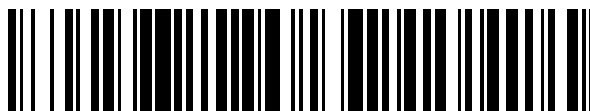


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 713**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 17/00 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2007 E 07791906 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2045325**

54 Título: **Enzima de fosforilación de un fármaco**

30 Prioridad:

04.08.2006 JP 2006213734

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.02.2013

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, NIHONBASHI-HONCHO CHUO-KU
TOKYO 103-0023, JP**

72 Inventor/es:

**NARA, FUTOSHI;
YONESU, KIYOAKI y
KUBOTA, KAZUISHI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 713 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

Enzima de fosforilación de un fármaco

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a una enzima que fosforila un fármaco en el cuerpo vivo. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección selectiva de un compuesto fosforilado mediante la enzima mencionada anteriormente, un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para fosforilar un compuesto de ensayo, etc.

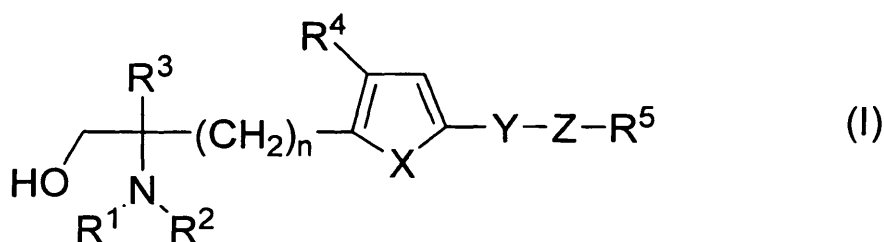
Técnica anterior

10 Algunos productos farmacéuticos en la etapa de ser administrados a pacientes tienen una estructura diferente de la de un compuesto que tiene una eficacia farmacológica real. Después de administrar dichos productos farmacéuticos a un paciente, estos se metabolizan en el cuerpo vivo. Como resultado su estructura varía y exhiben su eficacia farmacológica en ese momento. Dicho compuesto antes de metabolizarse en el cuerpo vivo se denomina profármaco. Se han conocido varios tipos de enzimas que metabolizan un profármaco en un compuesto que tiene eficacia farmacológica.

15 Algunos derivados de aminoalcohol están fosforilados *in vivo* y, como resultado, exhiben actividad inmunosupresora. Por ejemplo, FTY720 (clorhidrato de 2-Amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propano-1,3-diol) se fosforila *in vivo* por la acción de la esfingosina quinasa 1 y 2, de modo que se convierte en FTY720-fosfato [es decir, (:)-2-amino-2 fosforiloximetil-4-(4-octilfenil)butanol] que exhibe acción inmunosupresora (The Journal of Biological Chemistry, (2003), 278, pág. 47408-47415).

20 Por otro lado, también se considera que un compuesto representado por la fórmula general (I) (en la que cada uno de R^1 y R^2 representa un átomo de hidrógeno; R^3 representa un grupo alquilo C1-C6 o un grupo hidroximetilo; R^4 representa un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1-C6; R^5 representa un grupo fenilo, que está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alcoxi C1-C6, un grupo cicloalquilo C3-C6, un grupo halógeno alquilo C1-C6, un grupo fenilo y un grupo benciloxi, un átomo de halógeno o un átomo de hidrógeno; X representa un grupo vinileno (grupo CH=CH), un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo metilamino; Y representa un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo carbonilo; Z representa un enlace sencillo o un grupo alquileo C1-C8; y n es 2 o 3) está fosforilado *in vivo*, de modo que se puede convertir en una forma activa que exhibe actividad inmunosupresora (patente japonesa abierta a consulta por el público n° 2005-46141.) No obstante, el mecanismo de esta fosforilación *in vivo* es desconocido.

