de acceso a GenBank NP_036370 que comprenden el dominio de unión a NAD⁺ y el dominio de unión a sustrato pueden incluir, por ejemplo y sin limitación, los aminoácidos 62-293 del nº de acceso a GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 237 a 932 del nº de acceso a GenBank No. NM_012238. Por lo tanto, esta región se designa a veces como el dominio central. Otras porciones biológicamente activas de SIRT1, designadas a veces también como dominios centrales, incluyen aproximadamente los aminoácidos 261 a 447 del nº de acceso a GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 834 a 1394 del nº de acceso a GenBank NM_012238; aproximadamente los aminoácidos 242 a 493 del nº de acceso a GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 777 a 1532 del nº de acceso a GenBank NM_012238; o aproximadamente los aminoácidos 254 a 495 del nº de acceso a GenBank NP_036370, que están codificados por los nucleótidos 813 a 1538 del nº de acceso a GenBank NM_012238. En otra realización, una porción biológicamente activa de una sirtuina puede ser un fragmento de una proteína SIRT3 que se produce mediante escisión con una peptidasa procesadora de matriz mitocondrial (MPP) y/o una peptidasa intermedia mitocondrial (MIP).

Pueden usarse una amplia variedad de sustratos peptídicos según los métodos descritos en la presente memoria. Cuando se determina la actividad de una acetiltransferasa, el sustrato peptídico utilizado en la reacción comprende al menos un residuo de lisina no acetilada. Cuando se determina la actividad de una desacetilasa, el sustrato peptídico utilizado en la reacción comprende al menos un residuo de lisina acetilada.

La secuencia del sustrato peptídico puede obtenerse, o derivarse, a partir de una proteína que puede acetilarse o desacetilarse por una acetiltransferasa o desacetilasa, respectivamente. Los sustratos ejemplares para acetiltransferasas y desacetilasas incluyen, por ejemplo, histonas (por ejemplo, H1, H2, H2A, H2B, H3 y H4), proteínas de cromatina no histonas (por ejemplo, HMG1, HMG2, Sin1 de levadura, HMG14, HMG17 y HMG1(Y)), activadores transcripcionales (por ejemplo, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF y Tat de VIH), coactivadores de receptor nuclear (por ejemplo, ACTR, SRC-1, TIF2), factores de transcripción generales (por ejemplo, TFIIE y TFIIF), importina- α 7, Rch1 y α -tubulina. Los sustratos peptídicos usados según los métodos descritos en la presente memoria comprenden un sustrato proteico completo o una porción del mismo que contiene al menos un residuo de lisina. En ciertas realizaciones, puede ser deseable modificar la secuencia de un sustrato proteico, o un fragmento del mismo, para eliminar uno o más residuos de lisina y/o arginina. Por ejemplo, puede ser deseable tener un sustrato peptídico que comprenda residuos de lisina pero ningún otro residuo cargado positivamente (tal como arginina), de tal modo que tras la escisión con una proteasa tal como tripsina, la escisión del sustrato peptídico será dependiente del estado de acetilación de los residuos de lisina en el sustrato e independiente de los residuos de arginina. Adicionalmente, puede ser deseable tener un sustrato peptídico que contenga uno o más residuos de lisina localizados solo en localizaciones deseadas en el sustrato peptídico, por ejemplo, entre un fluoróforo y un grupo de alto peso molecular o voluminoso. En ciertas realizaciones, puede ser deseable tener un sustrato peptídico que contenga solo un único residuo de lisina y esté exento de residuos de arginina. En una realización ejemplar, puede estar localizado un residuo de lisina en el sustrato peptídico de tal modo que, tras la escisión del sustrato peptídico en o cerca del sitio del residuo de lisina, el diferencial de tamaño entre un sustrato peptídico no escindido y la porción de un sustrato peptídico escindido que contiene el fluoróforo sea suficiente para proporcionar un cambio de polarización de fluorescencia. Pueden eliminarse uno o más residuos de lisina y/o arginina de una secuencia de sustrato peptídico reemplazando el residuo aminoacídico por un residuo aminoacídico diferente o eliminando el residuo aminoacídico de la secuencia sin sustitución por un aminoácido diferente. En ciertas realizaciones, pueden reemplazarse uno o más residuos de lisina y/o arginina usando una sustitución aminoacídica conservativa en la que dicha sustitución no es lisina ni arginina.

Los sustratos peptídicos que pueden usarse según los métodos descritos en la presente memoria pueden sintetizarse según métodos convencionales. Los sustratos peptídicos pueden incluir péptidos de origen natural, péptidos preparados mediante técnicas de recombinación genética y péptidos sintéticos. Los péptidos pueden estar condensados con otros péptidos (por ejemplo, glutation-S-transferasa, marcador HA, marcador FLAG, etc.) por conveniencia de purificación, etc. Adicionalmente, el péptido puede comprender unidades estructurales distintas de aminoácidos a condición de que sirva como sustrato para una desacetilasa, o acetiltransferasa, y una proteasa. Típicamente, se consigue la síntesis de un péptido añadiendo aminoácidos, residuo a residuo, al extremo carboxilo de la secuencia aminoacídica de interés. Adicionalmente, algunos de los fragmentos peptídicos sintetizados de ese modo pueden estar ligados conjuntamente, formando una molécula peptídica mayor. Para medir la actividad desacetilasa, el sustrato peptídico tiene que estar acetilado antes de realizarse la reacción. Un método ejemplar de acetilación aminoacídica incluye la acetilación de aminoácidos cuyos grupos α -amino y amino de cadena lateral están bloqueados con grupos protectores, con anhídrido acético, acetato de *N*-hidroxisuccinimida o reactivos similares. Estos aminoácidos acetilados se usan entonces para sintetizar péptidos que comprenden residuos de lisina acetilada, por ejemplo, usando el método en fase sólida. Generalmente, los péptidos acetilados pueden sintetizarse usando un sintetizador peptídico según el método de Fmoc. Por ejemplo, los suministradores

comerciales, que proporcionan servicios de síntesis peptídica a medida, pueden sintetizar péptidos que tienen secuencias aminoacídicas específicas que comprenden residuos acetilados en posiciones predeterminadas.

5 El sustrato peptídico comprende también al menos un fluoróforo. Los fluoróforos ejemplares que pueden usarse según los métodos descritos en la presente memoria se proporcionan a continuación en la Tabla 1. Los métodos para marcar un péptido con un fluoróforo son conocidos en la materia y, por tanto, pueden realizarse según métodos convencionales. El fluoróforo puede estar ligado covalentemente o conjugado con el péptido para no interferir con la emisión de fluorescencia del marcaje, la acetilación o desacetilación del(de los) residuo(s) de lisina, o la escisión del sustrato peptídico con una proteasa.

Tabla 1. Fluoróforos disponibles comercialmente y sus máximos de excitación y emisión

Tinte	Excitación/emisión (nm)
AF 350	346/442
AF 430	433/539
AF 488	495/519
AF 532	532/554
AF 546	556/573
AF 568	578/603
AF 594	590/617
AF 633	632/647
AF 647	650/668
AF 660	663/690
AF 680	679/702
Dinitrofenilo	349/NA
AMCA	346/442
Azul de cascada	400/420
Azul marino	365/460
Fluoresceína/FITC	494/518
Verde de Oregón 488	496/524
Verde de rodamina	505/527
BODIPY FL	504/513
BODIPY TMR	535/574
BODIPY TR	588/617
Verde de Oregón 514	511/530
Rojo de rodamina	570/590
Tetrametilrodamina	555/580
Rojo de Tejas	595/615
BODIIPY 630/650	632/640
BODTPY 650/665	651/660
QSY7	560/NA
FluorX	494/520

Tinte	Excitación/emisión (nm)
Cy2 bis	489/506
Cy3 mono	550/570
Cy3.5 mono	581/596
Cy5 mono	649/670
Cy5.5 mono	675/694
Cy7 mono	743/767
DEAC	432/472
R6G	524/552
TAMRA	547/573
MR121	635/680

En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende adicionalmente un grupo de alto peso molecular o un grupo voluminoso. El grupo de alto peso molecular o grupo voluminoso está separado del fluoróforo por al menos un residuo de lisina. Cuando el residuo de lisina está en estado no acetilado, el sustrato peptídico es susceptible de escisión en o cerca del residuo de lisina por un reactivo de escisión tal como una proteasa. Cuando el residuo de lisina está en estado acetilado, el sustrato peptídico es resistente a la escisión y permanece intacto tras el contacto con un reactivo de escisión. Tras la escisión, se separa el fluoróforo del grupo de alto peso molecular o voluminoso, reduciendo así el valor de polarización fluorescente de la muestra.

La polarización de fluorescencia (PF) está basada en la teoría de que cuando una molécula marcada fluorescentemente se excita con luz polarizada en un plano de la longitud de onda correcta, emitirá luz polarizada después de su vida media de emisión característica (habitualmente nanosegundos). Durante el tiempo entre la excitación y la emisión (vida media de fluorescencia), la molécula gira aleatoriamente con respecto al plano de excitación original. La velocidad de giro es directamente proporcional a su volumen o tamaño molecular. Las moléculas pequeñas giran rápidamente, mientras que las moléculas grandes giran mucho más lentamente. Si la molécula gira rápidamente durante su vida media de fluorescencia, la emisión de fluorescencia se despolariza respecto a la excitación. Si el fluoróforo está asociado con una molécula mucho mayor, el giro es lento y la emisión observada permanece más polarizada respecto a la excitación. Por tanto, al medir la extensión de la polarización de fluorescencia, puede decirse si un fluoróforo está asociado con una molécula grande.

Una ventaja de la PF es que puede utilizarse en ensayos homogéneos y es por lo tanto útil para ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS en inglés). La PF es también apta para efectuar ensayos instantáneos, directamente en disolución y sin necesidad de una fase inmovilizada. Los valores de polarización pueden medirse repetidamente y después de la adición de reactivos, puesto que la medida de las muestras es rápida y no destruye la muestra.

El valor de polarización (P) para una molécula dada es proporcional al tiempo de relajación rotacional de la molécula, o a la cantidad de tiempo que le lleva a la molécula rotar alrededor de un ángulo de 68,5°. Cuanto menor sea el tiempo de correlación rotacional, más rápido rota la molécula y se observará menor polarización. Cuanto mayor sea el tiempo de correlación rotacional, más lentamente rota la molécula y se observará mayor polarización. El tiempo de relajación rotacional está relacionado con la viscosidad (η), la temperatura absoluta (T), el volumen molecular (V) y la constante de los gases (R). El tiempo de relajación rotacional se calcula generalmente según la siguiente fórmula:

$$\text{tiempo de relajación rotacional} = 3\eta V / RT$$

Como puede observarse de la ecuación anterior, si se mantienen constantes temperatura y viscosidad, entonces el tiempo de relación rotacional, y por lo tanto el valor de polarización, está directamente relacionado con el volumen molecular. Por consiguiente, cuanto mayor sea la molécula, mayor es su valor de polarización fluorescente, y a la inversa, cuanto menor sea la molécula, menor es su valor de polarización fluorescente.

En la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, el sustrato peptídico de partida tiene un bajo tiempo de correlación rotacional. El fluoróforo está unido con una porción del sustrato peptídico que, tras la escisión en el residuo de lisina, se libera y exhibe un tiempo de correlación rotacional relativamente rápido (por ejemplo, en comparación con el tiempo de correlación rotacional del sustrato peptídico no escindido). La escisión del sustrato peptídico es indirectamente proporcional al estado de acetilación del sustrato peptídico y directamente proporcional a la polarización de fluorescencia del sustrato peptídico. Por lo tanto, tras un aumento en la acetilación del sustrato

peptídico (por ejemplo, tras exposición a una acetiltransferasa), se reduce la escisión del sustrato peptídico y aumenta el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico (por ejemplo, el valor de rotación del fluoróforo permanece bajo debido a que está asociado con la molécula de sustrato peptídico mayor, aumentando así el tiempo de correlación rotacional). A la inversa, tras una reducción de la acetilación del sustrato peptídico (por ejemplo, tras exposición a una desacetilasa), aumenta la escisión del sustrato peptídico y se reduce el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico (por ejemplo, el valor de rotación del fluoróforo aumenta tras la liberación de la molécula de sustrato peptídico mayor, reduciendo por lo tanto el tiempo de correlación rotacional).

