



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 331 286**

⑫ Número de solicitud: 200801912

⑤① Int. Cl.:  
**G01N 33/533** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **26.06.2008**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2009**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**28.12.2009**

⑦① Solicitante/s:  
**Universidade de Santiago de Compostela**  
**Edif. CACTUS-CITT - Campus Sur**  
**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦② Inventor/es: **Pazos Chantretero, Elena;**  
**Vidal, Anxo;**  
**Mascareñas Cid, José Luis y**  
**Vázquez Sentís, M. Eugenio**

⑦④ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤④ Título: **Sensor fluorescente y su uso para la detección de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas y/o para la detección de ciclinas.**

⑤⑦ Resumen:

Sensor fluorescente y su uso para la detección de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas y/o para la detección de ciclinas.

La presente invención se refiere a un sensor fluorescente que comprende un quelatante de lantánido y una secuencia peptídica, así como su método de obtención y su uso para la identificación de inhibidores de complejos CDK/ciclinas (kCDKCs) y la detección y cuantificación in vitro de la proteína ciclina. Además, se refiere a un kit para implementar la identificación de inhibidores de kCDKCs así como la detección y cuantificación de ciclina en una muestra.

ES 2 331 286 A1

## DESCRIPCIÓN

Sensor fluorescente y su uso para la detección de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas y/o para la detección de ciclinas.

La presente invención se refiere a un sensor fluorescente que comprende un quelatante de lantánido y una secuencia peptídica, así como su método de obtención y su uso para la identificación de inhibidores de complejos CDK/ciclinas (kCDKCs) y la detección y cuantificación *in vitro* de la proteína ciclina. Además, se refiere a un kit para implementar la identificación de inhibidores de kCDKCs y así como la detección y cuantificación de ciclina en una muestra.

## Estado de la técnica anterior

La división celular (mitosis) es uno de los requisitos necesarios para el desarrollo de los organismos multicelulares. La capacidad de una célula de dividirse y diferenciarse permite la creación de estructuras multicelulares complejas. Cuando hay un fallo en el mecanismo de regulación del ciclo celular puede tener lugar una proliferación celular excesiva capaz de producir cáncer. En células eucariotas, el ciclo celular está regulado por varios complejos de kinasas formados por la asociación de una unidad de kinasa (CDK) con una unidad reguladora de la proteína ciclina (Poon, R. Y. C. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 1317-1326). Los complejos kinasas CDK-Ciclina (kCDKC) son a su vez regulados por mecanismos de fosforilación y por interacciones con distintas proteínas. En los últimos 10 años se han publicado más de 80.000 artículos relacionados con ciclinas, lo que da una idea de la importancia biológica y médica de estas proteínas.

La evidencia genética demuestra una fuerte correlación entre alteraciones en la regulación de kCDKCs y la patología molecular del cáncer (Deshpande, A. *et al. Oncogene* **2005**, 24, 2909-2915), y es por ello que en los últimos años ha habido un gran interés en el desarrollo de inhibidores de kCDKCs. Una de las estrategias para la obtención de estos inhibidores consiste en el diseño de derivados peptídicos, con un modo de unión a la ciclina, análogo al de la proteína inhibidora p27/Kip1, y que sean capaces de interferir con el proceso de reconocimiento de los sustratos naturales del complejo kCDKC. El sitio de unión de p27/Kip1 a la ciclina está definido por una secuencia específica conocida como CBM (Cyclin Binding Motif). Estudios biológicos con distintos péptidos conteniendo el CBM han demostrado su capacidad de interferir en la formación de complejos estables de proteínas con kCDKCs, y de esta forma inducir apoptosis en células tumorales *in vitro* e *in vivo* (McInnes, C. *et al. Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2003**, 3, 57-69; Mendoza, N. *et al. Cancer Res.* **2003**, 63, 1020-1024).

La relevancia biológica del sistema de kCDKC hace especialmente interesante la obtención de sensores de ciclina, sustancias capaces de interaccionar específicamente con la ciclina y producir una señal susceptible de ser medida espectroscópicamente. Estos sensores representarían una nueva herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el control del ciclo celular dependientes de la ciclina, y servirían como instrumento para la identificación de nuevos inhibidores de kCDKCs con posibles aplicaciones farmacológicas mediante el desarrollo de ensayos competitivos.

La espectroscopia de fluorescencia ofrece numerosas ventajas para el desarrollo de sensores y de sistemas de diagnóstico debido a su sensibilidad y a la facilidad de los ensayos. Existen diversas estrategias para el diseño de sensores que aprovechan diferentes mecanismos implicados en el fenómeno de la fluorescencia. Una de las más interesantes se basa en la utilización de complejos fluorescentes de lantánidos debido a sus especiales características: un tiempo de vida excepcionalmente largo (milisegundos) y bandas de emisión extremadamente estrechas, que permiten una mejor resolución de su señal de fluorescencia independientemente de la dispersión y del fondo de autofluorescencia en mezclas biológicas.

Los lantánidos trivalentes emiten fluorescencia por transiciones entre orbitales  $4f$ , estas transiciones son prohibidas por las reglas de selección, y por lo tanto presentan un coeficiente de absorción extremadamente bajo (menor de  $10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), lo que hace que los lantánidos trivalentes no se puedan excitar directamente por métodos normales. Para solucionar este problema se recurre a un método de excitación indirecta conocido como *sensibilización* (*sensitization*) o *efecto antena* (Gunnlaugsson, T. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1999-2009). La sensibilización genera la fluorescencia del catión Ln(III) en un proceso de tres etapas: i) la luz es absorbida en el entorno inmediato del Ln(III) por un cromóforo orgánico (antena); ii) la energía de excitación se transfiere desde el cromóforo orgánico a uno o varios de los estados excitados del ión metálico y finalmente; iii) se produce la emisión luminiscente por parte del metal. Es importante resaltar que en el proceso de sensibilización no es necesaria la unión directa de la antena con el centro metálico, sino sólo la proximidad en el espacio. Este proceso puede tener lugar de manera eficiente si ambas especies se encuentran a menos de 15-20 Å.

