

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 669**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/42 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08801776 .9**
96 Fecha de presentación: **01.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2201129**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **ENSAYO GENÉRICO DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD QUINASA/FOSFATASA CON UNA ÚNICA LECTURA.**

30 Prioridad:
10.09.2007 EP 07115987

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**ENDERLE, Thilo y
ROTH, Doris**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

ES 2 368 669 T3

DESCRIPCIÓN

Ensayo genérico de detección de actividad quinasa/fosfatasa con una única lectura

- 5 La presente invención se refiere a un ensayo genérico para detectar la actividad quinasa o fosfatasa y su utilización en las ciencias de la vida y en el descubrimiento de fármacos.

10 Durante los últimos años se han desarrollado varios métodos para la detección de la fosforilación (actividad quinasa) o desfosforilación (actividad fosfatasa) de péptidos o proteínas para su utilización en la farmacología in vitro y cribado de alto rendimiento (HTS). Lo más atractivo de estas aplicaciones son los métodos de detección de
15 marcajes fluorescentes que son, ensayos de mezclar y leer homogéneos y que son los adecuados para la miniaturización. Los ensayos más comunes se basan en la unión de un anticuerpo específico al grupo fosfato, no obstante los ensayos basados en anticuerpos no son genéricos ya que los anticuerpos para la fosfoserina o fosfotreonina son específicos de secuencia. Los ensayos basados en la afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAP) están libres de anticuerpos y de esta manera son genéricos.

20 WO 2007/016975 describe un ensayo FRET quinasa y fosfatasa que consiste en tres partes: una pareja de unión, una molécula de detección que está marcada con un donador o un aceptor de una pareja de FRET y una molécula de sustrato que está marcada con un donador o un aceptor de la pareja de FRET. La unión de la molécula de detección y la molécula de sustrato fosforilado en la superficie de la pareja de unión resulta en una señal FRET detectable.

25 La WO 2006/102129 describe un ensayo para la detección de sustratos fosforilados y defosforilados que utilizan polímeros fluorescentes recubiertos, cuentas catiónicas y una molécula de sustrato que comprende un segundo fluoróforo que actúa como bloqueador del polímero fluorescente inmovilizado sobre las cuentas catiónicas. Este ensayo consiste de dos entidades moleculares: a) microesferas catiónicas recubiertas con un fluoróforo y b) una molécula de sustrato que comprende un fluoróforo. La entidad de bloqueo es un colorante de transferencia de energía o de transferencia de electrones, por ejemplo una tinción fluorescente como BODIPY TMR, y el fluoróforo es un polímero fluorescente.

30 Otro ensayo genérico para la detección de una actividad quinasa es el ensayo Transcreeener en el que se mide la producción de ADP. En todos estos ensayos la detección de actividad quinasa/ fosfatasa está basada en la polarización de la fluorescencia (FP) o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, TR-FRET, HTRF).

35 Estas medidas de fluorescencia, no obstante, requieren de múltiples lecturas de diferentes parámetros ópticos como polarización, longitudes de onda, detección retrasada en el tiempo, que requiere una instrumentación más sofisticada que una simple medida de intensidad de fluorescencia. Los ensayos ADP son solo adecuados para altas concentraciones de ATP/ ADP y un alto recambio de la enzima y uno podría salirse fácilmente del rango lineal de la
40 reacción. Además la detección es solo indirecta, ya que el consumo de ATP/ ADP monitorizado puede no ser específico y no la (de)fosforilación del sustrato de la fosfatasa o quinasa específica.

45 Por lo tanto, existe una necesidad para un ensayo quinasa y fosfatasa genérico mejorado permitiendo una detección eficiente de la actividad quinasa o fosfatasa.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para detectar una actividad quinasa o fosfatasa que cumpla este requisito mediante una lectura de fluorescencia robusta y fiable.

50 Este método comprende los siguientes pasos:

a) incubar una muestra de actividad quinasa o fosfatasa con una molécula de sustrato quinasa o fosfatasa que comprende un fluoróforo que posee un marcador detectable,

55 b) incubar la mezcla del paso a) con una entidad de detección que comprende un grupo aromático que se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina, y una pareja de unión, en el que ambas moléculas de sustrato fosforilado y la entidad de detección son capaces de unirse a la pareja de unión y la unión de la molécula de sustrato y la entidad de detección a la pareja de unión conduce a una lectura alterada del fluoróforo, en el que la lectura alterada del fluoróforo se debe a un bloqueo estático o dinámico que resulta de la interacción directa de los orbitales moleculares del fluoróforo de la molécula sustrato y el grupo aromático de la entidad de
60 detección, y

c) medir la lectura del fluoróforo en la mezcla del paso b), en el que una lectura alterada del fluoróforo comparado con un blanco es indicativo de la presencia de una actividad quinasa o fosfatasa en la muestra.