Generalmente, el nivel de polarización de fluorescencia se calcula usando la siguiente fórmula:

$$P = [I(II) - I(\perp)] / [I(II) + I(\perp)]$$

en la que $I(II)$ es la fluorescencia detectada en el plano paralelo a la luz de excitación y $I(\perp)$ es la fluorescencia detectada en el plano perpendicular a la luz de excitación.

Al efectuar ensayos de cribado, por ejemplo de inhibidores, potenciadores, agonistas o antagonistas potenciales de acetiltransferasas o desacetilasas, se compara el cambio de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico en presencia y ausencia de diferentes compuestos, para determinar si estos diferentes compuestos tienen algún efecto sobre las enzimas que se están examinando. En particular, en presencia de un inhibidor de acetiltransferasa, se reducirá la polarización de fluorescencia en comparación con un control, ya que estará no acetilada una mayor proporción del conjunto de sustratos peptídicos y por lo tanto puede escindirse en el residuo de lisina no acetilada, liberando el fluoróforo de la molécula de sustrato peptídico mayor. En presencia de un activador de acetiltransferasa, aumentará la polarización de fluorescencia en comparación con un control, ya que estará acetilada una mayor proporción del conjunto de sustratos peptídicos y por lo tanto no se escindirá, de modo que el fluoróforo permanece asociado con la molécula de sustrato peptídico mayor. En presencia de un inhibidor de desacetilasa, aumentará la polarización de fluorescencia en comparación con un control, ya que estará acetilada una mayor proporción del conjunto de sustratos peptídicos y por lo tanto no se escindirá, de modo que el fluoróforo permanece asociado con la molécula de sustrato peptídico mayor. Finalmente, en presencia de un activador de desacetilasa, se reducirá la polarización de fluorescencia en comparación con un control, ya que una mayor proporción del conjunto de sustratos peptídicos se volverá no acetilada y por lo tanto puede escindirse en el residuo de lisina no acetilada liberando el fluoróforo de la molécula de sustrato peptídico mayor.

La polarización de fluorescencia puede monitorizarse en cualquiera de sus tres diferentes estados: estado estacionario, estado transitorio o estado dinámico. En PF en estado transitorio, se irradia con la fuente de luz de excitación la muestra y se monitoriza la polarización de luz emitida encendiendo el tubo fotomultiplicador después de apagar la fuente de luz de excitación. Esto reduce la interferencia de dispersión de luz, ya que la fluorescencia dura más que la dispersión de luz, pero se pierde algo de intensidad de fluorescencia. En PF de estado estacionario, la monitorización de la luz de excitación y emisión es continua (concretamente, la fuente de excitación y el tubo fotomultiplicador están encendidos continuamente). Esto da como resultado la medida de un tiempo de giro medio durante el periodo de monitorización e incluye los efectos de la luz dispersada. La PF dinámica puede monitorizarse en el campo del tiempo o la frecuencia. Las técnicas de fluorescencia dinámica implican la determinación de la vida media de la molécula fluorescente en nanosegundos. La teoría de la monitorización de la fluorescencia dinámica se describe en "Principles of Fluorescence Spectroscopy" (Lakowicz, Plenum Press, 1983). Mientras que la PF en estado estacionario proporciona una media o "instantánea" de los fenómenos de fluorescencia, la PF dinámica permite observar las contribuciones individuales de los componentes fluorescentes del sistema que se está estudiando. El uso de estas tres técnicas de fluorescencia se describe en Kumke, *et al.* (1995. *Anal. Chem.* 67, 3945-3951) y Devlin, *et al.* (1993. *Clin. Chem.* 39, 1939-1943). La metodología para llevar a cabo la polarización de fluorescencia se expone en "Fluorescence Polarization. Technical Resource Guide", 3ª edición, disponible en PanVera Corporation, Madison, Wis., EE.UU.

Los grupos de alto peso molecular o grupos voluminosos que pueden usarse en asociación con el sustrato peptídico descrito en la presente memoria incluyen cualquiera que sea suficiente para permitir un diferencial en el valor de polarización de fluorescencia del fluoróforo cuando se asocia con el sustrato peptídico no escindido, en contraposición con cuando se ha escindido o liberado de la molécula de sustrato peptídico. Los ejemplos de grupos de alto peso molecular o grupos voluminosos incluyen, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc. En ciertas realizaciones, el grupo de alto peso molecular o voluminoso puede ser simplemente una porción del sustrato proteico mismo (por ejemplo, el residuo de lisina está colocado de tal modo que se libere una porción muy pequeña de una molécula de sustrato mayor tras la escisión). En ciertas realizaciones, el grupo de alto peso molecular o voluminoso puede estar unido covalentemente o unido no covalentemente con el sustrato peptídico. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico puede comprender un sitio de unión y el grupo de alto peso molecular o grupo voluminoso puede ser un resto de unión que está unido no covalentemente al sitio de unión. La asociación entre el sitio de unión y el resto de unión puede llevarse a cabo antes o después de la escisión del sustrato peptídico con un reactivo de escisión. Pueden usarse diversos pares de sitio de unión/resto de unión en asociación con las moléculas de sustrato peptídico tales como, por ejemplo, un complejo de biotina/avidina, un complejo de biotina/estreptavidina, una región Fc (o porción de la misma)/proteína A o proteína G, un antígeno (por ejemplo, una secuencia peptídica)/anticuerpo, una molécula de ligando/receptor, un aptámero/par de unión de aptámero, etc.

5 Cuando se usa un antígeno como sitio de unión, el antígeno puede ser una porción del sustrato peptídico mismo, o puede ser una secuencia que se añade, tal como glutation-S-transferasa (GST) o un marcador HA, myc o FLAG, con el fin de interactuar con un anticuerpo dado. Los métodos para producir anticuerpos son bien conocidos en la materia. Están comercialmente disponibles anticuerpos específicos de una variedad de secuencias, tales como por ejemplo marcadores GST, HA, Myc o FLAG.

Se muestran a continuación en la Tabla 2 sustratos peptídicos ejemplares de las desacetilasas Sirt1, Sirt2 y Sirt3 que pueden usarse según los métodos descritos en la presente memoria.

Tabla 2. Sustratos peptídicos de Sirt1, Sirt2 y Sirt3

Enzima/base de la secuencia peptídica	Secuencia	SEQ ID NO
Sirt1/p53	Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(MR121)-EE-NH ₂	SEQ ID NO: 1
Sirt1/p53	Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(5-TMR)-EE-NH ₂	SEQ ID NO: 2
Sirt1/PGC1 α	Biotina-TNPAIV-K(Ac)-TENS-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 3
Sirt1/PGC1 α	Biotina-TNPAIV-K(Ac)-TENS-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 4
Sirt1/PGC1 α	Biotina-QHLQA-K(Ac)-PTTLS-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 5
Sirt1/PGC1 α	Biotina-QHLQA-K(Ac)-PTTLS-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 6
Sirt2/ α -tubulina	Biotina-MPSD-K(Ac)-TIGG-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 7
Sirt2/ α -tubulina	Biotina-MPSD-K(Ac)-TIGG-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 8
Sirt2/ α -tubulina	Biotina-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 9
Sirt2/ α -tubulina	Biotina-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 10
Sirt2/ α -tubulina	Biotina-GQ-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 11
Sirt2/ α -tubulina	Biotina-GQ-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 12
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	Biotina-SG-K(Ac)-IM-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 13
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	Biotina-SG-K(Ac)-IM-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 14
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	Biotina-TSSG-K(Ac)-I-Nle-S-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 15
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	Biotina-TSSG-K(Ac)-I-Nle-S-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 16
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	Biotina-PSTSSG-K(Ac)-I-Nle-SS-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 17
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	Biotina-PSTSSG-K(Ac)-I-Nle-SS-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 18
Sirt3/histona H4	Biotina-SGSG-K(Ac)-GGG-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 19
Sirt3/histona H4	Biotina-SGSG-K(Ac)-GGG-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 20
Sirt3/histona H4	Biotina-GSGGA-K(Ac)-SHS-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 21
Sirt3/histona H4	Biotina-GSGGA-K(Ac)-SHS-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 22
Sirt3/histona H4	Biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(MR121)-NH ₂	SEQ ID NO: 23
Sirt3/histona H4	Biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(5-TMR)-NH ₂	SEQ ID NO: 24

10 La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa usando polarización de fluorescencia. El sustrato peptídico comprende un grupo voluminoso (o grupo de alto peso molecular) o un sitio de unión de un grupo voluminoso, un fluoróforo y una lisina (para uso como sustrato de una acetiltransferasa) o una lisina acetilada (para uso como sustrato de una desacetilasa) localizada entre el grupo voluminoso y el fluoróforo. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico puede tener la fórmula general X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇, en la que X₁ es 0-50 residuos aminoácidos, X₂ es un sitio de unión de un grupo

voluminoso o un grupo voluminoso, X₃ es 0-50 aminoácidos, X₄ es una lisina o una lisina acetilada, X₅ es 0-50 aminoácidos, X₆ es un aminoácido modificado con un fluoróforo, X₇ es 0-50 residuos aminoacídicos. En ciertas realizaciones, X₁, X₃, X₅ y/o X₇ son aminoácidos distintos de lisina o arginina. En ciertas realizaciones, el grupo voluminoso puede ser una secuencia aminoacídica, un sitio de unión de un grupo voluminoso, un residuo aminoacídico modificado con un grupo voluminoso o un aminoácido modificado con un sitio de unión de un grupo voluminoso. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico tiene la fórmula general X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇, en la que X₁ es 0-10, 0-5 o 0-2 aminoácidos, X₂ es un aminoácido modificado con un sitio de unión de un grupo voluminoso tal como biotina, X₃ es 1-20, 1-10 o 1-5 aminoácidos, X₄ es una lisina o una lisina acetilada, X₅ es 1-10, 1-5 o 2-5 aminoácidos, X₆ es un aminoácido modificado con un fluoróforo y X₇ es 0-10, 0-5 o 0-2 residuos aminoacídicos.

La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa usando polarización de fluorescencia, en el que la secuencia del sustrato peptídico puede estar basada en, o derivada de, cualquier sustrato de una enzima acetiltransferasa o desacetilasa. En realizaciones ejemplares, la secuencia del sustrato peptídico está basada en PGC1 α , α -tubulina, acetil-CoA sintetasa 2 o una histona tal como, por ejemplo, histona H4, o porciones de las mismas. En una realización, el sustrato peptídico está basado en una porción de p53 y comprende la secuencia aminoacídica EEX₁GQSTSSHSX₂X₃STEGX₄EE (SEQ ID NO: 25), en la que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es lisina o una lisina acetilada, X₃ es un aminoácido distinto de lisina o arginina y X₄ es un aminoácido modificado con un fluoróforo. En otra realización, el sustrato peptídico puede estar basado en una porción de PGC1 α y comprende la secuencia aminoacídica X₁NPAIVX₂TENSX₃ (SEQ ID NO: 26) o X₁HLQAX₂PTTLX₃ (SEQ ID NO: 27), en la que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es lisina o una lisina acetilada y X₃ es un aminoácido modificado con un fluoróforo. En una realización, el sustrato peptídico está basado en una porción de α -tubulina y comprende la secuencia aminoacídica X₁PSDX₂TIGGX₃ (SEQ ID NO: 28), en la que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es lisina o lisina acetilada y X₃ es un aminoácido modificado con un fluoróforo; o comprende la secuencia aminoacídica X₁QX₂PSDX₃TIGGX₄ (SEQ ID NO: 29), en la que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es un aminoácido distinto de lisina o arginina, X₃ es lisina o lisina acetilada y X₄ es un aminoácido modificado con un fluoróforo. En una realización, el sustrato peptídico está basado en una porción de acetil-CoA sintetasa 2 y comprende la secuencia aminoacídica X₁GX₂IMX₃ (SEQ ID NO: 30), en la que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es lisina o lisina acetilada y X₃ es un aminoácido modificado con un fluoróforo; o comprende la secuencia aminoacídica X₁SSGX₂IX₃SX₄ (SEQ ID NO: 31) o X₁STSSGX₂IX₃SSX₄ (SEQ ID NO: 32), en la que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es lisina o lisina acetilada, X₃ es un aminoácido distinto de lisina o arginina y X₄ es un aminoácido modificado con un fluoróforo. En una realización, el sustrato peptídico está basado en una porción de la histona H4 y comprende las secuencias aminoacídicas X₁GSGX₂GGSX₃ (SEQ ID NO: 33), X₁SGGAX₂SHSX₃ (SEQ ID NO: 34) o X₁ASSHSX₂V LX₃ (SEQ ID NO: 35), en las que X₁ es un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, X₂ es lisina o lisina acetilada y X₃ es un aminoácido modificado con un fluoróforo.