En el diseño de sondas basadas en la emisión de los lantánidos se intentan modular las propiedades luminiscentes de los iones Ln(III) por procesos que dependan de la concentración de un analito. Esta modulación puede ser efectuada utilizando el analito como especie sensibilizadora de un complejo no fluorescente o poco fluorescente. Existen precedentes de la aplicación de esta estrategia en sensores de moléculas poliaromáticas basados en complejos de Tb(III) con una unidad de ciclodextrina-DTPA (dietiltetraminopentaacetato) no fluorescentes. La transferencia eficiente de energía desde las moléculas aromáticas al Ln(III) se produce cuando éstas se unen a la ciclodextrina. A pesar de todo, este principio ha sido aún poco explotado en el diseño de sensores y los ejemplos de su aplicación a sistemas biológicos son muy escasos (Leonard, J. P. *et al. Chem. Commun.* **2007**, 129-131).

A pesar de la existencia de algunos sensores, éstos no se han empleado para detectar ciclina e inhibidores de kCDKCs del modo expuesto en esta invención.

Actualmente y a pesar de la importancia biológica y la relevancia en diagnóstico de patologías relacionadas con ciclina, no existen ensayos simples para identificar posibles inhibidores. Normalmente se recurre a ensayos de microcalorimetría o bioquímicos, con los consiguientes problemas de reproducibilidad, implementación en ensayos de high-throughput o de actividad enzimática (Gondeau, C. *et al. J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 13793-13800).

## Explicación de la invención

La presente invención se basa en el diseño de sensores que aprovechan, como se explica más adelante, diferentes mecanismos implicados en el fenómeno de la fluorescencia mediante la utilización de péptidos quelatantes de lantánido que permiten una buena resolución de su señal fluorescente. Estos sensores son capaces de mostrar la presencia de ciclina.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un sensor fluorescente que comprende:

- a. un complejo DOTA-lantánido y
- b. una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 3.

Siendo el complejo DOTA-lantánido el formado por el compuesto ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) y el lantánido, en forma de catión trivalente. Dentro de la serie de estos metales de lantánidos (Ln(III)), Tb(III) y Eu(III) son los dos cationes que presentan las mejores propiedades de emisión. Así pues, en una realización preferida, el lantánido del complejo DOTA-lantánido es el Terbio o el Europio.

En cuanto a las secuencias peptídicas utilizadas en la invención, éstas se seleccionan de entre el grupo que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 3. Por ello, en una realización preferida la secuencia es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y se une al complejo DOTA-lantánido por su extremo N-terminal, por su cadena lateral de Lisina y por la cadena lateral del residuo ácido 2,3-diaminopropiónico respectivamente, como se observa en la figura 1 (Fig. 1).

El diseño de estos péptidos se llevó a cabo guiado por las estructuras de rayos X disponibles en la base de datos de la Ciclina A unida a péptidos de alta afinidad. La estabilización del complejo se debe fundamentalmente a los contactos que se establecen entre el surco hidrofóbico de ciclina (formado por las hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ ) y las cadenas laterales de Arg<sup>1</sup>, Leu<sup>3</sup> y Phe<sup>5</sup> del péptido, mientras que las cadenas laterales de Arg<sup>2</sup> e Ile<sup>4</sup> se proyectan fuera del surco de unión.

El péptido quelatante se diseña intentando mantener en la medida de lo posible las interacciones determinantes para la formación del complejo péptido-Ciclina A, y minimizando las repulsiones que pudiera ocasionar el ligando con la proteína.

Como se describe más adelante, estos sensores son capaces de detectar ciclina, en concreto Ciclina A. La estrategia para su diseño consiste en aprovechar la presencia de un residuo de Triptófano (Trp) próximo al sitio de unión de los péptidos como unidad sensibilizadora del ión Ln(III). Dicho residuo es capaz de inducir una transferencia de excitación a un complejo de lantánido situado en torno a 10-15 Å del Trp, induciendo la fluorescencia del complejo péptido-Ln(III) como consecuencia de la unión a la ciclina tal como se muestra en la figura 2 (Fig. 2).

O sea, el péptido que contiene un agente quelatante de Ln(III) en ausencia de Ciclina A no debe presentar emisión de fluorescencia puesto que el metal no puede ser excitado en ausencia de un sensibilizador. Sin embargo, en presencia de Ciclina A, el péptido se une a la proteína, quedando el residuo de Trp próximo al péptido, y al centro metálico, de manera que sea posible el proceso de sensibilización de forma eficiente, y tenga lugar la emisión de fluorescencia como se observa en la figura 3 (Fig. 3).

Por todo ello, y teniendo en cuenta la sensibilidad del sensor de la invención, otro aspecto va dirigido al uso de dicho sensor fluorescente para identificar inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (kCDKCs). Preferiblemente de ciclina A.

Como se ha descrito anteriormente, una estrategia para la selección de estos inhibidores consiste en el diseño de péptidos, con una secuencia de unión a la ciclina, análogos al de las proteínas inhibidoras, como por ejemplo, y sin que suponga la exclusión de otros inhibidores, p21, p107, E2F1, y p27, capaces de interferir con el proceso de reconocimiento de los sustratos naturales del complejo kCDKC que sirven para la identificación de nuevos inhibidores de kCDKCs con posibles aplicaciones farmacológicas mediante el desarrollo de ensayos competitivos.

Por otro lado, otro aspecto de esta invención se refiere al uso del sensor fluorescente descrito en los párrafos precedentes para la detección y cuantificación *in vitro* de la proteína ciclina. Preferiblemente la ciclina es Ciclina A.

La detección de estas proteínas se realiza midiendo los niveles de emisión de fluorescencia en una longitud de onda determinada, dependiendo del lantánido utilizado, por ejemplo, en el caso del Terbio, los niveles de emisión de fluorescencia se miden en una longitud de onda comprendida entre 480 y 600 nm en la que se observa la aparición de los tres picos de emisión típicos del complejo de Terbio.

En relación a ello, otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la identificación de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (kCDKCs) así como para la detección y cuantificación de ciclina en una muestra, preferiblemente Ciclina A, que comprende:

- a) un sensor fluorescente como los descritos en la presente invención y
- b) reactivos para la lisis de células.

Entendiéndose por reactivos para la lisis de células aquellos que son capaces de lesionar la membrana citoplasmática y la pared celular permitiendo la liberación del contenido intracelular. Como por ejemplo, métodos químicos (lisis alcalina), mecánicos (por rotura de material congelado) o físicos (sonicación) pero sin limitarse únicamente a estos ejemplos.