La elucidación del mecanismo de fosforilación de dichos compuestos se ha considerado eficaz para la búsqueda de compuestos que se activan siendo fosforilados *in vivo*, para aclaración del mecanismo de expresión de actividad, para selección de un paciente que es sensible a un fármaco, etc.



Diabetes, (2000), 49, pág.1627-1634 y Diabetes, (2001), 50, pág. 2139-2147 comunican la fosforilación mediante la fructosamina-3-quinasa humana de 1-desoxi-1-morfolinofructosa (DMF, una fructosamina sintética) y otros sustratos, tales como fructosalisina y fructosaglicina.

40 Se ha notificado que una proteína fructosamina-3-quinasa humana relacionada (que en lo sucesivo también se denomina "FN3KRP humana") tiene actividad de fosforilación de la posición 3 de las quetosaminas tal como ribulosamina o psicossamina (Diabetes, (2003), 52, pág. 2888-2895). No obstante, se desconoce el papel de dicha proteína relacionada con la fructosamina-3-quinasa humana *in vivo*.

45 Se ha notificado en Biochem J. (2004), 382, p137-143 que la FN3KRP presente en los eritrocitos puede fosforilar las ribulosaminas y las psicossaminas intracelulares unidas a proteína.

Como resultado de estudios intensivos dirigidos hacia la aclaración del mecanismo de fosforilación del mismo *in vivo*, el presente inventor ha descubierto que la proteína conocida como FN3KRP humana o fructosamina-3-quinasa

humana (que en lo sucesivo en el presente documento también se denomina "FN3K humana") se asocia con la fosforilación del compuesto representado por la fórmula general (I) mencionada anteriormente, de modo que se completa la presente invención.

5 Es un objeto de la presente invención aclarar una enzima que fosforila *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I) mencionada anteriormente, tal como (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol. Además, es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de fosforilar el compuesto mencionado anteriormente usando una enzima que lo fosforila. Además, es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de detección selectiva de un compuesto fosforilado mediante la enzima mencionada anteriormente. Además, es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para fosforilar un compuesto de ensayo.

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

15 Como resultado de estudios intensivos dirigidos a conseguir los objetos mencionados anteriormente, los presentes inventores han descubierto que una enzima que fosforila el compuesto representado por la fórmula general (I) mencionada anteriormente, tal como (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol, es la proteína conocida como proteína relacionada con fructosamina-3-quinasa (que en lo sucesivo también se denomina "FN3KRP") y/o fructosamina-3-quinasa (que en lo sucesivo también se denomina "FN3K"), completando de este modo la presente invención.

Medios para resolver los problemas

20 Es decir, la presente invención tiene las siguientes características [1] a [9].

[1] Un procedimiento de detección selectiva de una sustancia fosforilada por la FN3KRP humana y/o la FN3K humana, que comprende las etapas siguientes (1) a (3):

(a) poner en contacto una sustancia de ensayo con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

25 (i) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos nº 1-309 de la SEC ID N° 2 en el listado de secuencias:

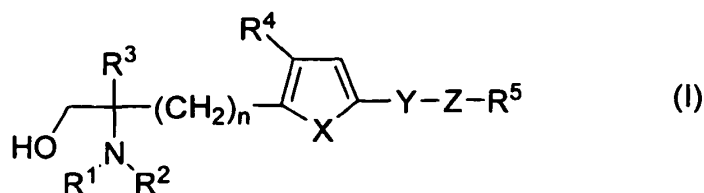
(b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos nº 1-309 de la SEC ID N° 4 en el listado de secuencias; y

30 (c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una deleción, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido seleccionado del anterior (a) y (b) y que tiene la capacidad de fosforilar el (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol;

(2) medir la cantidad de éster fosfórico de la sustancia de ensayo generada; y

35 (3) comparar la cantidad del éster fosfórico generado medida en (2) anteriormente con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con el polipéptido seleccionado de los anteriores (a) a (c)).