La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato comprende una o más de las SEQ ID NO: 1-24.

Los métodos descritos en la presente memoria utilizan un reactivo de escisión que escinde los sustratos peptídicos que contienen residuos de lisina no acetilada pero que no escindirán los sustratos peptídicos que contengan residuos de lisina acetilada. El reactivo de escisión puede ser un reactivo químico o enzimático. En una realización ejemplar, el reactivo de escisión es una proteasa tal como, por ejemplo, una proteasa que escinde en o cerca de un residuo de lisina. Las proteasas ejemplares incluían, por ejemplo, lisilendopeptidasa, endoproteinasa, Lys-C, plasmina, calpaína o tripsina.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se llevan a cabo en condiciones que permiten la acetilación o desacetilación del sustrato peptídico por una acetiltransferasa o desacetilasa, respectivamente.

En ciertas realizaciones, el conjunto de sustratos peptídicos comprende una pluralidad de copias de uno o más sustratos peptídicos. En una realización ejemplar, un conjunto de sustratos peptídicos comprende una pluralidad de copias del mismo sustrato peptídico. Dichos conjuntos de sustratos peptídicos pueden comprender el sustrato peptídico libre flotando en disolución o unido a una superficie sólida tal como una placa, perla, filtro, etc. Pueden usarse también combinaciones de moléculas de sustrato peptídico flotantes libres y ancladas según los métodos descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo en un solo recipiente de reacción sin necesidad de eliminar reactivos de la mezcla de reacción (por ejemplo, un ensayo homogéneo). En diversas realizaciones, los componentes de las reacciones descritas en la presente memoria pueden añadirse secuencial o simultáneamente. Por ejemplo, es posible añadir el reactivo de escisión simultánea o posteriormente a la exposición del sustrato peptídico a la acetiltransferasa o desacetilasa.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa. Los métodos pueden implicar comparar la actividad de una acetiltransferasa

o desacetilasa en presencia de un compuesto de ensayo con la actividad de la acetiltransferasa o desacetilasa en una reacción de control. La reacción de control puede ser simplemente una reacción duplicada en que el compuesto de ensayo no se incluye. Como alternativa, la reacción de control puede ser una reacción duplicada en presencia de un compuesto que tiene un efecto conocido sobre la actividad acetiltransferasa o desacetilasa (por ejemplo, un activador, inhibidor o un compuesto que no tenga efecto sobre la actividad enzimática).

Debido a la flexibilidad disponible en el diseño de sustratos peptídicos para los métodos basados en polarización de fluorescencia descritos en la presente memoria, es posible optimizar los sustratos peptídicos, proporcionando una Km aparente baja y permitiendo por tanto usar una menor concentración de sustrato con respecto a los métodos. La Tabla 3 mostrada a continuación proporciona los valores de Km de una variedad de sustratos peptídicos de sirtuina proporcionados según los métodos descritos en la presente memoria, en comparación con los valores de Km de varios ensayos de sirtuina publicados o disponibles comercialmente. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los sustratos peptídicos para uso según los métodos descritos en la presente memoria pueden optimizarse para proporcionar una Km aparente baja.

Tabla 3. Comparaciones de Km para diversos ensayos de sirtuina

Referencia	Ensayo	Enzima	Sustrato peptídico (*FL con marcador fluorescente)	Km del péptido (µM)	Km de NAD (µM)
Biomol (Fluor de Lys) ¹	Fluorescente	Sirt1	p53 (aa 379-382) *FL	64	558
	Fluorescente	Sirt2	p53 (aa 317-320) *FL	186	547
	Fluorescente	Sirt3	p53 (aa 317-320) *FL	32	2034
² Kaeberlein <i>et al.</i>	Liberación de nicotinamida	Sirt1	p53 (aa 368-386) sin FL	10,3	132,5
	Liberación de nicotinamida	Sirt1	p53 (aa 368-386) *FL	87,6	192
³ Marcotte <i>et al.</i>	FRET	Sirt1	p53 20-mero (aa 372-387) *FL	ND	90
	FRET	Sirt2	p53 20-mero (aa 372-387) *FL	ND	42
⁴ McDonagh <i>et al.</i>	Liberación de nicotinamida	Sirt1	p53 19-mero (aa 368-386) sin FL	10,3	133
Presente invención	Polarización fluorescente	Sirt1	SEQ ID NO: 2	7,8	464
Presente invención	Polarización fluorescente	Sirt2	SEQ ID NO: 9	50	37
Presente invención	Polarización fluorescente	Sirt3	SEQ ID NO: 23	ND	50
¹ Biomol (Fluor de Lys) como se describe en la bibliografía del producto para los kits SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-555), SIRT2 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-556), SIRT3 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-557) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA); ² Kaeberlein <i>et al.</i> , <i>JBC</i> , 280 (17), 17038, 2005; ³ Marcotte <i>et al.</i> , <i>Anal. Biochem.</i> , 332, 90, 2004; ⁴ McDonagh <i>et al.</i> , <i>Methods</i> , 36, 346, 2005.					

En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para cribar compuestos que modulan la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para identificar un compuesto de ensayo que reduce o aumenta la actividad acetilasa o desacetilasa en al menos aproximadamente un 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90% o 100% o más, respecto a en ausencia del compuesto de ensayo.

Los compuestos de ensayo pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la materia o pueden ser compuestos anteriormente desconocidos que tengan cualquier actividad farmacológica. Los compuestos pueden ser de origen natural o diseñados en laboratorio. Pueden aislarse de microorganismos, animales o plantas y pueden

producirse recombinantemente, o sintetizarse mediante métodos químicos conocidos en la materia. Si se desea, los compuestos de ensayo pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos métodos de colección combinatoria conocidos en la materia incluyendo, pero sin limitación, colecciones biológicas, colecciones en paralelo en formato espacialmente definido en fase sólida o en disolución, métodos de colecciones sintéticas que requieren deconvolución, el método de colección de "una perla-un compuesto" y métodos de colecciones sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de colecciones biológicas está limitado a colecciones polipeptídicas, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a polipéptidos, oligómeros no peptídicos o colecciones de compuestos de molécula pequeña. Véase Lam, Anticancer Drug Des. 12, 145, 1997.

Los métodos para la síntesis de colecciones moleculares son bien conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, DeWitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho *et al.*, Science 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed Engl. 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop *et al.*, J. Med Chem. 37, 1233, 1994). Las colecciones de compuestos pueden presentarse en disolución (véase, por ejemplo, Houghten, BioTechniques 13, 412-421, 1992) o sobre perlas (Lam, Nature 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, Nature 364, 555-556, 1993), bacterias o esporas (Ladner, patente de EE.UU. nº 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1865-1869, 1992) o fagos (Scott y Smith, Science 249, 386-390, 1990; Devlin, Science 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 6378-6382, 1990; Felici, J. Mol. Biol. 222, 301-310, 1991 y Ladner, patente de EE.UU. nº 5.223.409).

Puede cribarse en los compuestos la capacidad de modular la actividad acetiltransferasa o desacetilasa usando cribado de alto rendimiento. Usando cribado de alto rendimiento, pueden ensayarse muchos compuestos discretos en paralelo de modo que pueden cribarse rápidamente un gran número de compuestos de ensayo. Las técnicas más ampliamente establecidas utilizan placas de microvaloración de 96 pocillos. Además de las placas, están comercialmente disponibles muchos instrumentos, materiales, pipeteadores, robots, lavadores de placas y lectores de placas que se ajustan al formato de 96 pocillos.

Como alternativa, pueden usarse ensayos de formato libre o ensayos que no tienen una barrera física entre las muestras. Se describen ensayos que implican formatos libres, por ejemplo, en Jayawickreme *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614-18 (1994); Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," notificado en la First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening en Filadelfia, Pa. (7-10 de nov., 1995) y Salmon *et al.*, Molecular Diversity 2, 57-63 (1996). Se describe otro método de cribado de alto rendimiento en Beutel *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.976.813.

Los compuestos que activan o inhiben la actividad acetiltransferasa o desacetilasa, que pueden seleccionarse según el método de cribado de la presente invención, son útiles como compuestos candidatos a sustancias antimicrobianas, agentes anticancerosos y una variedad de otros usos. Por ejemplo, los compuestos que activan una proteína desacetilasa sirtuina pueden ser útiles para aumentar la vida media de una célula y para tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos incluyendo, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, neuropatía inducida por quimioterapia, neuropatía asociada con un evento isquémico, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedades cardiovasculares, trastornos de la coagulación sanguínea, inflamación y/o eritema, etc. En otras realizaciones, los inhibidores de desacetilasa sirtuina pueden ser útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas incluyendo, por ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés, aumentar la apoptosis, el tratamiento del cáncer, la estimulación del apetito y/o la estimulación de la ganancia de peso, etc.

La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una sirtuina usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en la que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina. En diversas realizaciones, el fluoróforo puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico es un sustrato de SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo.

La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una sirtuina usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en la que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina. En diversas realizaciones, el fluoróforo puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica biotina-GASSHSK(Ac)-VL-K(MR121)-NH₂ (SEQ ID NO: 23) o biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(5-TMR)-NH₂ (SEQ ID NO: 24). En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico es un sustrato de SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo.

La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una sirtuina usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en la que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina. En diversas realizaciones, el fluoróforo puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEG-K(MR121)-

EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1) o Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(5-TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico es un sustrato de SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en la lisina N-terminal con biotina y en la lisina C-terminal con el fluoróforo.

5 La invención describe un sustrato peptídico que determina la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato peptídico comprende un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, un fluoróforo y una lisina o lisina acetilada localizada entre el grupo voluminoso, o el sitio de unión de un grupo voluminoso, y el fluoróforo, con la condición de que el sustrato peptídico no comprenda (a) la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en la que el sustrato peptídico de SEQ ID NO: 36 está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en la que el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo; (c) la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en la que el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con MR121 y/o (d) la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en la que el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con 5TMR.

15 La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato peptídico comprende un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, un fluoróforo y una lisina o lisina acetilada localizada entre el grupo voluminoso, o el sitio de unión de un grupo voluminoso, y el fluoróforo, con la condición de que el sustrato peptídico no comprenda (a) la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en la que el sustrato peptídico de SEQ ID NO: 37 está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) la secuencia aminoacídica biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(MR121)-NH₂ (SEQ ID NO: 23) y/o (c) la secuencia aminoacídica biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(5-TMR)-NH₂ (SEQ ID NO: 24).