En una realización preferida la muestra es una muestra biológica aislada que puede proceder de un fluido fisiológico como sangre, plasma, suero u orina y/o cualquier tejido celular procedente de un organismo.

Un quinto aspecto de la presente invención es un método de obtención del sensor fluorescente que comprende:

- a. Protección de los grupos tertbutoxicarbonilmetil del compuesto DOTA.
- b. Síntesis del complejo péptido-DOTA-lantánido a partir del DOTA triprotegido en a), de una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 3 y de haluro de lantánido.

Como consecuencia de la detección de ciclina por mediación de los sensores fluorescentes propuestos en esta invención, otra posible aplicación de los mismos podría ser un método *in vitro* para identificar patologías que cursen con la alteración en la expresión de la proteína Ciclina, así como para evaluar su situación y pronosticar su evolución en muestras celulares.

Asimismo, otra aplicación podría ser un kit para la identificación de este tipo de patologías

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

Fig. 1. *Esquemas de los sensores sintetizados.*

Esquemas de los péptidos y los sitios de unión de los complejos DOTA[Tb(III)].

Fig. 2. *Representación esquemática de la emisión de fluorescencia producida por el complejo peptídico de Tb(III) en presencia de Ciclina A.*

La unión a la ciclina sitúa el centro metálico en las proximidades del residuo de Trp217 que actúa entonces como antena.

Fig. 3. *Representación del péptido unido en el surco hidrofóbico de ciclina.*

Se observa cómo el complejo del lantánido y Trp217 se encuentran próximos (aprox. 14 Å).

Fig. 4. *Espectro de fluorescencia del sensor 1, DOTA[Tb(III)]-GAKRRLIFE-NH<sub>2</sub>, en ausencia (Pept-Tb) y en presencia de Ciclina A (Pept-Tb-CyA).*

Fig. 5. *Espectro de fluorescencia del sensor 2, H<sub>2</sub>N-HA-Lys(DOTA[Tb(III)])-RRLIF-CONH<sub>2</sub>, en ausencia (Pept-Tb) y en presencia de Ciclina A (Pept-Tb-CyA).*

Fig. 6. *Espectro de fluorescencia del sensor 3, H<sub>2</sub>N-HA-Dap(DOTA[Tb(III)])-RRLIF-CONH<sub>2</sub>, en ausencia (Pept-Tb) y en presencia de Ciclina A (Pept-Tb-CyA).*

Fig. 7. Ensayo de desplazamiento añadiendo fracciones de una disolución de un péptido sin complejo fluorescente,  $H_2N$ -HAKRRLIF-CONH<sub>2</sub>, sobre la mezcla del sensor 1 y Ciclina A.

A medida que se añaden aliquotas del péptido 4 se produce el desplazamiento del péptido 1 del surco hidrofóbico de Ciclina A, y por tanto, disminuye la señal de fluorescencia debida a dicha interacción entre el complejo péptido de Tb(III) y la proteína.

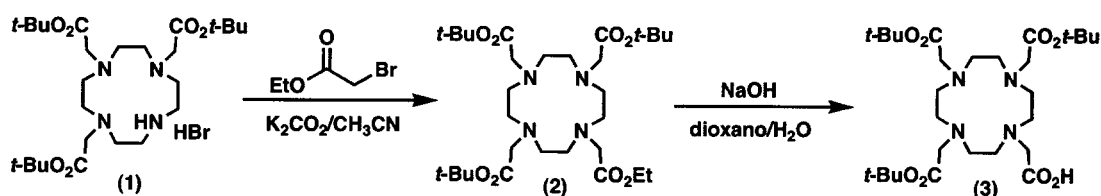
### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que desarrollan el método de obtención del sensor fluorescente, el mecanismo de acción de los sensores descritos así como la detección de inhibidores de Ciclina A.

#### Ejemplo 1

El método por el que se obtuvo el sensor fluorescente comprende:

a. Protección de los grupos tertbutoxicarbonilmetil del compuesto DOTA



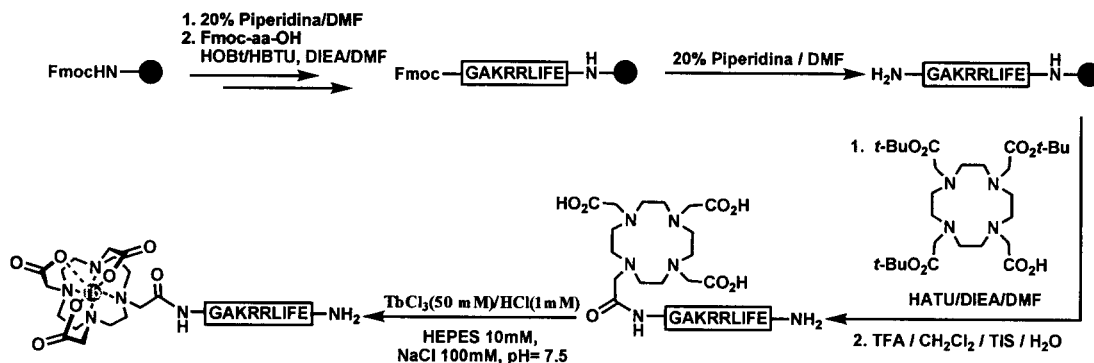
Esquema 1. Procedimiento sintético utilizando como sustancia de partida el hidrobromuro de tris(tert-butoxi carbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano.

Para sintetizar el ligando DOTA protegido (3), se partió del hidrobromuro de tris(tert-butoxicarbonilmetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (1) que se alquiló con bromoacetato de etilo en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro. La reacción se llevó a cabo en acetonitrilo a reflujo. A continuación fue necesario eliminar el exceso de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mediante filtración y con una posterior purificación en columna cromatográfica se obtuvo el producto 2 con un rendimiento del 99%.

