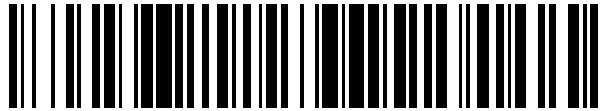


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 940**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE REIVINDICACIONES DE SOLICITUD DE  
PATENTE EUROPEA

T1

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2012 E 12710995 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **29.01.2014 EP 2689024**

30 Prioridad:

**25.03.2011 GB 201105118**  
**27.06.2011 GB 201110920**  
**16.09.2011 GB 201116030**

46 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de las reivindicaciones de la solicitud:  
**06.03.2014**

71 Solicitantes:

**ALMAC SCIENCES (SCOTLAND) LIMITED**  
**(100.0%)**  
**4th Floor Saltire Court 20 Castle Terrace**  
**Edinburgh EH1 2EN, GB**

72 Inventor/es:

**COTTON, GRAHAM y**  
**DUNSMORE, COLIN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **Ensayos enzimáticos**

**ES 2 445 940 T1**

## REIVINDICACIONES

1. Un método de ensayo de la actividad de una enzima modificadora en una muestra de ensayo que comprende:
  - 5 (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un sustrato enzimático modulado por fluorescencia que comprende una molécula enlazadora conjugada a un resto fluorescente y un resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia configurado para modular el tiempo de vida de la fluorescencia del resto fluorescente, donde el sustrato se modifica por la acción de la enzima modificadora para formar un sustrato modificado, habiéndose convertido la molécula enlazadora de dicho sustrato modificado en susceptible a escisión por una segunda enzima o estando protegida de escisión por una segunda enzima entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia como resultado de la modificación, donde la escisión del sustrato o del sustrato modificado por la segunda enzima separa una parte del sustrato que contiene el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia de una parte del sustrato que contiene el resto fluorescente; y
  - 15 (b) detectar la formación del sustrato modificado detectando cambios en el tiempo de vida de la fluorescencia del resto fluorescente como resultado de la acción de la segunda enzima en el sustrato modificado y/o el sustrato, donde la formación del sustrato modificado proporciona un indicio de la actividad de la enzima modificadora.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la molécula enlazadora del sustrato enzimático modulado por fluorescencia es un enlazador peptídico y la segunda enzima es una proteasa que escinde el enlazador peptídico o un enlazador peptídico modificado formado por la acción de la enzima modificadora en el enlazador peptídico para separar una parte del sustrato que contiene el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia de una parte del sustrato que contiene el resto fluorescente.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el enlazador peptídico es capaz de ser escindido por dicha proteasa, donde dicha escisión separa una parte del sustrato que contiene el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia de una parte del sustrato que contiene el resto fluorescente y la modificación del enlazador peptídico por la enzima modificadora protege al enlazador peptídico modificado de escisión por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia, indicándose la formación del enlazador peptídico modificado por una disminución dependiente del tiempo en el tiempo de vida de la fluorescencia del resto fluorescente después del tratamiento con proteasa en comparación con el enlazador peptídico no modificado.
- 30 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el enlazador peptídico modificado se forma por metilación de un residuo de aminoácido en el enlazador peptídico.
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde la enzima modificadora es una proteína metil transferasa.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la proteína metil transferasa es una enzima histona lisina metil transferasa (PKMT), por ejemplo, G9a, Set7/9, GLP o EZH2.
- 40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la proteína metil transferasa es una enzima histona arginina metil transferasa (PRMT), por ejemplo, PRMT1, PRMT3, PRMT4/CARM1 o PRMT5.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el enlazador peptídico modificado se forma por acetilación de un residuo de aminoácido en el enlazador peptídico.
- 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la enzima modificadora es una acetil transferasa.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la acetil transferasa es una histona acetil transferasa, por ejemplo, Gcn5, PCAF, Hat1 o p300.
- 50 11. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el enlazador peptídico modificado se forma mediante desiminación de un residuo de aminoácido en el enlazador peptídico.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, donde la enzima modificadora es una desiminasa.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde la desiminasa es una peptidil-arginina desiminasa, por ejemplo, PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 o PAD6.
- 60 14. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el enlazador peptídico no es capaz de ser escindido por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia y la modificación del enlazador peptídico por la enzima modificadora convierte al enlazador peptídico modificado en susceptible a escisión por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia, indicándose la formación del enlazador peptídico modificado por un aumento dependiente del tiempo en el tiempo de vida de la fluorescencia del resto fluorescente después del tratamiento con proteasa en comparación con el péptido no modificado.
- 65