25 La invención describe un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una acetiltransferasa o desacetilasa usando polarización de fluorescencia, en el que el sustrato peptídico comprende un grupo voluminoso o un sitio de unión de un grupo voluminoso, un fluoróforo y una lisina o lisina acetilada localizada entre el grupo voluminoso, o el sitio de unión de un grupo voluminoso, y el fluoróforo, con la condición de que el sustrato peptídico no comprenda (a) la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en la que el sustrato peptídico de SEQ ID NO: 38 está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) la secuencia aminoacídica Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(MR121)-EENH₂ (SEQ ID NO: 1) y/o (c) la secuencia aminoacídica Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(5-TMR)-EENH₂ (SEQ ID NO: 2).

35 La invención describe un método para determinar la actividad de una proteína sirtuina que comprende: (a) exponer un sustrato peptídico a una proteína sirtuina, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) escindir el sustrato peptídico con tripsina y (c) observar el valor de polarización de fluorescencia, en el que una reducción del valor de la polarización de fluorescencia del sustrato peptídico es indicativa de actividad sirtuina. En ciertas realizaciones, el fluoróforo del sustrato peptídico puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, la proteína sirtuina es una proteína SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto el sustrato peptídico con estreptavidina.

40 En una realización, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una proteína sirtuina que comprende: (a) exponer un sustrato peptídico a una proteína sirtuina, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) escindir el sustrato peptídico con tripsina y (c) observar el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico, en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico es indicativa de actividad sirtuina. En ciertas realizaciones, el fluoróforo del sustrato peptídico puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(NM121)-NH₂ (SEQ ID NO: 23) o biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(5-TMR)-NH₂ (SEQ ID NO: 24). En ciertas realizaciones, la proteína sirtuina es una proteína SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto el sustrato peptídico con estreptavidina.

55 En una realización, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una proteína sirtuina que comprende: (a) exponer un sustrato peptídico a una proteína sirtuina, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) escindir el sustrato peptídico con tripsina y (c) observar el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico, en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia es indicativa de actividad sirtuina. En ciertas realizaciones, el fluoróforo del sustrato peptídico puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(MR121)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1) o Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(5-TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, la proteína sirtuina es una proteína SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo. En

ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto el sustrato peptídico con estreptavidina.

En una realización, la invención proporciona un método para identificar un modulador de una proteína sirtuina que comprende: (a) exponer un sustrato peptídico a una proteína sirtuina en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) escindir el sustrato peptídico con tripsina y (c) observar el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico, en el que un cambio del valor de polarización de fluorescencia en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad sirtuina. En ciertas realizaciones, el fluoróforo del sustrato peptídico puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, la proteína sirtuina es una proteína SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto el sustrato peptídico con estreptavidina.

En una realización, la invención proporciona un método para identificar un modulador de una proteína sirtuina que comprende: (a) exponer un sustrato peptídico a una proteína sirtuina en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) escindir el sustrato peptídico con tripsina y (c) observar el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad sirtuina. En ciertas realizaciones, el fluoróforo del sustrato peptídico puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(MR121)-NH₂ (SEQ ID NO: 23) o biotina-GASSHS-K(Ac)-VL-K(5-TMR)-NH₂ (SEQ ID NO: 24). En ciertas realizaciones, la proteína sirtuina es una proteína SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto el sustrato peptídico con estreptavidina.

En una realización, la invención proporciona un método para identificar un modulador de una proteína sirtuina que comprende: (a) exponer un sustrato peptídico a una proteína sirtuina en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) escindir el sustrato peptídico con tripsina y (c) observar el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del sustrato peptídico en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad sirtuina. En ciertas realizaciones, el fluoróforo del sustrato peptídico puede ser MR121 o 5TMR. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSH-K(Ac)-Nle-STEG-K(MR121)-EENH₂ (SEQ ID NO: 1) o Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSH-K(Ac)-Nle-STEG-K(5-TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2). En ciertas realizaciones, la proteína sirtuina es una proteína SIRT1 o SIRT3. En ciertas realizaciones, el sustrato peptídico está marcado en el extremo N con biotina y en el extremo C con el fluoróforo. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente poner en contacto el sustrato peptídico con estreptavidina.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una desacetilasa que comprende: (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativa de actividad desacetilasa, con la condición de que (a) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en el que dicho sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en el que dicho sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina; (c) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en el que dicho sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (d) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende una o más de las siguientes: SEQ ID NO: 1, 2, 23 o 24.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una desacetilasa que comprende: (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativa de actividad desacetilasa, con la condición de que (a) la desacetilasa no sea una proteína sirtuina, (b) la desacetilasa no sea SIRT2 humana, (c) la desacetilasa no sea

- una proteína SIRT1, (d) la desacetilasa no sea SIRT3 humana, (e) la desacetilasa no sea una proteína SIRT3, (f) la desacetilasa no sea una proteína SIRT1 o SIRT3, (g) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1), (h) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2), (i) el sustrato peptídico no sea biotina-GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEQ ID NO: 23), (j) el sustrato peptídico no sea GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina, (k) el sustrato peptídico no sea GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (l) el sustrato peptídico no sea EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina.
- 5
- 10 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula una desacetilasa que comprende: (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un compuesto que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de
- 15 lisina no acetilada y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la desacetilasa, con la condición de que (a) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (c) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la
- 20 proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38) y está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (d) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende una o más de las siguientes: SEQ ID NO: 1, 2, 23 o 24.
- 25
- 30 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que modula una desacetilasa que comprende: (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un compuesto que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de
- 35 lisina no acetilada y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la desacetilasa, con la condición de que (a) la desacetilasa no sea una proteína sirtuina, (b) la desacetilasa no sea SIRT1 humana, (c) la desacetilasa no sea una proteína SIRT1, (d) la desacetilasa no sea SIRT3 humana, (e) la desacetilasa no sea una proteína SIRT3, (f) la desacetilasa no sea una proteína SIRT1 o SIRT3, (g) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1), (h) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2), (i) el sustrato peptídico no sea biotina-GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEQ ID NO: 23), (j) el sustrato peptídico no sea GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y
- 40 biotina, (k) el sustrato peptídico no sea GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (l) el sustrato peptídico no sea EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina.
- 45
- 50 En una realización, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico que comprende (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización del conjunto de sustratos peptídicos es indicativo de actividad de la enzima que modula la acetilación, con la condición de que (a) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en el que dicho sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en el que dicho sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina; (c) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende la
- 55 secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en el que dicho sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (d) el método no comprenda determinar la actividad de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico que comprende una o más de las siguientes: SEQ ID NO: 1, 2, 23, o 24.
- 60

En una realización, la invención proporciona un método para determinar la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico que comprende (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativo de actividad de la enzima que modula la acetilación, con la condición de que (a) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína sirtuina, (b) la enzima que modula la acetilación no sea SIRT1 humana, (c) la enzima que modula la acetilación no sea SIRT1 humana, (e) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína SIRT3, (f) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína SIRT1 o SIRT3, (g) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1), (h) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2), (i) el sustrato peptídico no sea biotina-GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEQ ID NO: 23), (j) el sustrato peptídico no sea GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina, (k) el sustrato peptídico no sea GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (l) el sustrato peptídico no sea EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina.

Un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico comprende (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación en presencia de un compuesto de ensayo, (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la enzima que modula la acetilación, con la condición de que (a) el método no comprenda la identificación de un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (b) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37) y está marcado con un fluoróforo y biotina; (c) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende la secuencia aminoacídica EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38) y está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (d) el método no comprenda identificar un modulador de una proteína sirtuina exponiendo la proteína sirtuina a un sustrato peptídico en presencia de un compuesto de ensayo, en el que el sustrato peptídico comprende una o más de las siguientes: SEQ ID NO: 1, 2, 23 o 24.

Un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico comprende (i) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación en presencia de un compuesto de ensayo; (ii) poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión y (iii) determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos, en el que un cambio del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la enzima que modula la acetilación, con la condición de que (a) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína sirtuina, (b) la enzima que modula la acetilación no sea SIRT1 humana, (c) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína SIRT1, (d) la enzima que modula la acetilación no sea SIRT3 humana, (e) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína SIRT3, (f) la enzima que modula la acetilación no sea una proteína SIRT1 o SIRT3, (g) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EB-NH₂ (SEQ ID NO: 1), (h) el sustrato peptídico no sea Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2), (i) el sustrato peptídico no sea biotina-GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEQ ID NO: 23), (j) el sustrato peptídico no sea GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEQ ID NO: 36), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina, (k) el sustrato peptídico no sea GASSHSK(Ac)VLK (SEQ ID NO: 37), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina y/o (l) el sustrato peptídico no sea EEKGQSTSSHSK(Ac)NleSTEGKEE (SEQ ID NO: 38), en el que el sustrato peptídico está marcado con un fluoróforo y biotina.

EJEMPLIFICACIÓN

Al describirse ahora en general la invención, se entenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente con fines de ilustración de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención.

55 **EJEMPLO 1: Identificación de moduladores de sirtuina usando SIRT1**

Se usó un ensayo basado en la polarización de fluorescencia para identificar moduladores de la actividad SIRT1. Puede usarse el mismo ensayo para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuina. Los ensayos de polarización de fluorescencia utilizan uno de dos péptidos diferentes basados en un fragmento de p53, una diana de desacetilación de sirtuina conocida. Se ensayaron los compuestos usando un sustrato que contiene un péptido 1 que tiene 20 residuos aminoacídicos como sigue: Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 1), en el que K(biotina) es un residuo de lisina biotinilada, K(Ac) es un residuo de lisina acetilada, Nle

es norleucina y K(MR121) es un residuo de lisina modificada por un fluoróforo MR121. Este péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/emisión 680 nm) en el extremo C y con biotina en el extremo N. La secuencia de los sustratos peptídicos está basada en p53 con varias modificaciones. En particular, se han reemplazado todos los residuos de arginina y leucina distintos de los residuos de lisina acetilada por serina, de modo que los péptidos no son susceptibles de escisión por tripsina en ausencia de desacetilación. Además, los residuos de metionina presentes naturalmente en las secuencias se han reemplazado por norleucina debido a que la metionina puede ser susceptible de oxidación durante la síntesis y purificación. Como sustrato alternativo en el ensayo, se ha usado también el siguiente péptido 2: Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHAK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en el que K(Ac) es un residuo de lisina acetilada y Nle es norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación 540 nm/emisión 580 nm) en el extremo C. La secuencia del sustrato peptídico está también basada en p53 con varias modificaciones. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia se reemplazó por norleucina debido a que la metionina puede ser susceptible de oxidación durante la síntesis y purificación.

Se expusieron los sustratos peptídicos a una proteína sirtuina en presencia de NAD⁺ para permitir la desacetilación del sustrato y volverlo sensible a la escisión por tripsina. Se añadió entonces tripsina y se llevó a término la reacción (concretamente, se escinde el sustrato desacetilado) liberando el fragmento MR121 o 5TMR. Se añade entonces estreptavidina a la reacción, donde puede unirse tanto al sustrato no escindido (concretamente, cualquier sustrato acetilado restante) como a la porción no fluorescente del sustrato peptídico escindido (concretamente, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización de fluorescencia observada para los sustratos peptídicos completos unidos a estreptavidina era mayor que la señal de polarización de fluorescencia observada para el fragmento C-terminal MR121 o 5TMR liberado. De este modo, la polarización de fluorescencia obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (por ejemplo, la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína sirtuina). Se leyeron los resultados en un lector de polarización de fluorescencia en microplaca (Molecular Devices Spectramax MD) con los filtros de excitación y emisión apropiados.