que se caracteriza porque la sustancia de ensayo es un compuesto representado por la fórmula general (I) siguiente:



40 en la que cada uno de R¹ y R² representa un átomo de hidrógeno; R³ representa un grupo alquilo C1-C6 o un grupo hidroximetilo; R⁴ representa un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1-C6; R⁵ representa un grupo fenilo, un grupo fenilo que está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alcoxi C1-C6, un grupo cicloalquilo C3-C6, un grupo halógeno alquilo C1-C6, un grupo fenilo y un grupo benciloxi, un átomo

45

de halógeno o un átomo de hidrógeno; X representa un grupo vinileno (grupo CH=CH), un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo metilamino; Y representa un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo carbonilo; Z representa un enlace sencillo o un grupo alquileo C1-C8; y n es 2 o 3, con la condición de que Z no puede representar un enlace sencillo cuando Y representa un enlace sencillo.

5 [2] Un procedimiento de acuerdo con [1] en lo que antecede, que además comprende la etapa:

(4) determinar que la sustancia de ensayo se ha fosforilado, cuando la cantidad del éster fosfórico medida en (2) anteriormente es mayor en comparación con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con el polipéptido seleccionado de los anteriores (a) a (c).

10 [3] Un procedimiento de producción de un éster fosfórico, que comprende las etapas siguientes (1) y (2):

(1) poner en contacto el compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en [1] anteriormente con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en de (a) a (c) como se ha definido en [1] anteriormente; y

15 (2) obtener el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) de la solución de reacción en (1) anterior.

[4] Un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en [1] anteriormente, que comprende las etapas siguientes (1) a (3):

(1) extraer el ARN total de una muestra obtenida de un sujeto;

20 (2) medir el nivel de expresión de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) en el ARN total:

(a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 6-935 de la SEC ID N° 1 en el listado de secuencias;

25 (b) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 27-956 de la SEC ID N° 3 en el listado de secuencias; y

(c) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (a) o (b) anterior, y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I); y

30 (3) comparar el nivel de expresión del polinucleótido medido en (2) anterior con el nivel de expresión del polinucleótido descrito en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

35 [5] Un procedimiento de determinar la capacidad de un paciente para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en [1] anteriormente, que comprende las etapas siguientes (1) y (2):

(1) medir el nivel de expresión de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en de (a) a (c) como se ha definido en [1] anteriormente e una muestra obtenida de un sujeto; y

40 (2) comparar el nivel de expresión del polipéptido en (1) anterior con el nivel de expresión del polipéptido descrito en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

45 [6] Un procedimiento de determinar la capacidad de un paciente para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en [1] anteriormente, que comprende las etapas siguientes (1) y (2):

(1) medir la actividad enzimática un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en de (a) a (c) como se ha definido en [1] anteriormente e una muestra obtenida de un sujeto; y

50 (2) comparar la actividad enzimática del polipéptido en (1) anterior con la actividad enzimática del polipéptido descrito en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

[7] Un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en [1] anteriormente, que comprende las etapas siguientes (1) a (3):

5 (1) examinar la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) en una muestra obtenida de un sujeto:

(a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 1-1466 de la SEC ID N° 1 en el listado de secuencias:

(b) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 1-1781 de la SEC ID N° 3 en el listado de secuencias; y

10 (c) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (a) o (b) anterior, y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I);

15 (2) examinar la presencia o ausencia de una mutación en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido descrito anteriormente que influye sobre la actividad de la enzima; y

(3) determinar que el sujeto tiene únicamente una capacidad baja para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I) cuando el sujeto tiene, en la secuencia de nucleótidos, una mutación que disminuye la actividad de fosforilación del polipéptido codificado por el polinucleótido descrito anteriormente, y determinar que el sujeto tiene la capacidad para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I) cuando el sujeto no tiene en la secuencia de nucleótidos una mutación que disminuye la actividad de fosforilación del polipéptido descrito anteriormente.