65 En un segundo objeto, la presente invención está dirigida a un método para detectar una actividad quinasa o actividad fosfatasa. Dicho método comprende los siguientes pasos:

a) incubar una muestra de actividad quinasa o fosfatasa con una molécula sustrato que comprende un grupo aromático que se selecciona del grupo que consiste en los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina,

5 b) incubar la mezcla del paso a) con una entidad de detección que comprende un fluoróforo que posee un marcador detectable, y una pareja de unión, en el que ambas moléculas de sustrato fosforilado y la entidad de detección puede unirse a la pareja de unión y la unión de la molécula sustrato y la entidad de detección a la pareja de unión conduce a una lectura alterada del fluoróforo, en la que la lectura alterada del fluoróforo se debe a un bloqueo estático o dinámico que resulta de la interacción directa de los orbitales moleculares del fluoróforo de la entidad de
10 detección y el grupo aromático de la molécula sustrato, y

c) medir la lectura del fluoróforo en la mezcla del paso b), en el que una lectura alterada del fluoróforo comparado con un blanco es indicativo de la presencia de una actividad quinasa o fosfatasa en la muestra.

15 En una realización de la presente invención, el fluoróforo se selecciona de entre el grupo que consiste en Fluoresceína, Rodamina B, Tetrametilrodamina, ATTO 590, ATTO 655, ATTO 680, Atto 700, MR 121, Bodipy 630/650 y Bodipy FL. Los fluoróforos preferibles se seleccionan de entre el grupo que consiste en MR 121, ATTO 590, ATTO 655, Atto 680 y ATTO 700. Los fluoróforos particularmente preferibles para utilizar en un método de la presente invención son MR 121 y Atto 700. Las estructuras moleculares de algunos de estos fluoróforos pueden
20 encontrarse en Bioconjugate Chem. 2003, 14, 1133-1139. Las moléculas ATTO están comercialmente disponibles de Atto-Tec GmbH, Siegen, Alemania.

En una realización de la presente invención el grupo aromático es triptófano.

25 En otra realización de la presente invención la unión de la molécula sustrato y la entidad de detección a la pareja de unión involucran interacciones iónicas.

En otra realización de la presente invención la pareja de unión se selecciona a partir de iones metálicos de ácidos de Lewis duros o sólidos como cuentas con iones en su superficie.

30 En otra realización de la presente invención la entidad de detección es un péptido que comprende fosfotirosina y/o fosfoserina y/o fosfotreonina.

35 En otra realización de la presente invención la molécula sustrato es un péptido que comprende al menos una tirosina y/o serina y/o treonina.

En otra realización de la presente invención el método es para detectar una actividad tirosina quinasa y el péptido sustrato comprende al menos una tirosina.

40 En otra realización de la presente invención el método es para detectar una actividad serina quinasa y el péptido sustrato comprende al menos una serina.

En otra realización de la presente invención el método es para detectar una actividad treonina quinasa y el péptido sustrato comprende al menos una treonina.

45 En otra realización de la presente invención el método es para detectar una actividad fosfatasa y la molécula sustrato es un péptido que comprende grupos fosfato, preferiblemente fosfotirosina o fosfoserina o fosfotreonina.

En otra realización de la presente invención la lectura del fluoróforo es la intensidad de fluorescencia.

50 Descripción detallada de la invención

El término "actividad quinasa" tal como se utiliza aquí se refiere a una fosforilación de un sustrato mediante una quinasa.

55 El término "actividad fosfatasa" tal como se utiliza aquí se refiere a una defosforilación de un sustrato mediante una fosfatasa.

60 Tal como se utiliza aquí "fluoróforo" se refiere a un componente de una molécula que provoca que una molécula sea fluorescente. Es un grupo funcional en una molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y reemite energía en una longitud de onda diferente (pero igualmente específica).

El término "molécula sustrato" tal como se utiliza aquí se refiere a una molécula que está modificada por una quinasa o una fosfatasa.

65

Tal como se utiliza aquí "entidad de detección" se refiere a una molécula que es portadora de un marcaje con una lectura detectable, es decir un fluoróforo, o a una molécula que comprende un grupo aromático, por ejemplo. tirosina, triptófano, cGMP, derivado de cAMP.

- 5 Tal como se utiliza aquí "pareja de unión" se refiere a una entidad, por ejemplo una molécula, que es capaz de unirse a ambas, a la molécula sustrato fosforilada y a la entidad de detección.

La presente invención describe un ensayo genérico quinasa/ fosfatasa que está basado en el hecho que los fluoróforos por ejemplo el colorante oxazina MR121 o Atto 700, se bloquean con eficacia con moléculas que poseen un grupo aromático, por ejemplo triptófano que forma un complejo de estado basal no fluorescente. La idea es llevar a la entidad con un grupo aromático y al fluoróforo cercano para bloquear por interacción directa de los orbitales moleculares – ya sea mediante la formación de un complejo de estado basal no fluorescente ("bloqueo estático") o bloqueo colisional ("bloqueo dinámico") – puede suceder mediante la entidad que comprende el grupo aromático y la entidad fluoróforo a una pareja de unión.