Se realizan los ensayos de polarización de fluorescencia usando el péptido 1 como sigue: se incuban sustrato peptídico 0,5 μ M y β NAD⁺ 150 μ M con SIRT1 0,1 μ g/ml durante 60 minutos a 37°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 25 mM, pH 8, Na-Ac 137 mM, K-Ac 2,7 mM, Mg-Ac 1 mM, 0,05% de Tween-20, 0,1% de Pluronic F127, CaCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, 0,025% de BSA, nicotinamida 0,15 mM). Se disolvieron los compuestos de ensayo 1-18 en DMSO y se añadieron a la reacción a 11 concentraciones en el intervalo de 0,7 μ M a 100 μ M.

Se realizan los ensayos de polarización de fluorescencia usando el péptido 2 como sigue: se incubaron sustrato peptídico 0,5 μ M y β NAD⁺ 120 μ M con SIRT1 3 nM durante 20 minutos a 25°C en tampón de reacción (Tris-acetato 25 mM, pH 8, Na-Ac 137 mM, K-Ac 2,7 mM, Mg-Ac 1 mM, 0,05% de Tween-20, 0,1% de Pluronic F127, CaCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, 0,025% de BSA). Se disolvieron los compuestos de ensayo 19-56 en DMSO y se añadieron a la reacción a 10 concentraciones en el intervalo de 300 μ M a 0,15 μ M en diluciones triples.

Después de incubación con SIRT1, se añadió nicotinamida a la reacción hasta una concentración final 3 mM para detener la reacción de desacetilación y se añadió tripsina 0,5 μ g/ml para escindir el sustrato desacetilado. Se incubó la reacción durante 30 minutos a 37°C en presencia de estreptavidina 1 μ M. Se determinó la polarización fluorescente a las longitudes de onda de excitación (650 nm) y emisión (680 nm). Se determina entonces el nivel de actividad de la proteína sirtuina en presencia de diversas concentraciones de compuesto de ensayo, y puede compararse con el nivel de actividad de proteína sirtuina en ausencia del compuesto de ensayo y/o el nivel de actividad de proteínas sirtuinas en el control negativo (por ejemplo, el nivel de inhibición) y el control positivo (por ejemplo, el nivel de activación) descritos a continuación.

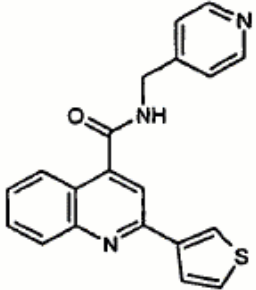
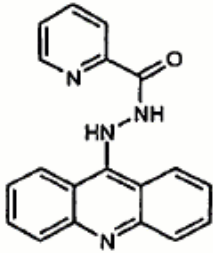
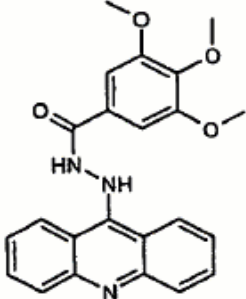
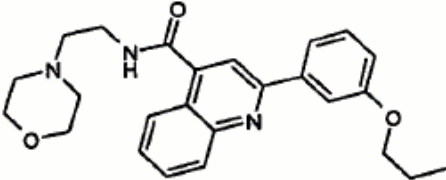
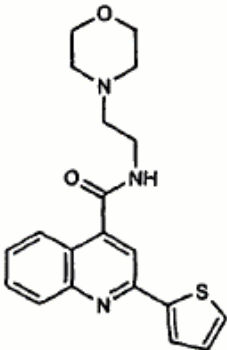
Para los ensayos de polarización de fluorescencia, se realiza un control de la inhibición de la actividad sirtuina añadiendo 1 μ l de nicotinamida 500 mM como control negativo al inicio de la reacción (por ejemplo, permite la determinación de la inhibición máxima de sirtuina). Se realizó un control de la activación de la actividad sirtuina usando proteína sirtuina 3 nM, con 1 μ l de DMSO en lugar de compuesto, para conseguir la desacetilación de base del sustrato (por ejemplo, para determinar la actividad sirtuina normalizada).

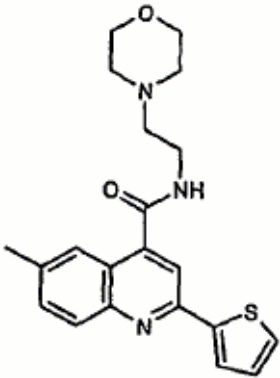
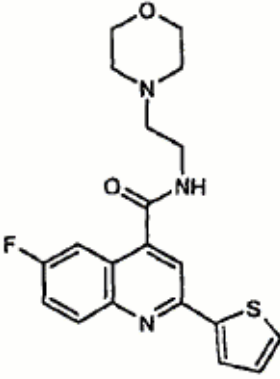
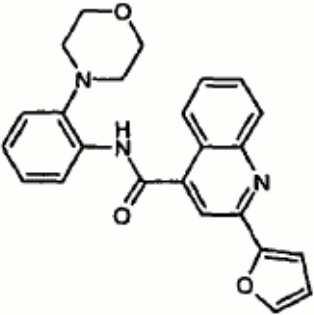
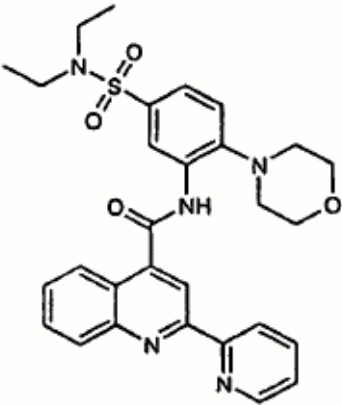
Para cada uno de los ensayos anteriores, se expresó y purificó la proteína SIRT1 como sigue. Se clonó el gen SirT1 en un vector que contiene el promotor T7 y se transformó en BL21 (DE3). Se expresó la proteína mediante inducción con IPTG 1 mM como proteína de fusión con marcador His N-terminal a 18°C durante una noche y se recogió a 30.000 x g. Se lisaron las células con lisozima en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, tris-[2-carboxietil]fosfina (TCEP) 2 mM, ZnCl₂ 10 μ M, NaCl 200 mM) y se trataron adicionalmente con sonicación durante 10 min para completar la lisis. Se purificó la proteína sobre una columna de Ni-NTA (Amersham) y se combinaron las fracciones que contenían proteína pura, se concentraron y se procesaron por una columna de exclusión molecular (Sephadex S200 26/60 global). Se recogió el pico que contenía la proteína soluble y se procesó en una columna de intercambio iónico (MonoQ). La elución en gradiente (NaCl 200 mM-500 mM) proporcionó proteína pura. Se concentró esta proteína y se dializó frente a tampón de diálisis (Tris-HCl 20 mM, TCEP 2 mM) durante una noche. Se tomaron alícuotas de la proteína y se congelaron a -80°C hasta su uso posterior.

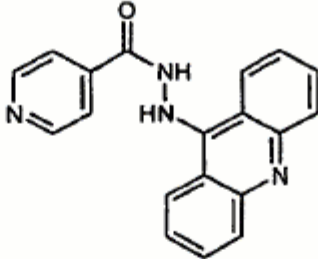
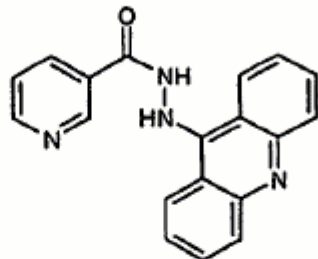
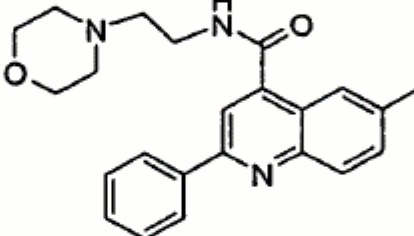
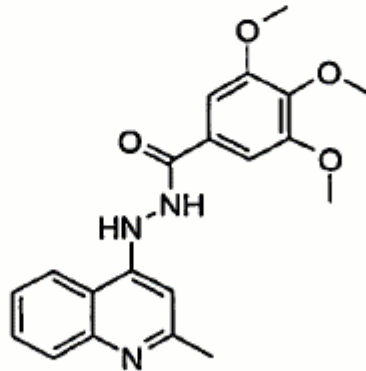
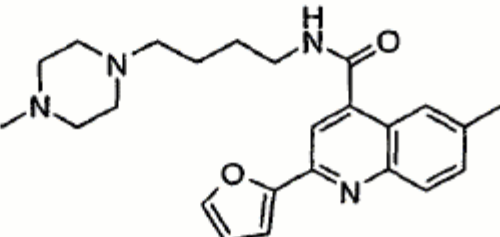
Se identificaron los compuestos moduladores de sirtuina que activaban SIRT1 usando el ensayo descrito anteriormente y se muestran a continuación en la Tabla 4. Se identificaron los compuestos moduladores de sirtuina

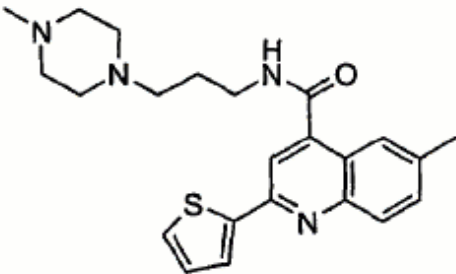
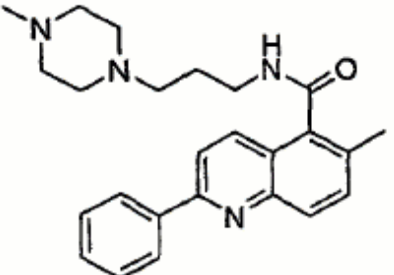
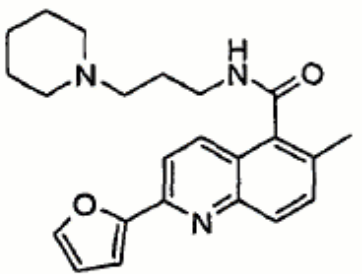
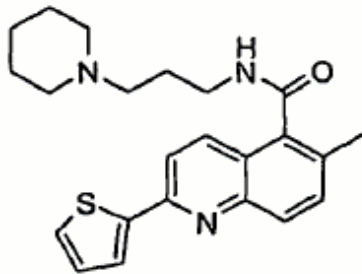
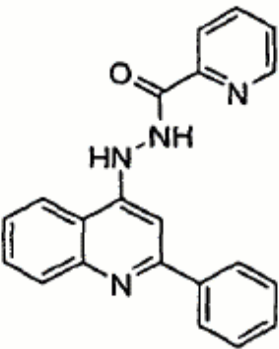
5 que inhibían SIRT1 usando el ensayo descrito anteriormente y se muestran a continuación en la Tabla 5. Se representan los valores de DE_{50} para los compuestos activadores por A ($DE_{50} \leq 50 \mu\text{M}$), B ($DE_{50} = 51-100 \mu\text{M}$), C ($DE_{50} = 101-150 \mu\text{M}$) y D ($DE_{50} \geq 150 \mu\text{M}$). NT denota compuestos que no se ensayaron, a menudo debido a problemas de solubilidad. La DE_{50} del resveratrol para activación de SIRT1 es $16 \mu\text{M}$. De forma similar, se representan los valores de CI_{50} para los compuestos inhibidores por A ($CI_{50} \leq 50 \mu\text{M}$), B ($CI_{50} = 51-100 \mu\text{M}$), C ($CI_{50} = 101-150 \mu\text{M}$) y D ($CI_{50} \geq 150 \mu\text{M}$).