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde el enlazador peptídico modificado se forma mediante desmetilación de un residuo de aminoácido metilado en el enlazador peptídico.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, donde la enzima modificadora es una desmetilasa.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, donde la desmetilasa es una histona desmetilasa, por ejemplo, LSD1, JHDM1A o JMJD6.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde el enlazador peptídico modificado se forma mediante desacetilación de un residuo de aminoácido acetilado en el enlazador peptídico.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde la enzima modificadora es una desacetilasa.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, donde la desacetilasa es una histona desacetilasa, por ejemplo, HDAC1-11 o SIRT1-5.

21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, donde el resto fluorescente se selecciona del grupo que consiste en 9-amino acridina y derivados de la misma, derivados de acridona, acridina, quinacridina y restos acridinio.

22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, donde el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia se selecciona del grupo que consiste en restos indolilo, incluyendo el resto indolilo presente en la cadena lateral del aminoácido triptófano, restos fenólicos, incluyendo el resto fenólico presente en la cadena lateral del aminoácido tirosina, restos imidazol, incluyendo el resto imidazol presente en la cadena lateral del aminoácido histidina y restos bencilo, incluyendo la cadena lateral de bencilo del aminoácido fenilalanina, restos fenoxi, restos naftilalanina, restos carbazol y restos fenotiazina.

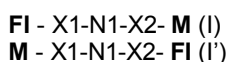
23. Un método de identificación sistemática de inhibidores de una enzima, comprendiendo el método ensayar la actividad de dicha enzima usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 en presencia de un compuesto de ensayo, donde una reducción en la actividad enzimática en presencia del compuesto del ensayo identifica al compuesto de ensayo como un inhibidor de dicha enzima.

24. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia que comprende una molécula enlazadora conjugada a un resto fluorescente y un resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia configurado para modular el tiempo de vida de la fluorescencia del resto fluorescente, donde el sustrato está modificado por la acción de una enzima modificadora para formar un sustrato modificado, estando convertida la molécula enlazadora de dicho sustrato modificado en susceptible a escisión por una segunda enzima o estando protegida de escisión por una segunda enzima entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia como resultado de la modificación, donde la escisión del sustrato o del sustrato modificado por la segunda enzima separa una parte del sustrato que contiene el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia de una parte del sustrato que contiene el resto fluorescente.

25. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 24, donde la molécula enlazadora del sustrato enzimático modulado por fluorescencia es un enlazador peptídico y la segunda enzima es una proteasa que escinde el enlazador peptídico o un enlazador peptídico modificado formado por la acción de la enzima modificadora en el enlazador peptídico para separar una parte del sustrato que contiene el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia de una parte del sustrato que contiene el resto fluorescente.

26. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 25, donde el enlazador peptídico es capaz de ser escindido por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia y la modificación del enlazador peptídico por la enzima modificadora protege al enlazador peptídico modificado de escisión por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

27. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 26 para su uso en el ensayo de la actividad de una metil transferasa, donde el sustrato enzimático modulado por fluorescencia tiene una estructura representada por fórmula (I) o (I')



donde X1 representa una primera secuencia de aminoácidos, FI represe representa el resto fluorescente que está conjugado a X1 (o X2 en I'), N1 representa un residuo de aminoácido que está metilado por la acción de la metil transferasa, X2 representa una segunda secuencia de aminoácidos y M representa el modulador del tiempo de vida de la fluorescencia que está conjugado a X2 (o X1 en I').

28. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 27 que se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 Péptido 4: **9AA-TARK<sup>9</sup>STGW-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 5: **K(9AA)QTARK<sup>9</sup>STGW-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 6: **ARTK(9AA)QTARK<sup>9</sup>STGGW-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 7: **ARTWQTARK<sup>9</sup>STGGK(9AA)-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 8: **WQTARK<sup>9</sup>STGGK(9AA)-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 9: **K(9AA)ARTK(Me)QTARK<sup>9</sup>STGGW-CONH<sub>2</sub>**  
 10 Péptido 12: **WARTK<sup>4</sup>QTARK(9AA)STGGKAPRKQLAK-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 13: **WRTK<sup>4</sup>QTARK(9AA)STGGKAPRKQLAK-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 14: **WSGR<sup>3</sup>GKGGK(9AA)GLGKGGAKRHRK-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 15: **Ac-WSGR<sup>3</sup>GKGGK(9AA)GLGKGGAKRHRK-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 20: **PRKQLATK(9AA)AARK<sup>27</sup>SAPATGGW-CONH<sub>2</sub>**.

29. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 26 para su uso en el ensayo de la actividad de una acetil transferasa, donde el sustrato enzimático modulado por fluorescencia tiene una estructura representada por fórmula (III) o (III')

- 20 **FI - X3-N2-X4- M (III)**  
**M - X3-N2-X4- FI (III')**

25 donde X3 representa una primera secuencia de aminoácidos, **FI** representa el resto fluorescente que está conjugado a X3 (o X4 en III'), N2 representa un residuo de aminoácido que está acetilado por la acción de la acetil transferasa, X4 representa una segunda secuencia de aminoácidos y **M** representa el modulador del tiempo de vida de la fluorescencia que está conjugado a X4 (o X3 en III').

30. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 29 que se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 Péptido 16: **WQTARK(Me)STGGK<sup>14</sup>APRK(9AA)QLATK-CONH<sub>2</sub>**  
 Péptido 17: **9AA-STGGK<sup>14</sup>APRWQLATK-CONH<sub>2</sub>**.

35 31. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 26 para su uso en el ensayo de la actividad de una desiminasa, donde el sustrato enzimático modulado por fluorescencia tiene una estructura representada por fórmula (V) o (V')

- 40 **FI - X5-R-X6- M (V)**  
**M - X5-R-X6- FI (V')**

45 donde X5 representa una primera secuencia de aminoácidos, **FI** representa el resto fluorescente en X5 (o X6 en V'), R representa un resto arginina que se convierte en citrulina por la acción de la desiminasa, X6 representa una segunda secuencia de aminoácidos y **M** representa el modulador del tiempo de vida de la fluorescencia que está conjugado a X6 (o X5 en V').

32. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 31 que es

- 50 Péptido 1: **9AA-QSTRGSGHWKK-CONH<sub>2</sub>** o  
 Péptido 3: **K(9AA)-HQSTRGSGHWKK-CONH<sub>2</sub>**.

55 33. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 25, donde el enlazador peptídico no es capaz de ser escindido por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia y la modificación del enlazador peptídico por la enzima modificadora convierte al enlazador peptídico modificado en susceptible a escisión por dicha proteasa entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

34. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 33 para su uso en el ensayo de la actividad de una desmetilasa, donde el sustrato enzimático modulado por fluorescencia tiene una estructura representada por fórmula (VII) o (VII')

- 60 **FI - X7-N3(Me)-X8- M (VII)**  
**M - X7-N3(Me)-X8- FI (VII')**

65 donde X7 representa una primera secuencia de aminoácidos, **FI** representa el resto fluorescente que está conjugado a X7 (o X8 en VII'), N3(Me) representa un residuo de aminoácido metilado (por ejemplo, lisina metilada o arginina metilada) que está desmetilado por la acción de la desmetilasa, X8 representa una segunda secuencia de

aminoácidos y **M** representa el modulador del tiempo de vida de la fluorescencia que está conjugado a X8 (o X7 en VII').

35. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 34 que es

Péptido 10: **9AA**-ATGGVK<sup>36</sup>(Me)K(Me)PHRYW-CONH<sub>2</sub> o  
Péptido 11: **9AA**-ATGGVK<sup>36</sup>(Me)KPHW-CONH<sub>2</sub>.

36. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 33 para su uso en el ensayo de la actividad de una desacetilasa, donde el sustrato enzimático modulado por fluorescencia tiene una estructura representada por fórmula (IX) o (IX')

**FI** -X9-N4(Ac)-X10- **M** (IX)  
**M**- X9-N4(Ac)-X10- **FI** (IX')

donde X9 representa una primera secuencia de aminoácidos, **FI** representa el resto fluorescente que está conjugado a X9 (o X10 en IX'), N4(Ac) representa un residuo de aminoácido acetilado (por ejemplo, lisina acetilada) que está desacetilado por la acción de la desacetilasa, X10 representa una segunda secuencia de aminoácidos y **M** representa el modulador del tiempo de vida de la fluorescencia que está conjugado a X10 (o X9 en IX').

37. Un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 36 que es Ac-Trp-Xaa-Lys(**Ac**)-Lys(**9AA**) o Péptido **18**: Ac-IWK(Ac)K(**9AA**)-CONH<sub>2</sub>.

38. Un kit para su uso en el ensayo de la actividad de una metil transferasa, comprendiendo el kit un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 27 o la reivindicación 28 y una proteasa que escinde dicho sustrato enzimático modulado por fluorescencia entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

39. Un kit para su uso en el ensayo de la actividad de una acetil transferasa, comprendiendo el kit un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 29 o la reivindicación 30 y una proteasa que escinde dicho sustrato enzimático modulado por fluorescencia entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

40. Un kit para su uso en el ensayo de la actividad de una desiminasa, comprendiendo el kit un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 31 o la reivindicación 32 y una proteasa que escinde dicho sustrato enzimático modulado por fluorescencia entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

41. Un kit para su uso en el ensayo de la actividad de una desmetilasa, comprendiendo el kit un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 34 o la reivindicación 35 y una proteasa que escinde una forma modificada de dicho sustrato enzimático modulado por fluorescencia que está desmetilado en el residuo N3 entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

42. Un kit para su uso en el ensayo de la actividad de una desacetilasa, comprendiendo el kit un sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con la reivindicación 36 o la reivindicación 37 y una proteasa que escinde una forma modificada de dicho sustrato enzimático modulado por fluorescencia que está desacetilado en el residuo N4 entre el resto fluorescente y el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia.

43. El sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-27, 29, 31, 33, 35 o 36 o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 42, donde el resto modulador del tiempo de vida de la fluorescencia se selecciona del grupo que consiste en restos indolilo, incluyendo el resto indolilo presente en la cadena lateral del aminoácido triptófano, restos fenólicos, incluyendo el resto fenólico presente en la cadena lateral del aminoácido tirosina, restos imidazol, incluyendo el resto imidazol presente en la cadena lateral del aminoácido histidina y restos bencilo incluyendo la cadena lateral de bencilo del aminoácido fenilalanina, restos fenoxi, restos naftilalanina, restos carbazol y restos fenotiazina.

44. El sustrato enzimático modulado por fluorescencia de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24-27, 29, 31, 33, 34 o 36, o un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 42, donde el resto fluorescente se selecciona del grupo que consiste en 9-amino acridina y derivados de la misma, derivados de acridona, acridina, quinacridina y restos acridinio.