En una comparación con los ensayos de bloqueo existentes, la ventaja de dicho mecanismo de bloqueo sobre la interacción dipolo-dipolo como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es que la longitud de interacción es mucho más corta y el bloqueo sucede solo a concentraciones locales muy altas, normalmente mM. Para la transferencia de energía un solapamiento de espectro entre un donador y un aceptor es necesaria. Esto significa un doble marcaje con dos moléculas adecuadas y una absorbancia restante de la emisión donadora si el aceptor esta libre en la solución. En general, el sistema de bloqueo más favorito aquí descrito conduce a señales menos inespecíficas y una mayor sensibilidad.

El grupo aromático o el fluoróforo es parte del péptido sustrato para la actividad quinasa o fosfatasa investigada mientras que el otro es parte de la entidad de detección. La pareja de unión se une al péptido sustrato fosforilado y la entidad de detección pero no el péptido sustrato no fosforilado como una actividad quinasa se mide mediante un descenso de la lectura del fluoróforo (intensidad de fluorescencia) mientras que una actividad fosfatasa provoca un aumento de la lectura del fluoróforo (intensidad de fluorescencia). La lectura del fluoróforo puede por ejemplo puede ser intensidad de fluorescencia, polarización de fluorescencia, distribución de la emisión de la longitud de onda o tiempo de vida de la fluorescencia.

La pareja de unión es una entidad que puede unir grupos fosfato, preferiblemente iones metálicos de ácidos de Lewis duros (por ejemplo In^{3+}) o sólidos como cuentas con iones sobre la superficie (por ejemplo cuentas de IMAP), o similar.

La Figura 1 muestra el principio del ensayo para un ejemplo de sustrato quinasa marcado con un fluoróforo adecuado (por ejemplo MR121 o Atto 700) y una entidad de detección que contiene un grupo fosfato y triptófano. El sustrato está fosforilado por la quinasa. Cuando la reacción bioquímica ha agotado la pareja de unión y la entidad de detección se añade se mide la fluorescencia. Cuanto más sustrato está fosforilado menos es la fluorescencia que se detecta.

La lectura robusta y sensible de la fluorescencia y la forma fácil y sencilla de utilizar el protocolo hace que el ensayo de la presente invención también sea sensible para la miniaturización del ensayo, por ejemplo ya sea en placas microtituladas de alta densidad o para el procesamiento y lectura en sistemas de microfluidos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el principio general del ensayo. Un sustrato marcado de forma fluorescente (marcado con por ejemplo MR121 o Atto 700) está fosforilado por la quinasa. Para la detección del sustrato fosforilado se añaden al sustrato una pareja de unión y una entidad de detección que contienen un grupo fosfato y triptófano. Ambos, el sustrato fosforilado y la entidad de detección se unen a la pareja de unión conduciendo a un bloqueo de la fluorescencia por el triptófano;

La Figura 2 muestra el descenso de la fluorescencia de MR121 () y de Atto 700 () en presencia de InCl_3 . Se mezclaron MR121-CGpY 20 nM o Atto 700-CGpY con WGpY 1 μM y se midieron diferentes concentraciones de InCl_3 y la fluorescencia de MR121 y Atto 700. El bloqueo máximo para la entidad MR121 (20% de la fluorescencia inicial de MR121) se alcanzó a una concentración de InCl_3 entre 40 μM y 60 μM y para la entidad Atto 700 (15% de la fluorescencia inicial Atto 700) entre 10 μM y 100 μM (b);

La Figura 3 muestra una titulación de WGpY a concentraciones constantes de MR121-CGpY y InCl_3 (MR121-CGpY 20 nM, InCl_3 50 μM). El bloqueo máximo se alcanza a WGpY 700 nM;

La Figura 4 muestra una titulación de MR121-CGpY a concentraciones constantes de WGpY y InCl_3 (WGpY 800 nM, InCl_3 50 μM);

La Figura 5 muestra entre un 0% y un 100% de fosforilación del péptido MR121-CGY mediante la mezcla de MR121-CGpY y MR121-CGY respectivamente. Se utilizaron WGpY 800 nM y InCl₃ 50 μM como entidad de detección y pareja de unión. La intensidad de fluorescencia disminuye con el aumento de la fosforilación hasta un 20% de la fluorescencia inicial. El factor z' (cruces) está por encima de 0,5 para > 20% y por encima de 0,7 para > 40% de fosforilación y

La Figura 6 muestra una titulación de WGpY (a) y cuentas de IMAP (b) a una concentración constante de MR121-CGpY (concentración final de 20 nM). Para (a) la dilución de las cuentas de IMAP fue de 1:1000, para (b) la concentración final de WGpY fue de 80 μM. La intensidad de fluorescencia disminuye con el aumento de la concentración de WGpY hasta el 20% de la intensidad inicial a WGpY 80 μM. Con una dilución de las cuentas de 1:500 o 1:1000 la intensidad de fluorescencia se bloquea igualmente hasta un 20% de la intensidad inicial, con diluciones de cuentas superiores, el bloqueo es menos eficiente.