A continuación se hidrolizó selectivamente el éster etílico del compuesto 2 utilizando una mezcla de dioxano:NaOH 0.1M en una proporción 3:1, dando lugar al producto deseado 3 con un rendimiento del 61%. Este producto fue acoplado a los péptidos sin posteriores purificaciones.

b. Síntesis del complejo péptido-DOTA-lantánido a partir del DOTA triprotegido en a), de una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 3 y de haluro de lantánido

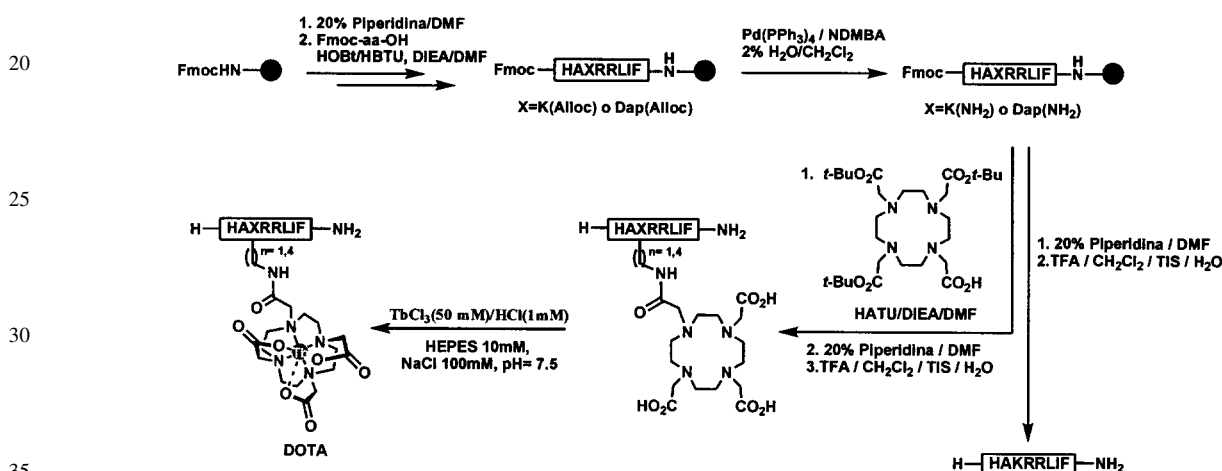
Para la síntesis del sensor (1), que contiene el DOTA-lantánido en el extremo N-terminal del péptido con secuencia SEQ ID NO: 1, se acopló en fase sólida el DOTA triprotegido utilizando procedimientos Fmoc estándar como se muestra en el esquema siguiente



Esquema 2. Síntesis del complejo SEQ ID NO: 1-DOTA-Terbio.

Una vez sintetizado el péptido con secuencia SEQ ID NO: 1 en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/tBu se procedió a la desprotección del extremo amino-terminal utilizando para ello las condiciones estándar de 20% piperidina en DMF. A continuación se acopló el derivado del DOTA previamente sintetizado, utilizando como agente de acoplamiento HATU en presencia de DIEA en DMF. Una vez realizado el acoplamiento se desprotegió una pequeña cantidad de la resina para su análisis por HPLC-MS en el que se observó la existencia de un pico correspondiente al producto deseado, por lo que se procedió a su purificación en HPLC en fase reversa. Después de liofilizar el péptido, éste se redisolvió en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.5 y se ensayó la formación del complejo de Terbio añadiendo una disolución de TbCl<sub>3</sub> (50 mM)/HCl (1 mM). El crudo de reacción se analizó utilizando HPLC-MS y se observó la existencia de un único pico correspondiente al complejo peptídico de Tb(III) que fue posteriormente repurificado mediante HPLC en fase reversa.

Para la síntesis de los sensores (2) y (3), se optó por la modificación en fase sólida de los péptidos con secuencia SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 respectivamente, totalmente protegidos, excepto en la funcionalidad seleccionada para la conjugación del DOTA. El ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap ó Dpr) o el residuo de Lys se introducen en el péptido con sus cadenas laterales protegidas por un grupo *alloc* que permite su eliminación ortogonal y la conjugación con el DOTA como se muestra en el esquema siguiente.



**Esquema 3. Síntesis de los complejos SEQ ID NO: 2-DOTA-Terbio y SEQ ID NO: 3-DOTA-Terbio. Nótese que el complejo DOTA-Terbio está acoplado en las cadenas laterales de Lys o Dap respectivamente.**

Una vez sintetizado el péptido en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/tBu se procedió a la eliminación del grupo *alloc* utilizando para ello condiciones catalíticas de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, ácido N-dimetilbarbitúrico y 2% H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A continuación se acopló el ligando quelatante DOTA previamente sintetizado, utilizando HATU como agente de acoplamiento en presencia de DIEA en DMF. Una vez realizado el acoplamiento se desprotegió una pequeña cantidad de la resina para su análisis por HPLC-MS en el que se observó la existencia de un pico correspondiente al producto deseado. A continuación se desprotegió el extremo amino-terminal utilizando para ello las condiciones estándar de 20% piperidina en DMF y se procedió a su purificación en HPLC en fase reversa. Después de liofilizar el péptido, éste se redisolvió en HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.5 y se ensayó la formación del complejo de Terbio añadiendo una disolución de TbCl<sub>3</sub> (50 mM)/HCl (1 mM). El crudo de reacción se analizó mediante HPLC-MS y se observó la existencia de un único pico correspondiente al complejo peptídico de Tb(III) que fue posteriormente repurificado mediante HPLC en fase reversa.

## Ejemplo 2

### Ensayo de fluorescencia del sensor 1 (DOTA[Tb(III)]-SEQ NO 1) en ausencia y en presencia de Ciclina A

Se utilizaron concentraciones de 2.5 µM tanto para los sensores como para la Ciclina A.

En la Fig 4 (Fig. 4) se puede observar el espectro de fluorescencia del sensor (1), DOTA[Tb(III)]-GAKRRLIFE-NH<sub>2</sub>, en ausencia y en presencia de Ciclina A y el espectro de un blanco de Ciclina A. Para registrar el espectro de fluorescencia se utilizó un filtro de 370 nm de paso largo para eliminar la banda del armónico del espectro.

En el espectro del sensor solo, entre 480 y 600 nm, no se observó ninguna banda significativa, sin embargo al añadir ciclina se observó la aparición de las tres bandas características de los complejos de Tb(III). Este resultado indica que el péptido del sensor está interaccionando con Ciclina A, de tal modo que se mantiene el complejo de Tb

(III) formado y que éste se encuentra a una distancia inferior a 20 Å permitiendo así la transferencia de energía entre Trp de la Ciclina A y el complejo de Tb(III).