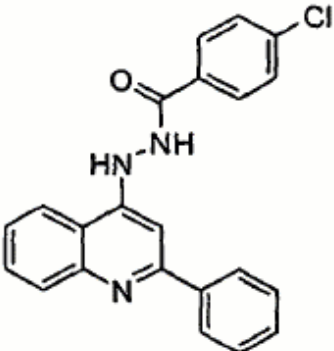
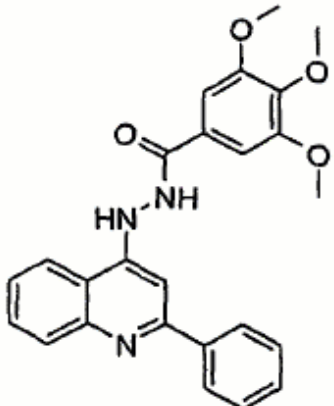
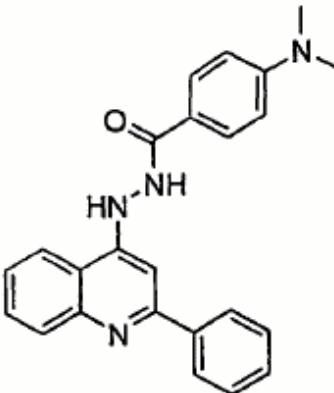
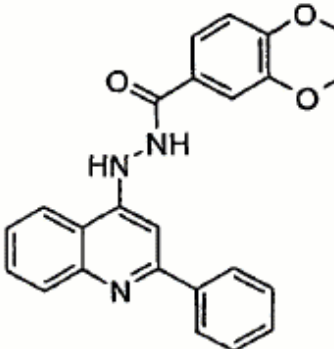
Tabla 4.

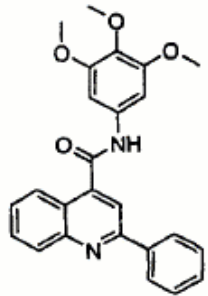
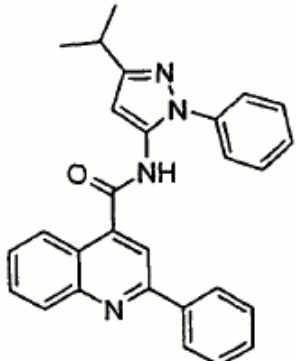
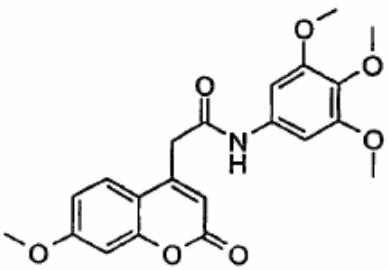
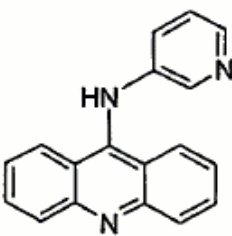
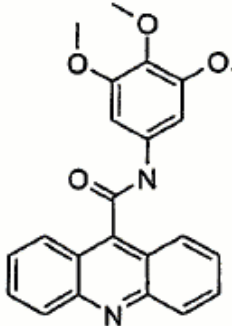
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
1		A
2		B
3		A
4		D
5		C

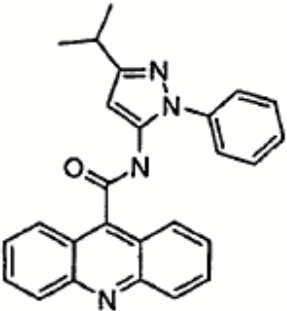
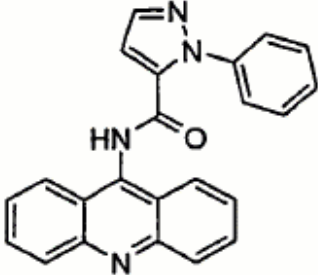
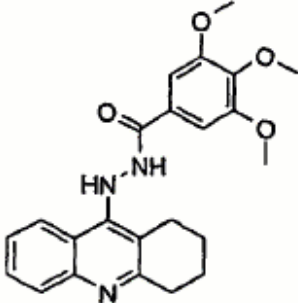
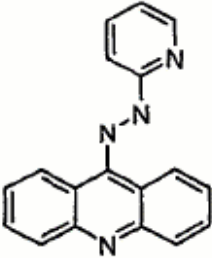
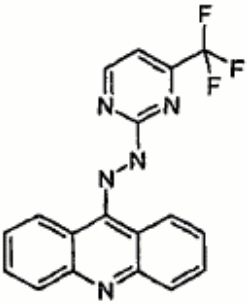
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
6	 <chem>Cc1ccc2nc(cc21)C3=CC=CS3C(=O)NCCN4CCOCC4</chem>	A
7	 <chem>Fc1ccc2nc(cc21)C3=CC=CS3C(=O)NCCN4CCOCC4</chem>	C
8	 <chem>C1=CC=C(C=C1)NC(=O)c2cc3c(nc23)C4=CC=CO4N5CCOCC5</chem>	A
9	 <chem>CCN(CC)S(=O)(=O)c1ccc(NC(=O)c2cc3c(nc23)C4=CC=CN4)cc1N5CCOCC5</chem>	D

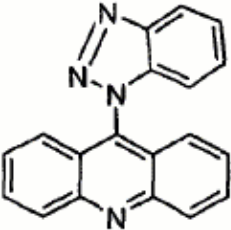
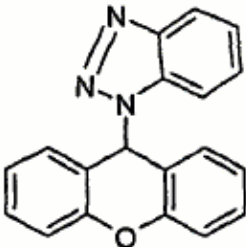
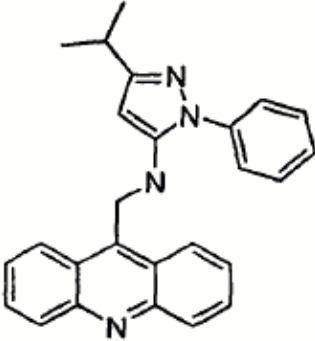
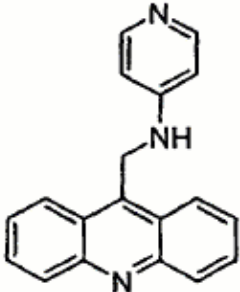
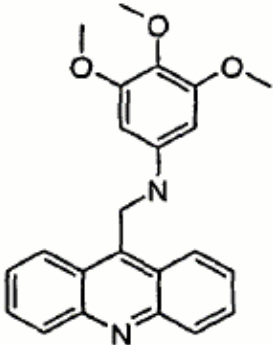
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
10		A
11		A
12		B
13		D
14		D

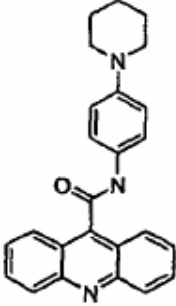
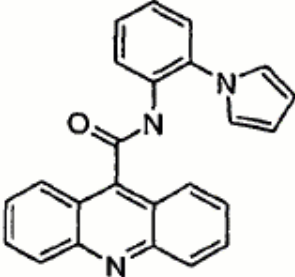
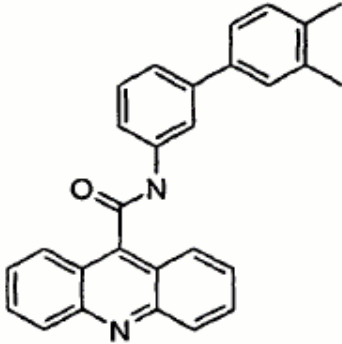
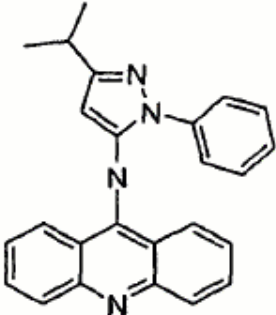
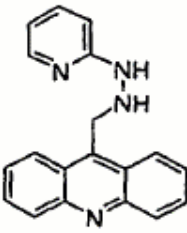
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
15		D
16		D
17		D
18		D
19		A

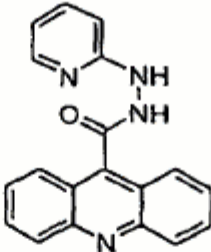
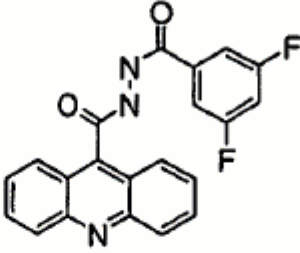
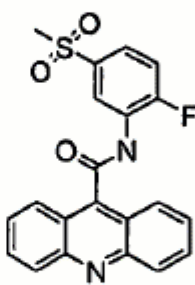
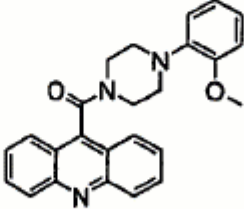
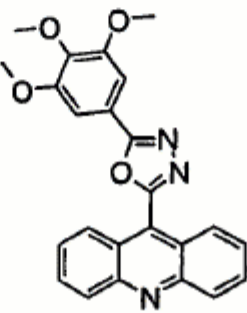
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
20		A
21		D
22		D
23		A

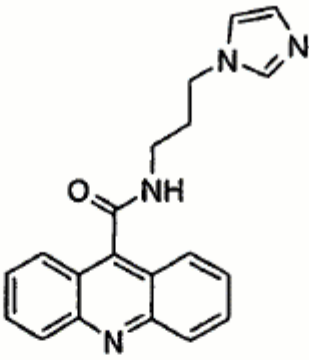
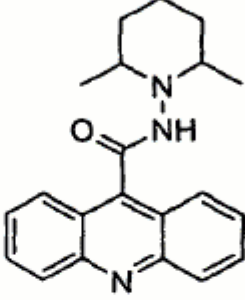
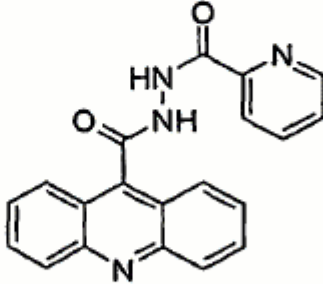
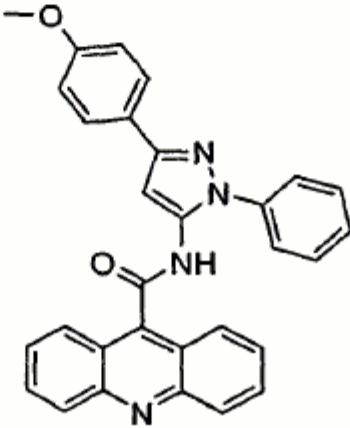
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
24		D
25		D
26		D
27		NT
28		NT

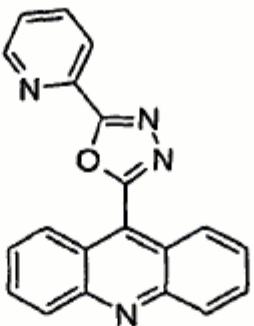
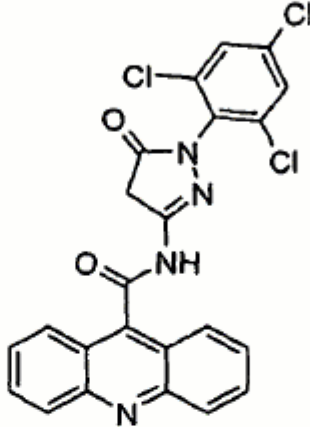
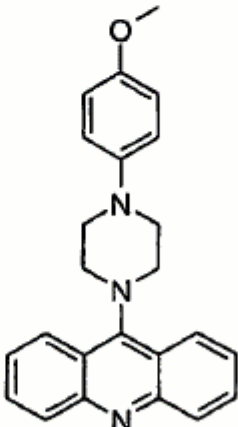
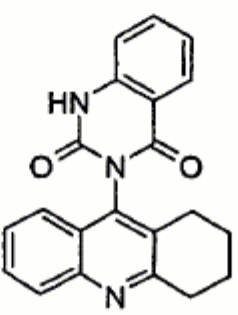
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
29		A
30		NT
31		A
32		A
33		C