Materiales y métodos

Todos los sustratos de péptidos se sintetizaron con una pureza del 95% a partir de Biosyntan GmbH, Berlin. La forma reactiva del fluoróforo MR121 se proporcionó por Roche Diagnostics, Penzberg y de Atto 700 por Atto-Tec GmbH, Siegen, Alemania. El acoplamiento covalente de MR121- maleimida y Atto 700-maleimida al grupo sulfhidrido del residuo de cisteína del péptido sustrato se realizó localmente siguiendo un protocolo estándar para el marcaje con sustratos de maleimida y se purificaron en un HPLC analítico (Merck Hitachi D-6000) utilizando una columna C18 (Marchery-Nagel, cc125/4, Nucleosil 100-5, protección 1).

Cuando se utiliza InCl₃ (Sigma-Aldrich Co., N° Catálogo 303440) como pareja de unión, el tampón de reacción fue NaAc/HAc 100 mM (NaAc anhidro, >99%, S8750, Sigma-Aldrich Co.) a pH 5,2. Con cuentas de IMAP como pareja de unión, el tampón fue 1x IMAP 80% tampón de unión A y 1x IMAP 20% tampón de unión B proporcionados con el equipo IMAP (Molecular Devices, 1311 Orleans Drive, Sunnyvale, CA 94089). Para todos los experimentos se mezclaron 10 μl de la entidad de triptófano, 10 μl de la entidad de fluoróforo y 20 μl de la pareja de unión proporcionando un volumen total de ensayo de 40 μl. Antes de leer la intensidad de fluorescencia, la placa se incubó durante 60 minutos a TA en la oscuridad.

Todas las mediciones se realizaron en placas microtituladas de 384 pocillos (Cornig B.V., Koolhovenlaan 12, 1119 Schiphol-Rijk, Países Bajos, N° de ref. 3723, placa óptica universal, transparente, superficie antiadherente). Todas las mediciones de intensidad de fluorescencia se llevaron a cabo mediante un lector de placas de visión multimodo (Evotec Technologies GmbH, Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburgo, Alemania) equipado con un arco de lámpara de Xe de alta presión con un filtro de excitación a 630 nm (amplitud de banda de 50 nm) y un filtro de emisión a 695 nm (amplitud de banda 55 nm) para MR121 y un filtro de excitación a 655 nm (amplitud de banda 50 nm) y un filtro de emisión a 710 nm (amplitud de banda 40 nm) para Atto 700. La intensidad de fluorescencia se ajustó a alrededor del 60% de la señal máxima de la cámara de CCD utilizada mediante el uso de filtros de atenuación y variando los tiempos de exposición.

Resultados

A. InCl₃ como pareja de unión

PO₃²⁻ es una base dura de Lewis y forma complejos de iones metálicos de ácidos duros de Lewis. Los oxígenos de los grupos fosfato pueden coordinarse en un ion metálico único o entrecruzar algunos iones metálicos para formar un complejo de tipo polimérico. Los iones metálicos de ácidos duros de Lewis pueden utilizarse de esta forma como pareja de unión para atraer muy cerca a la entidad de fluoróforo y a la entidad de triptófano para formar un complejo de estado basal no fluorescente. Para probar este principio, se utilizaron péptidos cortos como entidad de fluoróforo y de triptófano que contenían fosfotirosina, tirosina y/o triptófano, respectivamente. Como entidad de fluoróforo se utilizaron péptidos de la secuencia Cys-Gly-Tyr fosforilados y no fosforilados marcados con MR121 y Atto 700 en el residuo de Cys (MR121-CGY, MR121-CGpY, Atto 700-CGY y Atto 700-CGpY de aquí en adelante) y la entidad de detección fue un péptido de la secuencia Trp-Gly-pTyr en el que el pTyr es una tirosina fosforilada (WGpY de aquí en adelante). La Figura 2 muestra una titulación de InCl₃ como pareja de unión en concentraciones fijas de MR121-CGpY o Atto 700-CGpY y WGpY (concentraciones finales: MR121-CGpY 20 nM, Atto 700-CGpY 20 nM, WGpY 1 μM). La emisión de fluorescencia de MR121 se bloqueó al 20% de la fluorescencia inicial de MR121 (fluorescencia en ausencia de InCl₃) en presencia de 50 μM a 100 μM de InCl₃. Con concentraciones superiores de InCl₃, la fluorescencia de MR121 aumentó hasta el 70% de la fluorescencia de MR121 inicial (Figura 2a) indicando que la entidad MR121 y la entidad de triptófano ya no están unidas al mismo complejo-In. La Figura 2b muestra una ampliación de 10 μM a 140 μM de InCl₃ para encontrar la concentración óptima de InCl₃. La fluorescencia de Atto 700 se paró al 15% de su fluorescencia inicial también con InCl₃ 10 μM. Similar a la entidad MR121 la fluorescencia de Atto 700 aumenta de nuevo con concentraciones superiores de InCl₃. Todos los experimentos posteriores se realizaron con InCl₃ 50 μM y la entidad MR121. En el siguiente paso la concentración de WGpY se optimizó. La Figura 3 muestra una titulación de WGpY con MR121-CGpY 20 nM (conc. final) y InCl₃ 50 μM (conc. final). A WGpY 700 nM la intensidad de fluorescencia alcanza su mínimo (Fig. 3b). Con concentraciones superiores de MR121-