#### 5 Ejemplo 3

*Ensayo de fluorescencia del sensor 2 (DOTA[Tb(III)]-SEQ NO 2) en ausencia y en presencia de Ciclina A*

10 En la Fig 5 (Fig. 5) se puede observar el espectro de fluorescencia del sensor 2, H<sub>2</sub>N-HA-Lys(DOTA[Tb(III)])-RRLIF-CONH<sub>2</sub>, (en el que el DOTA está unido al péptido a través de la cadena lateral de tipo amina de la Lisina, Lys), en ausencia y en presencia de Ciclina A y el espectro de un blanco de ciclina. Al igual que para el sensor 1 el espectro se registró utilizando un filtro de 370 nm de paso largo para eliminar la banda del armónico del espectro.

15 En el espectro del péptido solo, entre 480 y 600 nm no se observó ninguna banda significativa, sin embargo al añadir Ciclina A se observó la aparición de las tres bandas características de los complejos de Tb(III). Este resultado indica que el péptido está interaccionando con Ciclina A, de tal modo que se mantiene el complejo de Tb(III) formado y que éste se encuentra a una distancia inferior a 20 Å del Trp permitiendo así la transferencia de energía entre la antena y el complejo de Tb(III).

20 Se comparó este espectro con el del sensor (1) y se observó que la intensidad de las bandas características del Tb(III) para el sensor (2) era menor que en el caso del sensor (1). Este resultado sugiere que la distancia entre el ión y el Trp es mayor en el caso del sensor (2) que en el del sensor (1).

#### 25 Ejemplo 4

*Ensayo de fluorescencia del sensor 3 (DOTA[Tb(III)]-SEQ NO 3) en ausencia y en presencia de Ciclina*

30 En la Fig 6 (Fig. 6) se observa el espectro del sensor 3, H<sub>2</sub>N-HA-Dap(DOTA[Tb(III)])-RRLIF-CONH<sub>2</sub>, (en el que la unidad quelatante DOTA se encuentra unida al ácido 2,3-diaminopropiónico, Dap 6 Dpr, a través de la cadena lateral de tipo amina), en ausencia y en presencia de Ciclina A y el espectro del blanco de Ciclina A.

35 Al igual que en los casos anteriores, el péptido sólo no presentó ninguna banda de emisión entre 480 y 600 nm; sin embargo en este caso, al añadir Ciclina A no se observa la aparición de las bandas características de los complejos de Tb(III). Posiblemente esto se deba a que el DOTA se encuentra acoplado a una cadena lateral más corta y esto impide la interacción entre péptido y la Ciclina A, imposibilitando así la transferencia de energía.

#### Ejemplo 5

40 *Ensayo de desplazamiento añadiendo fracciones de una disolución de un péptido sin complejo fluorescente, H<sub>2</sub>N-HAKRRLIF-CONH<sub>2</sub>, sobre la mezcla del sensor 1 y Ciclina A*

45 Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores se realizó una valoración de la unión del sensor (1) y la Ciclina A. Para ello se añadieron alícuotas de 1 µL de la solución madre de Ciclina A (37 µM) sobre la disolución 1 µM del sensor (1).

50 En la Fig 7 (Fig. 7) se presenta el aumento en la emisión de la señal de fluorescencia a 545 nm. La emisión sigue el típico perfil de saturación y permitió calcular la constante de disociación (K<sub>D</sub> = 895). En las mismas condiciones se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento añadiendo fracciones de una disolución de un péptido sin complejo fluorescente, H<sub>2</sub>N-HAKRRLIF-CONH<sub>2</sub>, (sin complejo DOTA-Tb(III)) sobre la mezcla del sensor 1 y Ciclina A. A medida que se añadieron alícuotas del péptido se produjo el desplazamiento del sensor 1 del surco hidrofóbico de Ciclina A, y por tanto disminuyó la señal de fluorescencia debida a dicha interacción entre el complejo peptídico de Tb(III) y la proteína.

55 Este ejemplo demuestra que se pueden detectar inhibidores de Ciclina A por medio de la unión competitiva del sensor 1 y el propio inhibidor a la zona de reconocimiento de la proteína Ciclina A. Esta identificación se lleva a cabo por medio de la disminución del nivel de fluorescencia del sensor al aumentar la concentración de inhibidor, al ir produciéndose el desplazamiento del sensor fluorescente progresivamente.

60 Con el fin de testar la especificidad del sensor 1 en las condiciones biológicas más relevantes, se midió la emisión de dicho péptido con cantidades crecientes de Ciclina A en lisados celulares (concentración de 290 µg/mL de proteína total). El sensor 1 mostró una especificidad extraordinaria, no se observó emisión de fluorescencia hasta que se añadió la Ciclina A a la mezcla. La emisión total se vio ligeramente disminuida bajo estas condiciones.

65

REIVINDICACIONES

1. Sensor fluorescente que comprende,

c. un complejo DOTA-lantánido y

d. una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

2. Sensor fluorescente según la reivindicación 1, donde la secuencia es SEQ ID NO: 1 y se une al complejo por su extremo N-terminal.

3. Sensor fluorescente según la reivindicación 1, donde la secuencia es SEQ NO: 2 y se une al complejo por su cadena lateral de Lisina.

4. Sensor fluorescente según la reivindicación 1, donde la secuencia es SEQ NO: 3 y se une al complejo por la cadena lateral del residuo ácido 2,3- diaminopropiónico.

5. Sensor fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el lantánido es el Terbio.

6. Uso del sensor fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para identificar inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (kCDKCs).

7. Uso del sensor fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la detección y cuantificación *in vitro* de la proteína ciclina.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 donde la ciclina es Ciclina A.

9. Kit para la identificación de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (kCDKCs) en una muestra, que comprende un sensor fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y medios para la lisis de células.

10. Kit según la reivindicación 9 para la detección y cuantificación de ciclina en una muestra.

11. Kit según las reivindicaciones 9 y 10 donde la ciclina es Ciclina A.

12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9-11 donde la muestra es una muestra biológica aislada.