20

[8] El procedimiento de acuerdo con uno cualquiera de [4] a [7] anteriores, que se caracteriza porque la muestra es de sangre periférica.

25 [9] Uso de un kit que comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (1) a (5):

(1) un cebador oligonucleotídico que comprende de 15 a 30 nucleótidos contiguos que se usa para amplificar específicamente una parte de todo el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o 3 en el listado de secuencias:

30 (2) una sonda polinucleotídica que comprende 15 o más nucleótidos contiguos que hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o 3 en el listado de secuencias, para detectar el polinucleótido descrito anteriormente;

(3) una muestra en fase sólida que tiene un polinucleótido seleccionado del cebador oligonucleotídico descrito en (1) anteriormente o la sonda polinucleotídica descrita en (2) anterior inmovilizada en la misma;

35 (4) un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido seleccionado de (a) a (c) como se define en [1] anteriormente para detectar la proteína; y

(5) un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo descrito en (4) anteriormente,

para diagnosticar la capacidad para metabolizar un compuesto farmacológico representado por la fórmula general (I) como se define en [1] anteriormente.

40 **Ventajas de la invención**

La presente invención puede proporcionar un procedimiento de fosforilación del compuesto mencionado anteriormente usando una proteína relacionada con la fructosamina-3-quinasa (que en lo sucesivo también se denomina "FN3KRP humana") y/o fructosamina-3-quinasa humana (que en lo sucesivo también se denomina "FN3K humana"). Además, la presente invención puede proporcionar un procedimiento de detección selectiva de un compuesto fosforilado mediante la enzima mencionada anteriormente. Adicionalmente, la presente invención puede proporcionar un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para fosforilar un compuesto de ensayo.

45

Mejor modo para llevar a cabo la invención

1. Definición:

50 El término "gen" se usa en la presente memoria descriptiva para incluir no solo ADN sino también su ARNm, ADNc y su ARNc. Además, el término "polinucleótido" se usa en la presente memoria descriptiva de modo que tenga el mismo significado que el de un ácido nucleico. Por tanto, el término "polinucleótido" incluye ADN, ARN, una sonda,

un oligonucleótidos y un cebador. Los términos “polipéptido” y “proteína” se usan sin distinciones en la presente memoria descriptiva. Además, el término “fracción de ARN” se usa en la presente memoria descriptiva de modo que signifique una fracción que contiene ARN. Adicionalmente, el término “célula” se usa en la presente memoria descriptiva de modo que incluya la célula de un animal individual y una célula cultivada. La expresión “fracción de ARN total” se usa en la presente memoria descriptiva de modo que signifique una fracción que contiene ARN. Es decir, una fracción que contiene ARN total extraído de sangre, varios tipos de órganos, varios tipos de tejidos, células cultivadas etc. mediante un procedimiento habitual tal como el uso de un disolvente para la extracción de ARN. La expresión “hibridar en condiciones rigurosas” se usa en la presente memoria descriptiva de modo que signifique: Condiciones en las que la identificación se puede llevar a cabo mediante hibridación efectuada a 68 °C en una solución de hibridación disponible comercialmente, Solución de hibridación ExpressHyb (fabricado por Clontech); condiciones en las que la identificación se puede llevar a cabo mediante hibridación efectuada a 68 °C usando un filtro inmovilizado por ADN en presencia de NaCl 0,7 – 1,0M y el posterior lavado del resultante a 68 °C con una solución SSC en una concentración 0,1-2 veces (concentración de 1 vez SSC consiste en NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM); o condiciones equivalentes a estas.