CGpY la intensidad de fluorescencia aumenta ligeramente (a partir del 30% de la intensidad inicial a 20 nM hasta el 45% a 100 nM) (Figura 4). En un experimento final se midió la intensidad de fluorescencia entre el 0% y el 100% de sustrato de fosforilación (Figura 5). MR121-CGpY y MR121-CGY se mezclaron para proporcionar MR121-CG(p)Y a una concentración final de 20 nM con cantidades crecientes de péptido fosforilado. Se utilizó WGpY 800 nM como entidad de detección y InCl₃ 50 μ M como pareja de unión. La intensidad de fluorescencia disminuyó de forma lineal con el aumento de la fosforilación desde el 100% al 20% de la intensidad inicial. Como medida de la calidad del ensayo, se calculó el factor z' . A partir del 20% de fosforilación sobre el factor z' estando por encima de 0,5 (valor teórico máximo = 1) y a partir del 40% por encima de 0,7.

10 B. Cuentas de IMAP como pareja de unión

Para los experimentos con cuentas de IMAP como pareja de unión, se utilizaron los mismos péptidos modelo cortos, MR121 y la entidad de triptófano como cuando InCl₃ es la pareja de unión. Con un diámetro de <100 nm las cuentas de IMAP son significativamente superiores a los iones In³⁺ y así una concentración 4 veces superior de WGpY es necesaria para lograr un buen bloqueo de la entidad MR121. Aunque las cuentas de IMAP no funcionan tan bien como el InCl₃ en el sentido que son necesarias concentraciones superiores de reactivo, el nuevo ensayo más sensible permite utilizar al sistema como una pareja de unión. La Figura 6a muestra el descenso de la intensidad de MR121-CGpY 20 nM con aumento de la concentración de WGpY con cuentas de IMAP diluidas 1:1000. A WGpY 80 μ M la fluorescencia de MR121 está bloqueada al 20% de la intensidad inicial. A una concentración constante de WGpY 80 μ M, mayores diluciones de cuentas de IMAP no conducen a un mejor bloqueo (Fig. 6b), la dilución óptima recae entre 1:500 y 1:1000.

Conclusiones

Con los ejemplos descritos aquí demostramos que la actividad quinasa o fosfatasa puede detectarse mediante la medición de un descenso (quinasa) o aumento (fosfatasa) de la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo adecuado (por ejemplo MR121, Atto 700). El bloqueo del fluoróforo mediante triptófano siendo un bloqueo estático mediante la formación de un complejo en estado inicial no fluorescente o bloqueo colisional en un rango de interacción corto que asegura que ocurre solo si la entidad del fluoróforo y la entidad del triptófano está unida a la pareja de unión. Esto está en contra de una medición normal de FRET en la que debe haber absorción de la emisión de donación mediante el aceptor también sin la unión a la pareja de unión a altas concentraciones de los fluoróforos. Similar a las mediciones de FP solo es necesario un marcaje para el ensayo de bloqueo descrito aquí pero mientras que en FP son necesarias dos lecturas la medición del bloqueo de la fluorescencia requiere solo una única lectura. La lectura robusta y sensible de la fluorescencia y la simplicidad y facilidad de uso del protocolo hace que este ensayo sea adecuado por ejemplo en placas microtituladas de alta densidad o para procesar y leer en un sistema de microfluidos. Gracias a los fluoróforos utilizados, por ejemplo MR121 y Atto 700, que se excitan en el espectro del rojo con una emisión de fluorescencia cerca del infrarrojo, se ha demostrado que son muy sensibles y muestran una interferencia mínima con la autofluorescencia de por ejemplo compuestos, material biológico y plástico. Los tres componentes – la entidad de fluoróforo, la entidad de triptófano y la pareja de unión – pueden titularse entre ellos para encontrar las condiciones óptimas para cada ensayo proporcionando una flexibilidad única.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una actividad quinasa o actividad fosfatasa que comprende los pasos:
 - 5 a) incubar una muestra con actividad quinasa o fosfatasa con una molécula sustrato quinasa o fosfatasa que comprende un fluoróforo con un marcaje detectable,
 - 10 b) incubar la mezcla del paso a) con una entidad de detección que comprende un grupo aromático que se selecciona de entre el grupo que consiste en los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina, y una pareja de unión, en la que ambas molécula de sustrato fosforilado y la entidad de detección son capaces de unirse a la pareja de unión y la unión de la molécula sustrato y la entidad de detección a la pareja de unión conduce a una lectura alterada del fluoróforo, en el que la lectura alterada del fluoróforo se debe al bloqueo estático o dinámico que resulta de la interacción directa de orbitales moleculares del fluoróforo de la molécula sustrato y el grupo aromático de la entidad de detección, y
 - 15 c) medir el marcaje del fluoróforo en la mezcla del paso b), en el que una lectura alterada del fluoróforo en comparación con el blanco es indicativo de la presencia de una actividad quinasa o fosfatasa en la muestra.
2. Un método para detectar una actividad quinasa o actividad fosfatasa que comprende los pasos:
 - 20 a) incubar una muestra con actividad quinasa o fosfatasa con una molécula sustrato que comprende un grupo aromático que se selecciona de entre el grupo que consiste en los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina,
 - 25 b) incubar la mezcla del paso a) con una entidad de detección que comprende un fluoróforo con un marcaje detectable, y una pareja de unión, en la que ambas molécula de sustrato fosforilado y la entidad de detección pueden unirse a la pareja de unión y la unión de la molécula sustrato y la entidad de detección a la pareja de unión conduce a una lectura alterada del fluoróforo, en la que la lectura alterada del fluoróforo se debe a un bloqueo estático o dinámico que resulta de la interacción directa de orbitales moleculares del fluoróforo de la entidad de detección y el grupo aromático de la molécula de sustrato, y
 - 30 c) medir el marcaje del fluoróforo en la mezcla del paso b), en el que una lectura alterada del fluoróforo en comparación con el blanco es indicativo de la presencia de una actividad quinasa o fosfatasa en la muestra.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el fluoróforo se selecciona de entre el grupo que consiste en Fluoresceína, Rodaminea B, TMR, ATTO 590, ATTO 655, ATTO 680, Atto 700, MR 121, Bodipy 630/650 y Bodipy FL, más preferiblemente del grupo que consiste en ATTO 590, ATTO 655, ATTO 680, Atto 700 y MR 121.
4. El método molecular de la reivindicación 3, en el que el fluoróforo es MR 121 o Atto 700.
5. El método de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el grupo aromático es triptófano.
6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la unión de la molécula sustrato y la entidad de detección a la pareja de unión involucra interacciones iónicas.
7. El método de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el pareja de unión se selecciona de iones metálicos de ácidos de Lewis duros o sólidos como cuentas con iones en su superficie.
8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la entidad de detección es un péptido que comprende fosfotirosina y/o fosfoserina y/o fosfotreonina.
9. El método de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la molécula sustrato es un péptido que comprende al menos una tirosina y/o serina y/o treonina.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el método es para detectar a tirosina quinasa actividad y el péptido sustrato comprende al menos una tirosina.
11. El método de la reivindicación 9, en el que el método es para detectar a serina quinasa actividad y el péptido sustrato comprende al menos una serina.
12. El método de la reivindicación 9, en el que el método es para detectar una actividad treonina quinasa y el péptido sustrato comprende al menos una treonina.