13. Método de obtención del sensor fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende,

a. La protección de los grupos tertbutoxicarbonilmetil del compuesto DOTA.

b. La síntesis del complejo péptido-DOTA-lantánido a partir del DOTA triprotegido en a), de una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ó SEQ ID NO: 3 y de haluro de lantánido.

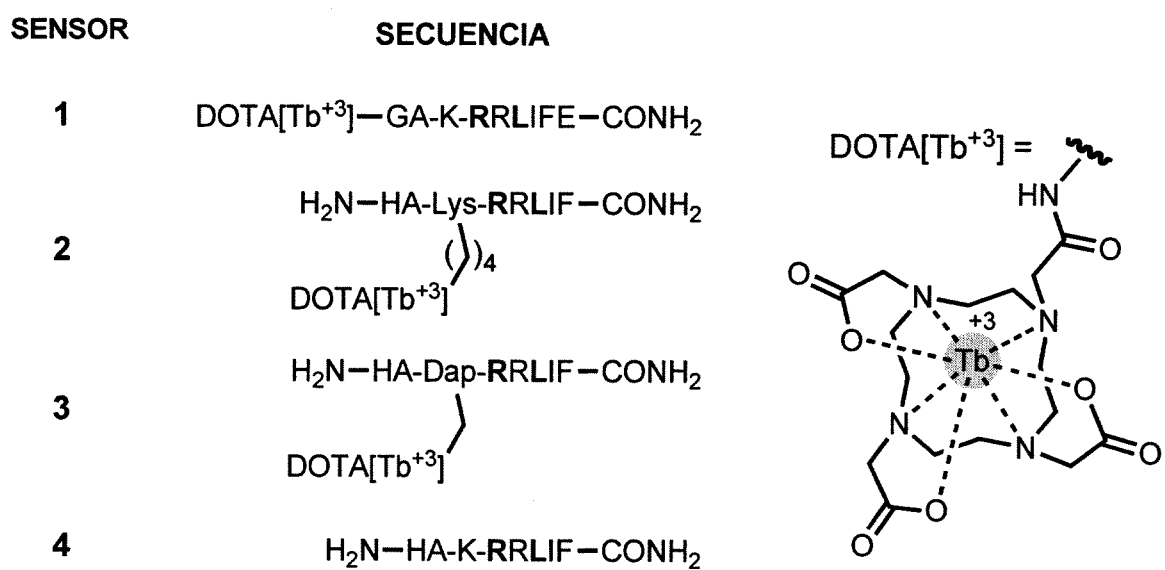


FIG. 1

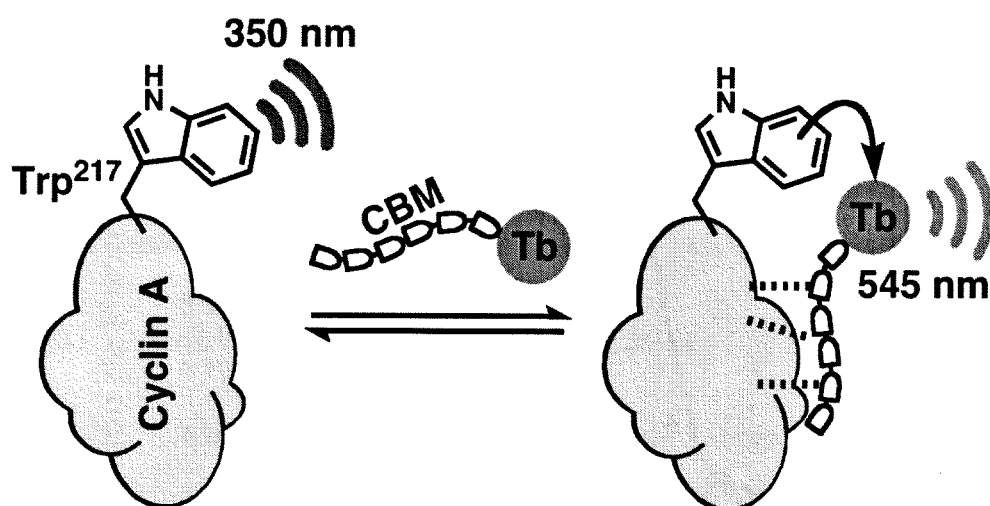


FIG. 2

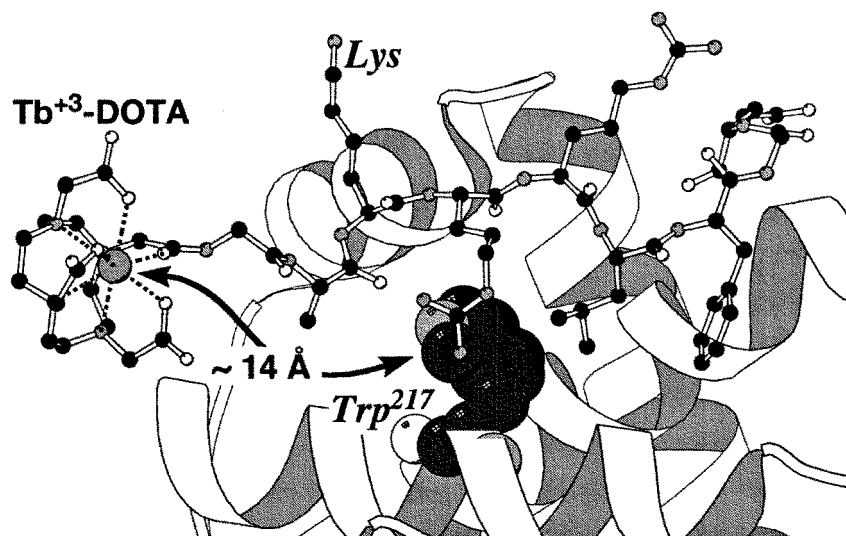


FIG. 3

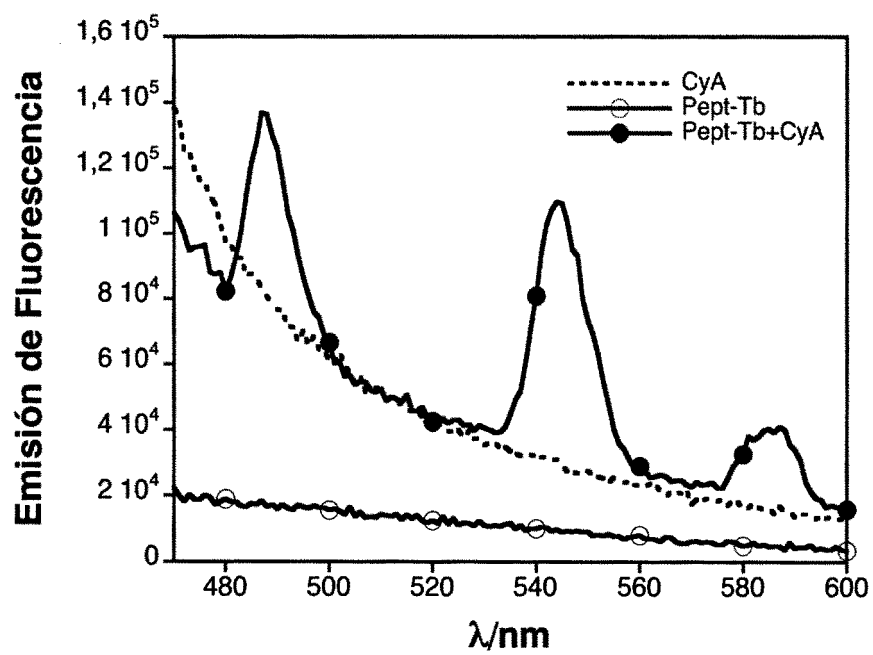


FIG. 4

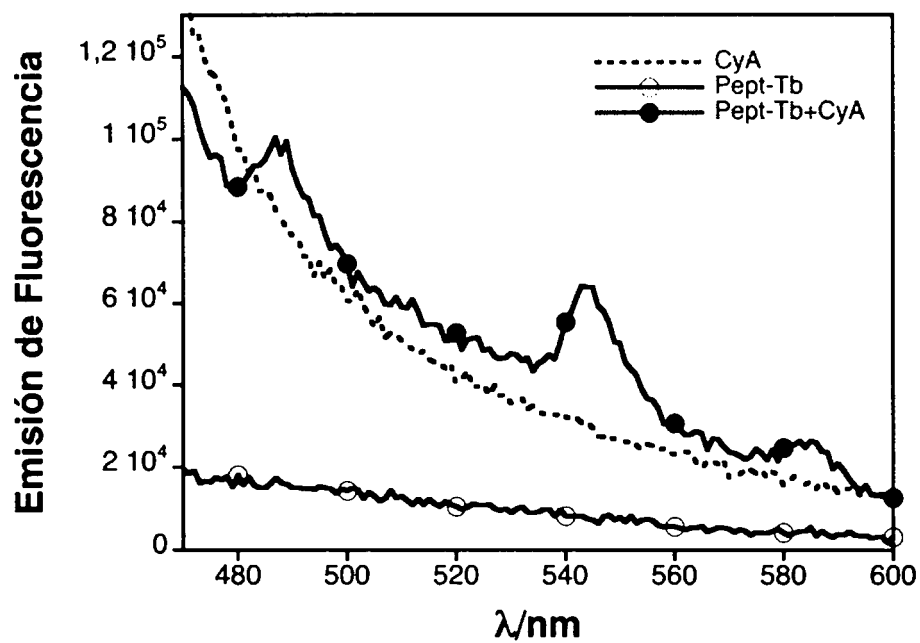


FIG. 5

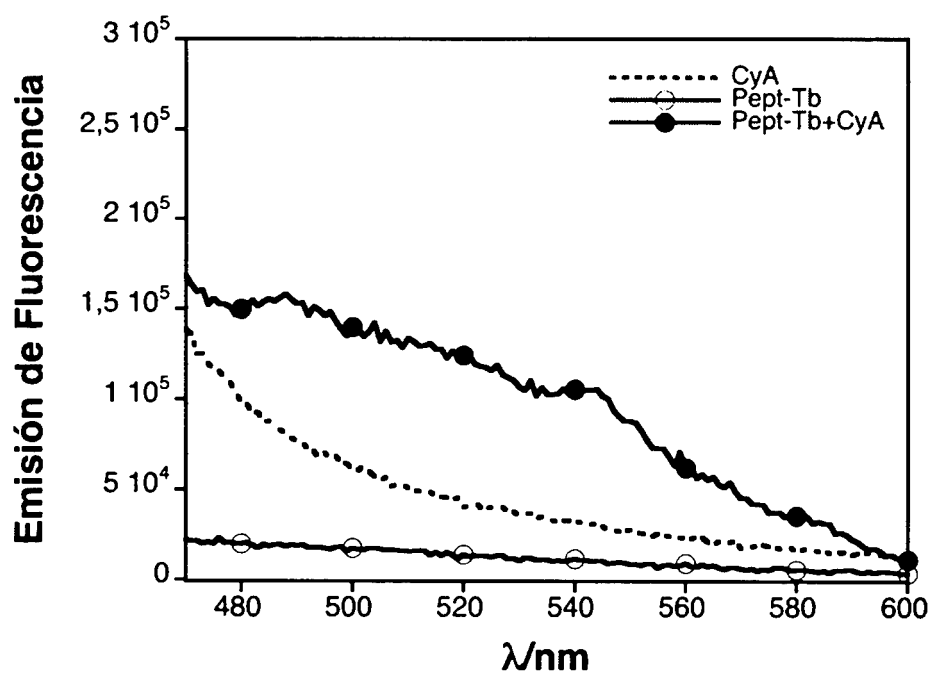


FIG. 6

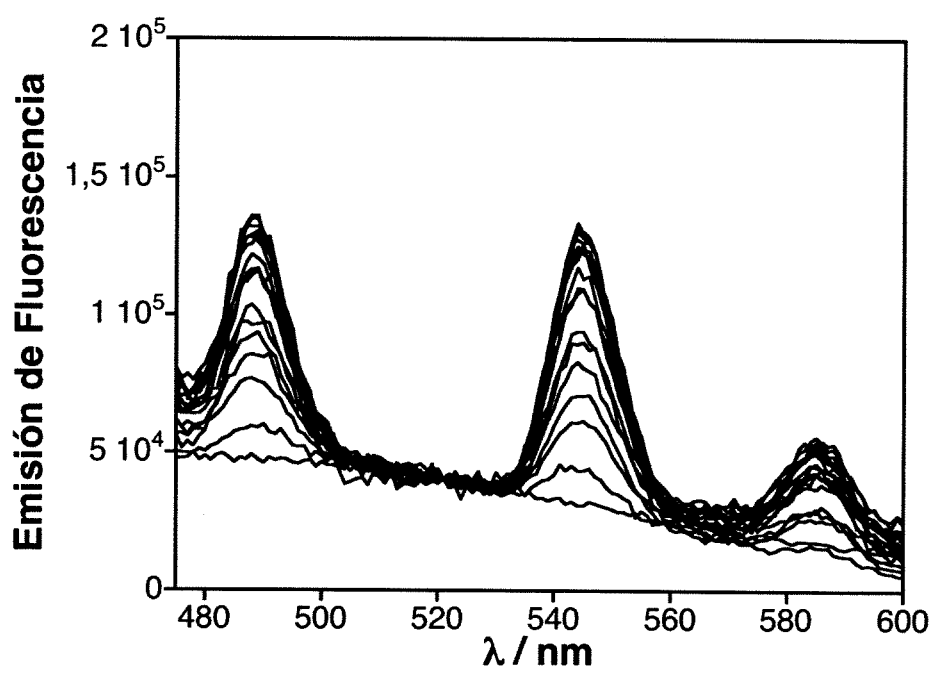


FIG. 7

# ES 2 331 286 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

5 <120> SENSOR FLUORESCENTE Y SU USO PARA LA DETECCIÓN DE INHIBIDORES DE KINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS y/o PARA LA DETECCIÓN DE CICLINAS

10 <130> ES1596.11

<160> 3

<170> Patenten version 3.5

15 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220> mat\_peptide

<223> péptido análogo a la proteína inhibidora p27/Kip1

25

<400> 1

Gly Ala Lys Arg Arg Leu Ile Phe Glu  
1 5

30

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220> mat\_peptide

40 <223> péptido análogo a la proteína inhibidora p27/Kip1

<400> 2

45

His Ala Lys Arg Arg Leu Ile Phe  
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220> mat\_peptide

55 <221> ácido 2,3-diaminopro iónico (Dpr)

<222> tercer aminoácido (3) del péptido.

<223> péptido análogo a la proteína inhibidora p27/Kip1

60

<400> 3

His Ala Dpr Arg Arg Leu Ile Phe  
1 5

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 331 286

⑫ Nº de solicitud: 200801912

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.06.2008

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑯ Documentos citados                                                                                                 | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | US 6589505 B1 (MARTIN F. ROUSSEL) 08.07.2003, columna 20, líneas 20-49; columna 22, líneas 1-23.                     | 1-13                       |