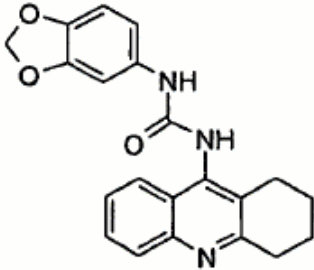
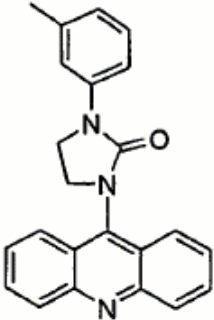
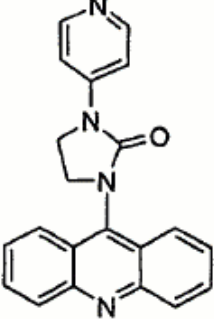
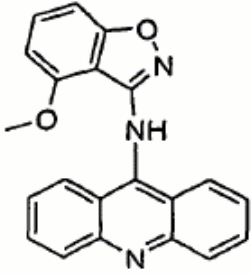
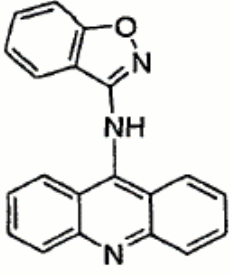
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
34		NT
35		D
36		D
37		NT
38		D

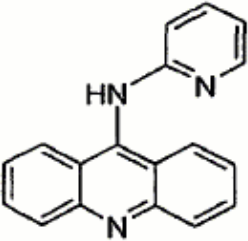
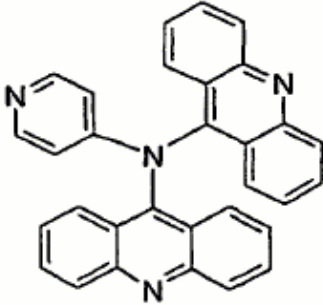
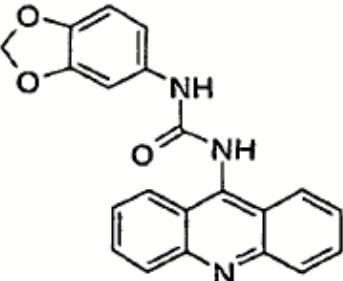
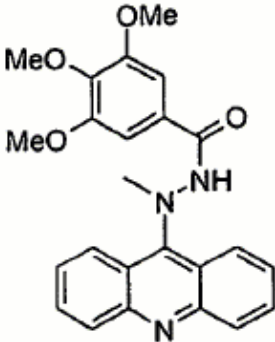
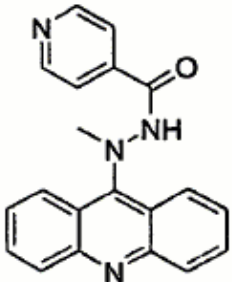
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
39		D
40		D
41		D
42		D
43		A

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
44		A
45		D
46		D
47		D
48		A

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
49	 <chem>O=C(NCCCC1=CN=CN=C1)c2cnc3ccccc32</chem>	NT
50	 <chem>CN1CCN(C)CC1C(=O)c2cnc3ccccc32</chem>	NT
51	 <chem>O=C(NNC(=O)c1ccccn1)c2cnc3ccccc32</chem>	NT
52	 <chem>COc1ccc(cc1)c2nc3c(nc2N3)c4ccccc4C(=O)c5cnc6ccccc65</chem>	NT

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
53		NT
54		NT
55		NT
56		NT

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
57		NT
58		NT
59		NT
60		NT
61		NT

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
62		NT
63		NT
64		D
65		D
66		A

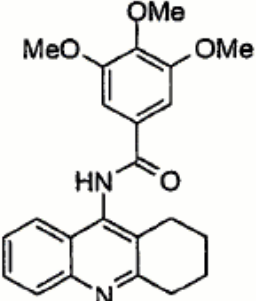
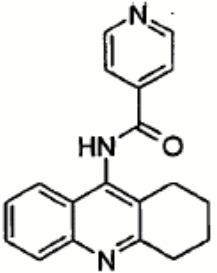
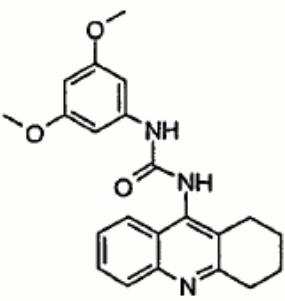
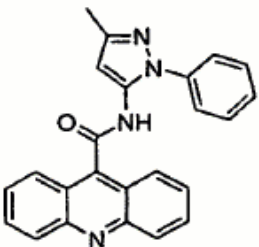
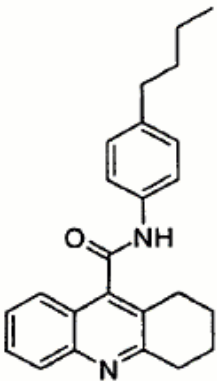
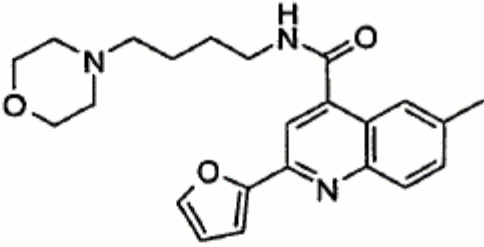
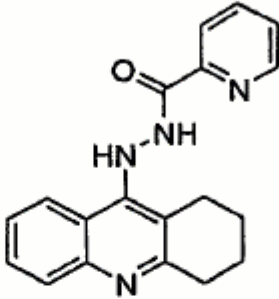
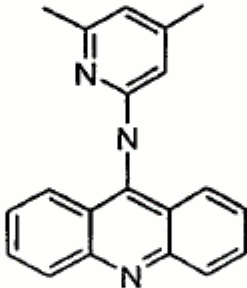
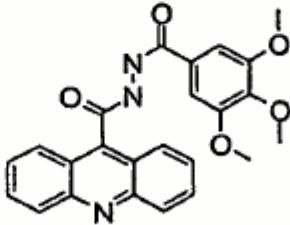
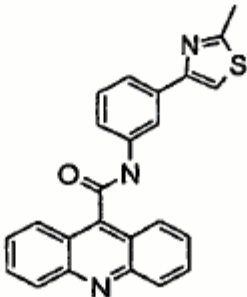
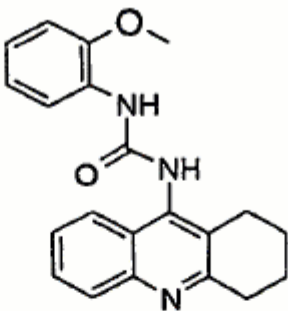
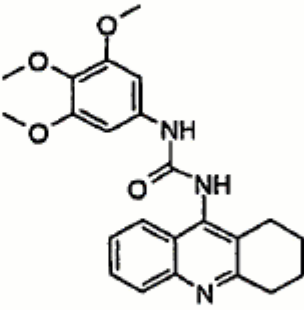
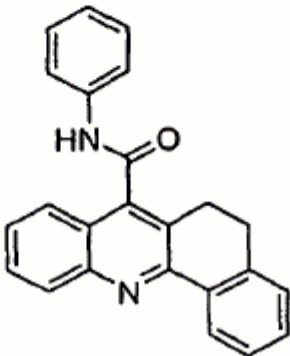
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE ₅₀
67	 <chem>COc1cc(OC)c(OC)cc1NC(=O)c2c3ccccc3n2C4CCCCC4</chem>	NT
68	 <chem>c1ccncc1NC(=O)c2c3ccccc3n2C4CCCCC4</chem>	D
69	 <chem>COc1cc(OC)ccc1NC(=O)c2c3ccccc3n2C4CCCCC4</chem>	NT
70	 <chem>Cc1cn(c2ccccc2n1)C(=O)c3c4ccccc4n3C5CCCCC5</chem>	NT
71	 <chem>CCCCc1ccc(NC(=O)c2c3ccccc3n2C4CCCCC4)cc1</chem>	D

Tabla 5

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	Cl ₅₀
72		D
73		A
74		D
75		A
76		D

Nº de compuesto	ESTRUCTURA	Cl ₅₀
77		D
78		C
79		D

EJEMPLO 2: Identificación de moduladores de sirtuina usando SIRT2

Se usó un ensayo de polarización de fluorescencia para identificar moduladores de la actividad SIRT2. Puede usarse el mismo ensayo para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuina. El ensayo utiliza un sustrato peptídico basado en un fragmento de α -tubulina, una diana de desacetilación de sirtuina conocida. El sustrato contiene un péptido que tiene 14 residuos aminoacídicos como sigue: biotina-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(NIR121)-NH₂ (SEQ ID NO: 9) en el que K(Ac) es un residuo de lisina acetilada. El péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/emisión 680 nm) en el extremo C y con biotina en el extremo N.

Se expone el sustrato peptídico a una proteína sirtuina en presencia de NAD⁺ para permitir la desacetilación del sustrato y volverlo sensible a escisión por tripsina. Se añade entonces tripsina y se lleva a cabo la reacción hasta su terminación (concretamente, se escinde el sustrato desacetilado) liberando el fragmento MR121. Se añade entonces estreptavidina a la reacción, donde puede unirse tanto al sustrato no escindido (concretamente, cualquier sustrato acetilado restante) como a la porción no fluorescente del sustrato peptídico escindido (concretamente, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización de fluorescencia observada para el sustrato peptídico completo unido a la estreptavidina es mayor que la señal de polarización de fluorescencia observada para el fragmento C-terminal MR121 liberado. Por lo tanto, la polarización de fluorescencia obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (por ejemplo, la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína sirtuina). Se leen los resultados en un lector de polarización de fluorescencia de microplaca (Molecular Devices Spectramax MD) con filtros de excitación y emisión apropiados.

Los ensayos de polarización de fluorescencia pueden realizarse como sigue: se incuban sustrato peptídico 0,5 μM y βNAD^+ 35,7 μM con SIRT2 215 nM durante 60 minutos a 37°C en tampón de reacción (Tris-acetato 25 mM, pH 8, Na-Ac 137 mM, K-Ac 2,7 mM, Mg-Ac 1 mM, 0,1% de Pluronic F127, CaCl_2 10 mM, TCEP 1 mM, 0,025% de BSA). Se disuelven los compuestos de ensayo en DMSO y se añaden a la reacción a 11 concentraciones en el intervalo de 0,7 μM a 100 μM . Se adquirió la enzima SIRT2 humana usada en el ensayo (Biomol International, n° de cat. SE-251, Plymouth Meeting, PA). Como fuente alternativa, puede usarse la proteína SIRT2 usada en los ensayos correspondiente a los residuos aminoacídicos 1-319 de SIRT2 humana, con un marcador His N-terminal. Se sobreexpresa la proteína en *E. coli* y se purifica en una columna de quelato de níquel usando técnicas estándares. Después de 60 minutos de incubación con SIRT2, se añade nicotinamida a la reacción a una concentración final 3 mM para detener la reacción de desacetilación y se añade tripsina 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para escindir el sustrato desacetilado. Se incuba la reacción durante 30 minutos a 37°C en presencia de estreptavidina 1 mM. Se determina la polarización fluorescente a las longitudes de onda de excitación (650 nm) y emisión (680 nm). Se determina entonces el nivel de actividad de la proteína sirtuina en presencia de diversas concentraciones del compuesto de ensayo y puede compararse con el nivel de actividad de la proteína sirtuina en ausencia del compuesto de ensayo y/o el nivel de actividad de las proteínas sirtuinas en el control negativo (por ejemplo, nivel de inhibición) y control positivo (por ejemplo, nivel de activación) descritos a continuación.

Se realiza un control de la inhibición de la actividad sirtuina añadiendo nicotinamida 30 mM al inicio de la reacción (por ejemplo, permite la determinación de la inhibición máxima de sirtuina). Se realiza un control de la activación de la actividad sirtuina usando proteína sirtuina 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para conseguir la desacetilación de base del sustrato (por ejemplo, para determinar la actividad sirtuina normalizada).