13. El método de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el método es para detectar una actividad fosfatasa y la molécula sustrato es un péptido que comprende grupos fosfato, preferiblemente fosfotirosina o fosfoserina o fosfotreonina.
- 5 14. El método de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la lectura del fluoróforo es la intensidad de fluorescencia.

Figura 1

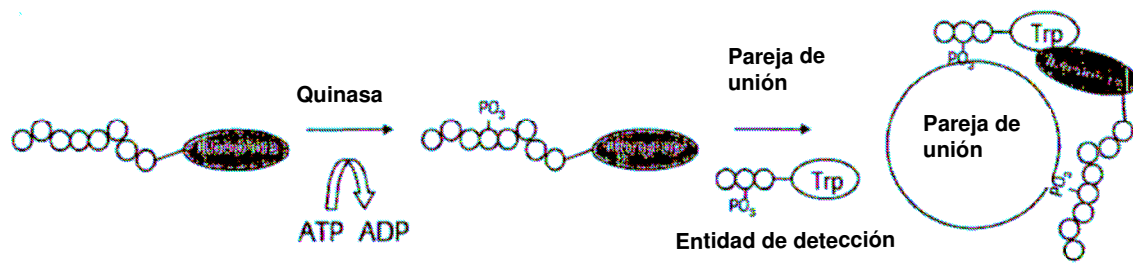


Fig. 2a

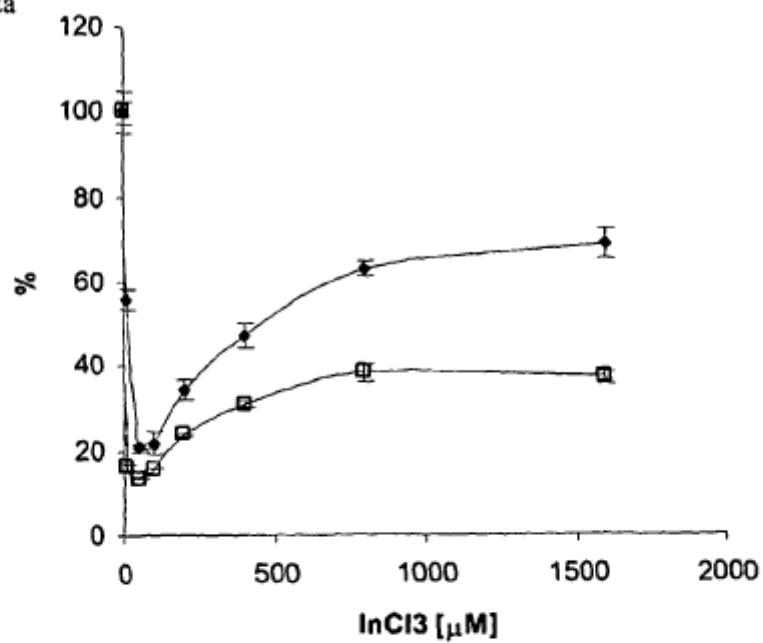


Fig. 2b

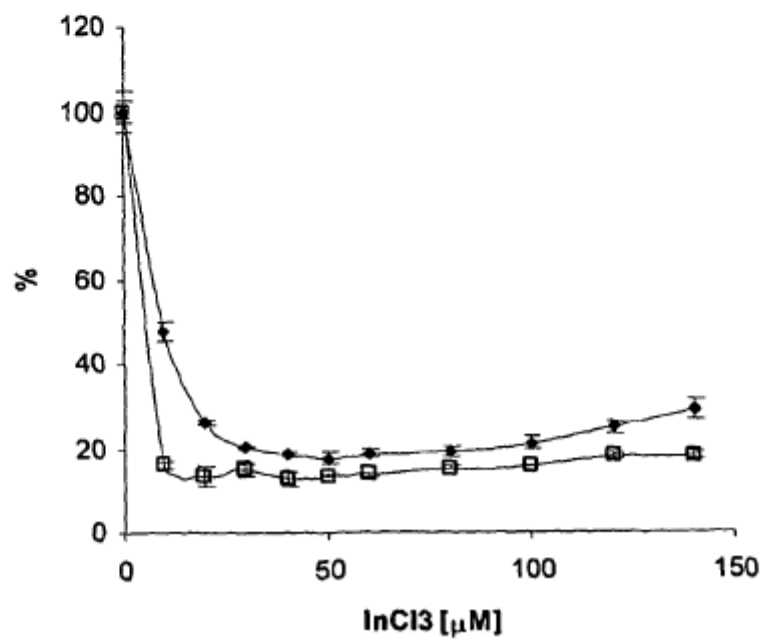