| A         | US 20050059100 A1 (CLAUDE F. MEARES) 17.03.2005, párrafos [7-8],[96-112],[139].                                      | 1-13                       |
| A         | WO 2005040802 A2 (CYCLACEL LIMITED) 06.05.2005, resumen; reivindicaciones 33-34.                                     | 1-13                       |
| A         | US 20050260730 A1 (PETER MARTIN FISCHER) 25.11.2005, reivindicaciones 1,8.                                           | 1-13                       |
| A         | WO 200800870 A1 (FUNDACION DE LA COMUNIDAD VALENCIANA, CENTRO DE INVESTIGACION PRINCIPE FELIPE) 03.01.2008, resumen. | 1-13                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.11.2009

Examinador

A. Santos Díaz

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N 33/533** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, DWPI, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2009

**Declaración**

|                                                      |                  |      |           |
|------------------------------------------------------|------------------|------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>                 | Reivindicaciones | 1-13 | <b>SÍ</b> |
|                                                      | Reivindicaciones |      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva<br/>(Art. 8.1 LP 11/1986)</b> | Reivindicaciones | 1-13 | <b>SÍ</b> |
|                                                      | Reivindicaciones |      | <b>NO</b> |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01       | US6589505                           | 09-07-2003        |
| D02       | US20050059100                       | 17-03-2005        |
| D03       | WO200504082                         | 06-05-2005        |