EJEMPLO 3: Identificación de moduladores de sirtuina usando SIRT3

Se usó un ensayo de polarización de fluorescencia para identificar moduladores de la actividad SIRT3. Puede usarse el mismo ensayo para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuina. El ensayo utiliza un sustrato peptídico basado en un fragmento de la histona H4, una diana de desacetilación de sirtuina conocida. El sustrato contiene un péptido que tiene 14 residuos aminoacídicos como sigue: biotina-GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEQ ID NO: 23), en el que K(Ac) es un residuo de lisina acetilada. El péptido se marca con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/emisión 680 nm) en el extremo C y con biotina en el extremo N.

Se expone el sustrato peptídico a una proteína sirtuina en presencia de NAD^+ para permitir la desacetilación del sustrato y volverlo sensible a la escisión por tripsina. Se añade entonces tripsina y se lleva la reacción a su terminación (concretamente, se escinde el sustrato desacetilado) liberando el fragmento MR121. Se añade entonces estreptavidina a la reacción, donde puede unirse tanto al sustrato no escindido (concretamente, cualquier sustrato acetilado restante) como a la porción no fluorescente del sustrato peptídico escindido (concretamente, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización de fluorescencia observada para el sustrato peptídico completo unido a estreptavidina es mayor que la señal de polarización de fluorescencia observada para el fragmento C-terminal MR121 liberado. Por lo tanto, la polarización de fluorescencia obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (por ejemplo, la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína sirtuina). Los resultados se leen en un lector de polarización de fluorescencia de microplaca (Molecular Devices Spectramax MD) con filtros de excitación y emisión apropiados.

Los ensayos de polarización de fluorescencia pueden realizarse como sigue: se incuban sustrato peptídico 0,5 μM y βNAD^+ 50 μM con SIRT3 2 nM durante 60 minutos a 37°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 25 mM, pH 8, Na-Ac 137 mM, K-Ac 2,7 mM, Mg-Ac 1 mM, 0,1% de Pluronic F127, CaCl_2 10 mM, TCEP 1 mM, 0,025% de BSA). Se disuelven los compuestos de ensayo en DMSO y se añaden a la reacción a 11 concentraciones en el intervalo de 0,7 μM a 100 μM . La proteína SIRT3 usada en los ensayos correspondía a los residuos aminoacídicos 102-399 de SIRT3 humana con un marcador His N-terminal. Se sobreexpresó la proteína en *E. coli* y se purificó en una columna de quelato de níquel usando técnicas estándares. Después de 60 minutos de incubación con SIRT3, se añade nicotinamida a la reacción a una concentración final 3 mM para detener la reacción de desacetilación y se añade tripsina 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para escindir el sustrato desacetilado. Se incuba la reacción durante 30 minutos a 37°C en presencia de estreptavidina 1 mM. Se determina la polarización de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación (650 nm) y emisión (680 nm). Se determina entonces el nivel de actividad de la proteína sirtuina en presencia de diversas concentraciones del compuesto de ensayo y puede compararse con el nivel de actividad de la proteína sirtuina en ausencia del compuesto de ensayo y/o el nivel de actividad de proteínas sirtuinas en el control negativo (por ejemplo, nivel de inhibición) y control positivo (por ejemplo, nivel de activación) descritos a continuación.

Se realiza un control de la inhibición de la actividad sirtuina añadiendo nicotinamida 30 mM al inicio de la reacción (por ejemplo, permite la determinación de la inhibición máxima de sirtuina). Se realiza un control de la activación de la actividad sirtuina usando proteína sirtuina 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para conseguir la desacetilación de base del sustrato (por ejemplo, para determinar la actividad sirtuina normalizada).

Se identificaron los compuestos moduladores de sirtuina que activaban SIRT3 usando el ensayo descrito anteriormente, y se muestran a continuación en la Tabla 6. Se identificaron los compuestos moduladores de sirtuina que inhibían SIRT3 usando el ensayo descrito anteriormente, y se muestran a continuación en la Tabla 7. Se

representan los valores de DE_{50} de los compuestos activadores por A ($DE_{50} \leq 50 \mu\text{M}$), B ($DE_{50} = 51-100 \mu\text{M}$), C ($DE_{50} = 101-150 \mu\text{M}$) y D ($DE_{50} \geq 150 \mu\text{M}$). El DE_{50} del resveratrol para la activación de SIRT3 es $>300 \mu\text{M}$. De forma similar, se representan los valores de CI_{50} para los compuestos inhibidores por A ($CI_{50} \leq 50 \mu\text{M}$), B ($CI_{50} = 51-100 \mu\text{M}$), C ($CI_{50} = 101-150 \mu\text{M}$) y D ($CI_{50} \geq 150 \mu\text{M}$).

5

Tabla 6.

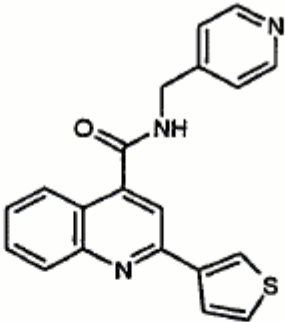
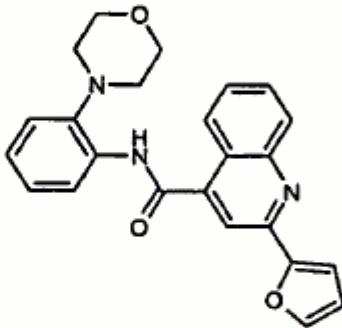
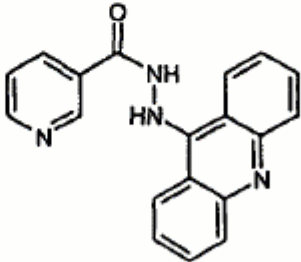
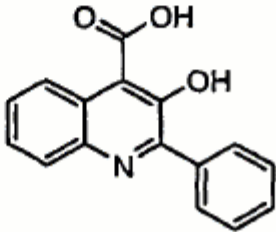
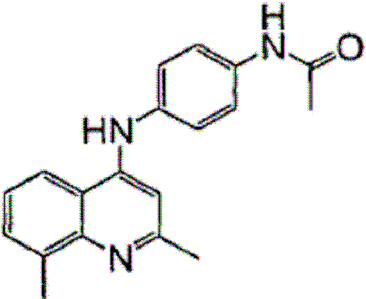
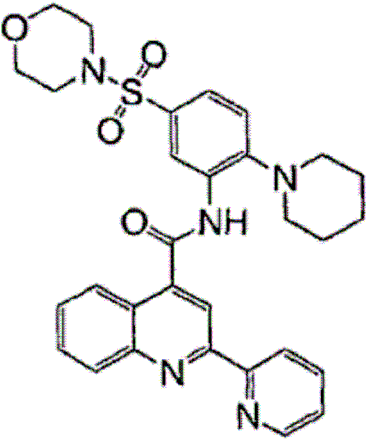
Nº de compuesto	ESTRUCTURA	DE_{50}
1		B
8		A
11		B
80		B

Tabla 7

81		C
82		N/A

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad de una desacetilasa que comprende:
poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada;
- 5 poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada; y
determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos;
en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativa de actividad desacetilasa.
- 10 2. Un método para identificar un compuesto que modula una desacetilasa que comprende:
poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina acetilada;
- 15 poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada; y
determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos;
en el que un cambio en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad desacetilasa.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden adicionalmente un grupo voluminoso y dicho al menos un residuo de lisina acetilada está localizado entre el fluoróforo y el grupo voluminoso.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho grupo voluminoso es biotina, un complejo de biotina-avidina o un complejo de biotina-estreptavidina.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden adicionalmente un sitio de unión y dicho al menos un residuo de lisina acetilada está localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión.
6. Un método para determinar la actividad de una acetiltransferasa que comprende:
poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una acetiltransferasa, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina;
- 30 poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada; y
determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos,
en el que un aumento del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativo de actividad acetiltransferasa.
- 35 7. Un método para identificar un compuesto que modula una acetiltransferasa que comprende:
poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una acetiltransferasa en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión;
- 40 poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada; y
determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos;
en el que un cambio del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que modula la actividad acetiltransferasa.
- 45

8. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden adicionalmente un grupo voluminoso y dicho residuo de lisina está localizado entre el fluoróforo y el grupo voluminoso.
- 5 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho grupo voluminoso es biotina, un complejo de biotina-avidina o un complejo de biotina-estreptavidina.
10. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que los miembros del conjunto de sustratos peptídicos comprenden adicionalmente un sitio de unión y dicho al menos un residuo de lisina está localizado entre el fluoróforo y el sitio de unión.
- 10 11. El método de la reivindicación 5 o 10, en el que dicho método comprende adicionalmente el conjunto de sustratos peptídicos con un resto de unión que se une a dicho sitio de unión.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el sitio de unión es un antígeno.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el resto de unión es un anticuerpo.
14. El método de la reivindicación 11, en el que el sitio de unión es biotina.
15. El método de la reivindicación 14, en el que el resto de unión es avidina o estreptavidina.
- 15 16. El método de la reivindicación 11, en el que el sitio de unión comprende una región Fc o una porción de la misma.
17. El método de la reivindicación 16, en el que el resto de unión es proteína A o proteína G.
18. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la desacetilasa es histona desacetilasa (HDAC) o una sirtuina.
- 20 19. El método de la reivindicación 18, en el que la sirtuina es una proteína SIRT1.
20. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que la acetiltransferasa es Gcn5 o p300/CBP.
21. El método de la reivindicación 1, 2, 6 o 7, en el que el reactivo que escinde el sustrato peptídico es una proteasa.
- 25 22. El método de la reivindicación 21, en el que la proteasa es lisilendopeptidasa, endoproteinasa, Lys-C, plasmina, calpaína o tripsina.
23. El método de la reivindicación 1, 2, 6 o 7, en el que el fluoróforo es MR121 o 5TMR.
24. El método de la reivindicación 1, 2, 6 o 7, en el que la secuencia del sustrato peptídico deriva de una histona, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o Tat de VIH, o un fragmento de las mismas.
- 30 25. El método de la reivindicación 2 o 7, en el que el compuesto es una molécula pequeña.
26. El método de la reivindicación 2, en el que se identifica un compuesto que aumenta la actividad de la desacetilasa.
27. El método de la reivindicación 28, en el que una reducción en el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativa de un compuesto que aumenta la actividad de la desacetilasa.
- 35 28. El método de la reivindicación 2, en el que se identifica un compuesto que inhibe la actividad de la desacetilasa.
29. El método de la reivindicación 28, en el que un aumento del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que inhibe la actividad de la desacetilasa.
- 40 30. El método de la reivindicación 7, en el que se identifica un compuesto que inhibe la actividad de la acetiltransferasa.
31. El método de la reivindicación 30, en el que una reducción del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos tras el contacto con la acetiltransferasa en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativa de un compuesto que inhibe la actividad de la acetiltransferasa.
- 45

32. El método de la reivindicación 7, en el que se identifica un compuesto que aumenta la actividad de la acetiltransferasa.

5 33. El método de la reivindicación 32, en el que un aumento del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos tras el contacto con la acetiltransferasa en presencia del compuesto de ensayo, en comparación con un control, es indicativo de un compuesto que aumenta la actividad de la acetiltransferasa.

34. Un método para determinar la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico que comprende:

10 poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación, en el que dichos miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina o residuo de lisina acetilada;

poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada; y

determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos;

15 en el que un cambio del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos es indicativo de actividad de una enzima que modula la acetilación.

35. Un método para identificar un compuesto que modula la actividad de una enzima que modula la acetilación de un sustrato peptídico, que comprende:

20 poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una enzima que modula la acetilación en presencia de un compuesto de ensayo, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden un fluoróforo y al menos un residuo de lisina o residuo de lisina acetilada;

poner en contacto el conjunto de sustratos peptídicos con un reactivo de escisión que escinde los miembros del conjunto de sustratos peptídicos que tienen residuos de lisina no acetilada; y

determinar el valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos;

25 en el que un cambio del valor de polarización de fluorescencia del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto que modula la actividad de la enzima que modula la acetilación.