Fig. 3a

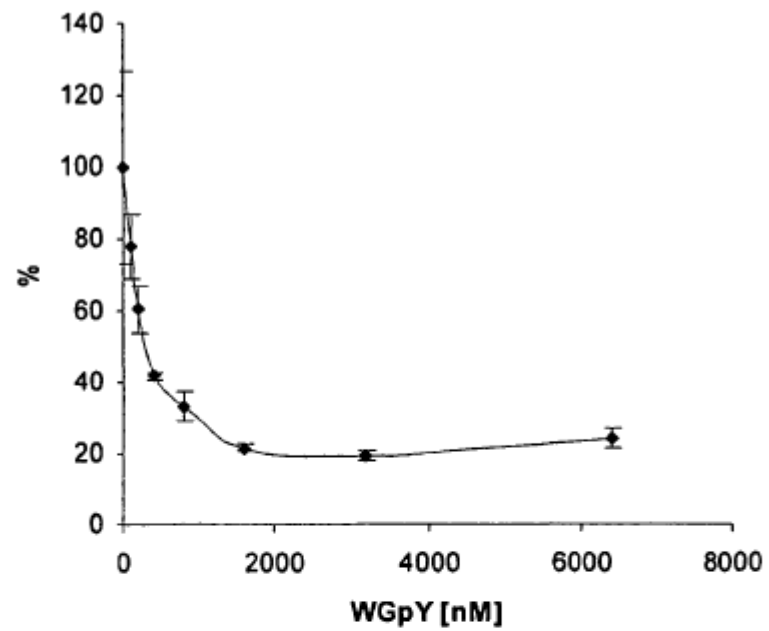


Fig. 3b

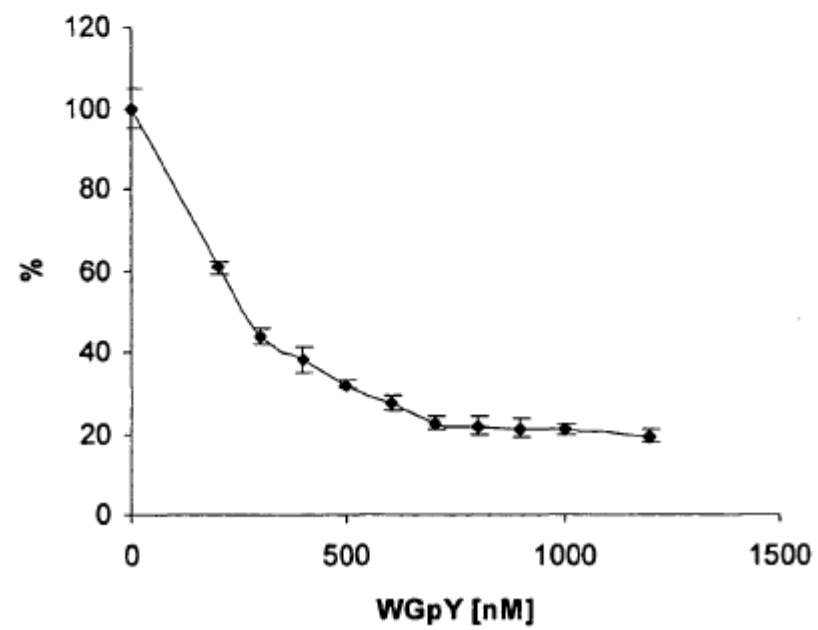


Fig. 4

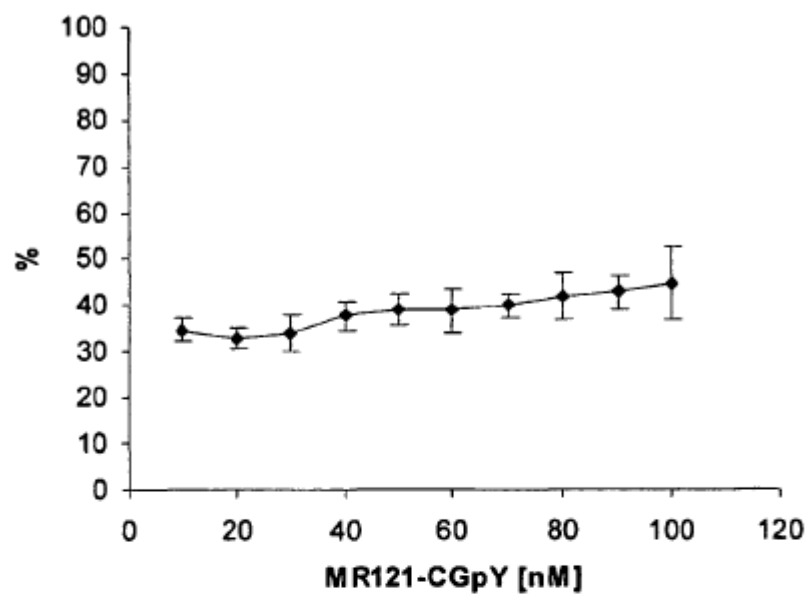


Fig. 5

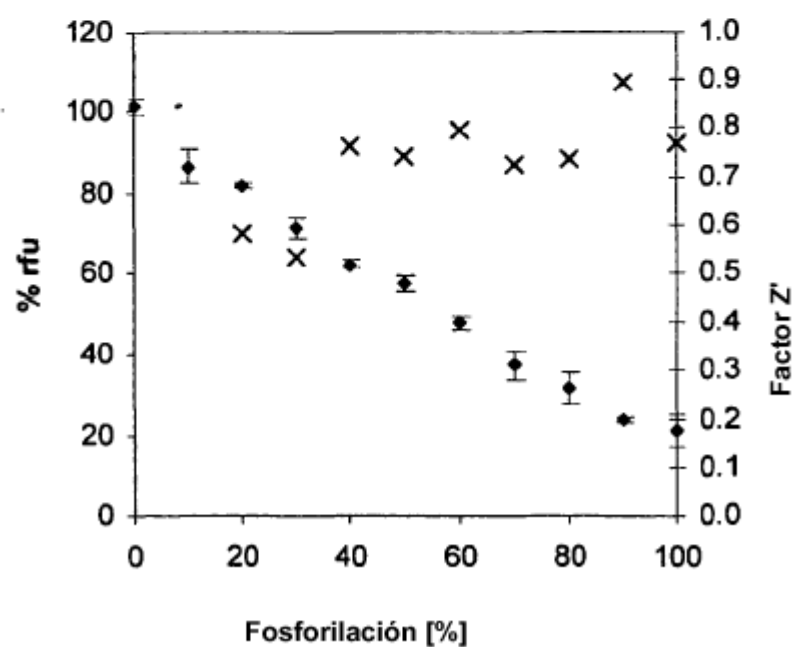


Fig. 6a

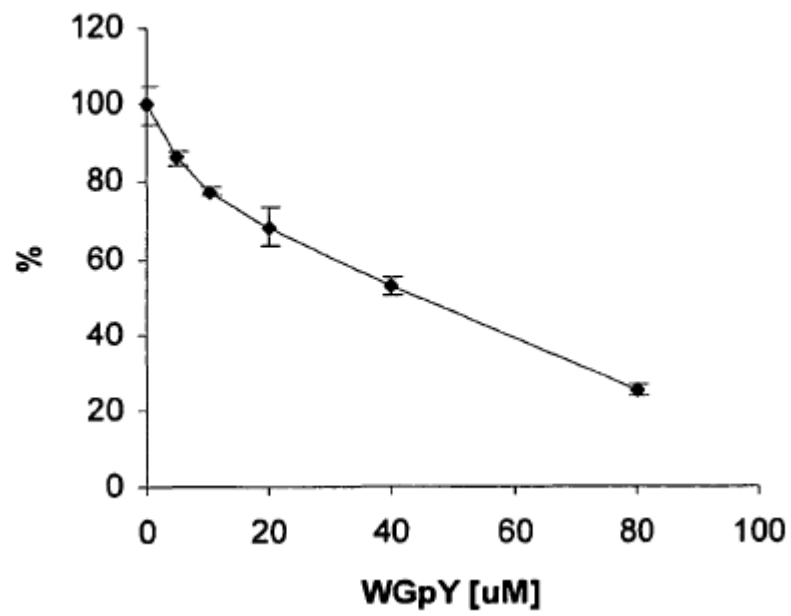


Fig. 6b