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la presente solicitud es un sensor fluorescente que comprende un complejo DOTA- lanthanido y una secuencia peptídica (SEQ 1 o SEQ2 o SEQ 3) y su uso para detectar in vitro ciclina o inhibidores de ciclina. Un kit para identificación de inhibidores de kinasas dependientes de ciclina, un kit para la detección y cuantificación de ciclina y un método para la obtención del sensor.

D01 describe de una manera general métodos de screening en los que proteínas p27kip1 (proteínas inhibidora kinasa dependientes de ciclina) pueden marcarse con lantánidos quelados.

D02 se refiere a péptidos inhibidores de los complejos CDK/ciclina específicos para regiones específicas de p21WAF1 (proteínas inhibidora kinasa dependientes de ciclina) y miméticos de estas regiones. En las reivindicaciones 33 - 35 se hace referencia a que el péptido mimético puede estar marcado para emitir una señal de fluorescencia.

D03 divulga composiciones y métodos para detectar, analizar e identificar biomoléculas utilizando un marcador que comprende un ion lantanido y un agente quelante que puede ser DOTA.

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 Y 8.1 LP)****1.1 REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 12**

Ninguno de los documentos citados tomados en consideración individualmente o en combinación, divulgan un sensor fluorescente que comprende un complejo DOTA- lanthanido y una secuencia peptídica (SEQ 1 o SEQ2 o SEQ 3).

En consecuencia las reivindicaciones de la 1 a la 12 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

## CORRECCIÓN DE ERRATAS DEL FOLLETO DE PATENTE (IET)

- ⑪ N° de publicación : ES 2 331 286 A1  
⑫ Número de solicitud: 200801912  
⑬ Fecha de publicación de la solicitud: 28.12.2009  
⑭ Int. Cl.: **G01N 33/533** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
G01N 33/58 (2006.01)  
C07K 7/06 (2006.01)

| Pág/Línea | Errata/Omisión             | Corrección                  |
|-----------|----------------------------|-----------------------------|
| 4/5       | D01 US6589505 09.07.2003   | D01 US6589505 08.07.2003    |
| 4/7       | D03 WO200504082 06.05.2005 | D03 WO2005040802 06.05.2005 |