2. FN3KRP humana y FN3K humana

La fructosamina-3-quinasa humana (FN3K humana) o la proteína relacionada con la fructosamina-3-quinasa humana (FN3KRP humana) que se puede usar en la presente invención no está limitada a una proteína de la totalidad de la longitud. También se puede usar un péptido parcial que consiste en una secuencia parcial de la proteína de longitud total, siempre que permita la reacción de fosforilación de un compuesto que se pueda usar en la presente invención. Además, también se puede usar una proteína natural obtenida de células derivadas humanas o una proteína obtenida de células que se han modificado genéticamente para expresar la proteína mencionada anteriormente usando un gen clonado mediante el procedimiento de PCR o similar. Adicionalmente, dichas proteínas se pueden purificar o pueden estar parcialmente purificadas.

La secuencia de nucleótidos de ADNc de la FN3K humana es como se muestra en los nucleótidos N° 1 - 1466, SEC ID N° 1 en el listado de secuencias, por ejemplo. Además, la secuencia de aminoácidos de la FN3K humana es como se muestra en los aminoácidos N° 1 - 309, SEC ID N° 2 en el listado de secuencias, por ejemplo. La secuencia de nucleótidos de ADNc de la FN3K humana se ha registrado en GenBank con el N° de acceso NM_022158.

Por otro lado, la secuencia de nucleótidos de ADNc de la FN3KRP humana es como se muestra en los nucleótidos N° 1 - 1781, SEC ID N° 3 en el listado de secuencias, por ejemplo. Además, la secuencia de aminoácidos de la FN3KRP humana es como se muestra en los aminoácidos N° 1 - 309, SEC ID N° 4 en el listado de secuencias, por ejemplo. La secuencia de nucleótidos de ADNc de la FN3KRP humana se ha registrado en GenBank con el N° de acceso NM_024619.

En la presente memoria descriptiva, la expresión “gen de FN3K humana” se usa para querer decir un gen que tiene una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 6-935 de la SEC ID N° 1 en el listado de secuencias o un gen que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria al gen que tiene la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente y que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene el mismo nivel de actividad biológica que la de la FN3K humana.

En la presente memoria descriptiva, la expresión “FN3K humana” se usa para querer decir una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 1-309 de la SEC ID N° 2 en el listado de secuencias, o una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína mencionada anteriormente y que tiene el mismo nivel de actividad biológica que la de la FN3K humana.

En la presente memoria descriptiva, la expresión “gen de FN3KRP humana” se usa para querer decir un gen que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 27-956 de la SEC ID N° 3 en el listado de secuencias o un gen que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria al gen que tiene la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente y que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene el mismo nivel de actividad biológica que la de la FN3KRP humana. En la presente memoria descriptiva, la expresión “FN3KRP humana” se usa para querer decir una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 1-309 de la SEC ID N° 4 en el listado de secuencias, o una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína mencionada anteriormente y que tiene el mismo nivel de actividad biológica que la de la FN3KRP humana.

Una proteína de fusión formada mediante la adición de otra secuencia de aminoácidos a la FN3K humana, la FN3KRP humana o un péptido parcial de las mismas también se incluye en la FN3K humana, la FN3KRP humana y el péptido parcial de las mismas. Dichas proteínas de fusión incluyen una proteína condensada a una cola de histidina, una proteína condensada con FLAG y una proteína condensada con un fluorocromo tal como GFP, pero los ejemplos no se limitan a estos.

La actividad enzimática de la FN3K humana y/o la FN3KRP humana se puede medir incubando dicha FN3K humana

y/o FN3KRP humana y una sustancia usada como sustrato en un tampón adecuado y, después, analizar un compuesto fosforilado como un producto. Por ejemplo, la FN3K humana y/o la FN3KRP humana se incuban con (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiófen-2-il]butan-1-ol, y el éster fosfórico generado se analiza después mediante HPLC de modo que se pueda medir la actividad enzimática de la FN3K humana y/o la FN3KRP humana.

5 3. Obtención del ADNc de FN3K humana y de ADNc de FN3KRP humana

(1) ADNc de FN3K humana

Un producto comercialmente disponible se puede usar como ADNc de FN3K humana. Dicho producto comercialmente disponible se puede obtener de GeneCopoeia (Nº de catálogo GC-W1392), por ejemplo.

10 Como alternativa, el ADNc de FN3K humana se puede obtener mediante los procedimientos siguientes usando una biblioteca de ADNc, incluyendo un gen de FN3K humana.

15 El ADNc de longitud completa se obtiene de una biblioteca de ADNc, en la que se ha expresado un gen de FN3K humana, de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como hibridación de colonias. Usando este ADNc de longitud completa como molde se realiza una PCR para obtener ADNc de FN3K. Como biblioteca de ADNc se puede usar una biblioteca de ADNc derivado de médula ósea, por ejemplo. Como alternativa, se puede usar Creator SMART Human cDNA Libraries (Clontech) como biblioteca de ADNc humano o se puede preparar una biblioteca de ADNc de forma independiente.

Además, también es posible realizar la PCR directamente usando una biblioteca de ADNc como molde, sin realizar hibridación de colonias para obtener ADNc de FN3K humana.

20 Se puede usar cualquier tipo de cebador para PCR, siempre que puedan amplificar el ADNc de FN3K humana. Por tanto, los cebadores adecuados se pueden seleccionar mediante un procedimiento conocido. Como cebadores usados en la PCR para amplificar el ADNc de FN3K humana se pueden seleccionar oligonucleótidos que tienen las siguientes secuencias de nucleótidos, por ejemplo.

5'- atggagcagctgctgctgcgcccagctgccc -3' (cebador 1: SEC ID Nº 5 en el listado de las secuencias); y

5'- ctacttgagcagccttcgcatgtgccc -3' (cebador 2: SEC ID Nº 6 en el listado de secuencias).

25 (2) ADNc de FN3KRP humana

30 El ADNc de longitud completa se obtiene de una biblioteca de ADNc, en la que se ha expresado un gen de FN3KRP humana, de acuerdo con un procedimiento conocido, tal como hibridación de colonias. Usando este ADNc de longitud completa como molde se realiza una PCR para obtener ADNc de FN3KRP. Como biblioteca de ADNc se puede usar una biblioteca de ADNc derivado de médula ósea, por ejemplo. Como biblioteca de ADNc humano disponible comercialmente se puede usar Creator SMART Human cDNA Libraries (Clontech) o también se puede preparar una biblioteca de ADNc de forma independiente.

Además, también es posible realizar la PCR directamente usando una biblioteca de ADNc como molde, para obtener ADNc de FN3KRP humana.

35 Se puede usar cualquier tipo de cebador para PCR, siempre que puedan amplificar el ADNc de FN3KRP humana. Por tanto, los cebadores adecuados se pueden seleccionar mediante un procedimiento conocido. Como cebadores usados en la PCR para amplificar el ADNc de FN3KRP humana se pueden seleccionar oligonucleótidos que tienen las siguientes secuencias de nucleótidos, por ejemplo.

5'- ataagaatgcccgccaccatggaggagctgctgaggcg -3' (cebador 3: SEC ID Nº 7 en el listado de las secuencias); y

40 5'- atagtttagcggcccctcacttgaccagattcctcat -3' (cebador 4: SEC ID Nº 8 en el listado de secuencias).

45 Cabe destacar que los expertos en el campo técnico al que pertenece la presente invención pueden llevar a cabo modificaciones de una porción de la secuencia de nucleótidos naturales de un gen de FN3K humana y/o un gen de FN3KRP humana, tal como la sustitución de la porción con otros nucleótidos, delección de la porción o adición de otros nucleótidos a la misma, de modo que se prepara un polinucleótido que tiene el mismo nivel de actividad biológica que el gen de FN3K humana y/o el gen de FN3KRP humana naturales. Por tanto, en la presente invención también se puede usar un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que comprende una sustitución, delección o adición de nucleótidos con respecto a la secuencia de nucleótidos naturales y que exhibe el mismo nivel de actividad biológica que el gen de FN3K humana y/o el gen de FN3KRP humana naturales. Dicha modificación de un nucleótido se puede llevar a cabo mediante procedimientos tales como la introducción de delección usando 50 enzimas de restricción o ADN exonucleasa, mutagénesis tal como mutagénesis dirigida a sitio, modificación de una secuencia de nucleótidos mediante el procedimiento de PCR usando cebadores mutantes o introducción directa de ADN mutante sintético. Además, también se puede usar un polinucleótido que hibride en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria al gen de FN3K humana o al gen de

FN3KRP humana y que tiene el mismo nivel de actividad biológica que la de la FN3K humana o la FN3KRP humana.

4. Expresión de FN3K humana y de FN3KRP humana

Construcción del vector de expresión de FN3K humana y/o de FN3KRP humana

5 La FN3K humana y/o la FN3KRP humana se pueden producir sintetizándolas *in vitro* o permitiendo que las células huésped las generen de acuerdo con manipulación genética. Específicamente, un gen de FN3K humana y/o un gen de FN3KRP humana se incorporan en un vector capaz de expresar el gen de FN3K humana y/o el gen de FN3KRP humana. Después, la FN3K humana y/o la FN3KRP humana se sintetizan en una solución que contiene una enzima, un sustrato y un material energético necesario para transcripción y traducción. Como alternativa, se transforman las células huésped de procariontes o eucariotes y, de este modo, se deja que expresen FN3K humana y/o FN3KRP humana de modo que obtengan la FN3K humana y/o la FN3KRP humana.

10 Ejemplos de un huésped procarionte incluyen *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Con el fin de transformar las células huésped con un gen de interés, las células huésped se transforman con un vector plasmídico que condene un replicón derivado de especies compatibles con el huésped, es decir un origen de replicación y una secuencia reguladora. Además, el vector tiene, preferentemente, una secuencia capaz de impartir la selectividad de un carácter fenotípico (fenotipo) a las células que se van a transformar.

15 Ejemplos de *Escherichia coli* que normalmente se usan en el presente documento incluyen una cepa K12 y una cepa DH5 α . Ejemplos de un vector que normalmente se usa en el presente documento incluyen plásmidos tales como pBR322 o la serie pUC, pcDNA3.1(+) (Invitrogen). No obstante, *Escherichia coli* y los vectores no están limitados a ellos y se pueden usar varios tipos de cepas y vectores conocidos.

20 Un ejemplo preferido de *Bacillus subtilis* es una cepa 207-25. Como vector se puede usar pTUB228 (Ohmura, K. y col., (1984) J. Biochem. 95, 87-93) y similares, pero los ejemplos no se limitan a este. La ligación de una secuencia de ADN que codifica la secuencia del péptido señal de la α -amilasa de *Bacillus subtilis* permite la secreción y expresión fuera de la masa celular.

25 Las células eucariotas usadas como células huésped incluyen células de animales vertebrados, levaduras etc. Células de animales vertebrados que normalmente se usan en el presente documento incluyen células COS tales como células de mono (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182, ATCC: CRL-1650) y líneas celulares de células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa (células CHO; ATCC: CCL-61) (Urlaub, G. y Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220), pero los ejemplos no se limitan a ellas.

30 Cuando se usan células HEK293 como células huésped, se puede usar como vector, por ejemplo, pcDNA3.2-DEST (Invitrogen).

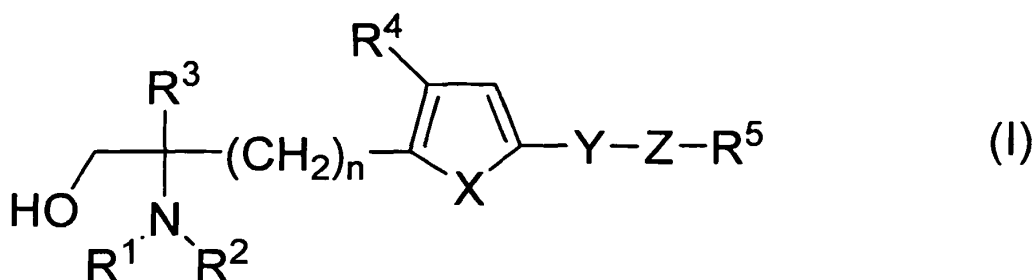
35 El transformante obtenido de este modo se puede cultivar de acuerdo con un procedimiento habitual. Mediante dicho cultivo se puede generar un polipéptido de interés dentro o fuera de las células. Como medio usado en el cultivo normalmente se pueden seleccionar, según sea adecuado, varios tipos de medios que se usan habitualmente dependiendo de los tipos de células huésped usadas. Por ejemplo, en el caso de las células HEK293 mencionadas anteriormente se puede usar un medio formado mediante la adición, según sea necesario, un componente de suero tal como suero bovino fetal a un medio RPMI1640 o a un medio Eagle modificado de Dulbecco.

40 Una proteína recombinante generada dentro o fuera de las células de un transformante como resultado del cultivo mencionado anteriormente se puede separar y purificar mediante varios tipos de procedimientos de operación de separación conocidos que usan propiedades físicas o químicas de la proteína. Ejemplos específicos de dichos procedimientos de operación de separación incluyen un tratamiento que usa un precipitante proteico habitual, ultrafiltración, varios tipos de cromatografía líquida tal como cromatografía en tamiz molecular (filtración en gel), cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), diálisis y combinaciones de los mismos. Además, conectando la histidina que consiste 6 residuos con una proteína recombinante que se va a expresar, la proteína se puede purificar eficientemente usando una columna de afinidad de níquel. Combinando los procedimientos mencionados anteriormente, el polipéptido de la presente invención se puede producir fácilmente en grandes cantidades con un alto rendimiento y una pureza elevada. Además, el peso molecular del polipéptido purificado se puede determinar mediante un procedimiento habitual tal como espectrometría de masas o SDS-PAGE.

La actividad enzimática se usa como indicador de purificación de la FN3K humana y/o la FN3KRP humana.

50 5. Compuesto fosforilado mediante enzima fosforilante

El tipo de un compuesto que se puede usar como sustrato de la FN3K humana y/o la FN3KRP humana en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea fosforilado por la FN3K humana y/o la FN3KRP humana y es un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I);



Los derivados de aminoalcohol representados por la fórmula general (I) anterior se pueden producir de acuerdo con los procedimientos descritos en, por ejemplo, la publicación internacional WO94/08943 panfleto (FTY720), la publicación internacional WO96/06068 panfleto (un compuesto análogo de FTY), la publicación internacional WO98/45249 panfleto (un compuesto análogo de FTY), la publicación internacional WO03/029184 panfleto (ROX-2127; un compuesto análogo de KRP-203), la publicación internacional WO03/029205 panfleto (KRP-203), la publicación internacional WO02/06268 panfleto (un derivado de tiofeno), la publicación internacional WO03/059880 panfleto (un derivado pirrol), la publicación internacional WO05/005383 panfleto (un derivado de pirrol sustituido), la publicación internacional WO05/063671 panfleto (un derivado éter de un anillo de benceno), etc.

Los sustituyentes, que se usan cuando dicho derivado de aminoalcohol representado por la fórmula general anterior (I) de la presente invención se usa como ingrediente activo de una composición farmacéutica, se mostrarán más adelante.

Cada uno de R^1 y R^2 es un átomo de hidrógeno.

R^3 es un grupo alquilo C1-C6 o un grupo hidroximetilo y, preferentemente, un grupo metilo o un grupo hidroximetilo.

R^4 es un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1-C6, preferentemente un átomo de hidrógeno, un átomo de cloro o un grupo metilo y, particularmente preferentemente, átomo de hidrógeno, un átomo de cloro.

R^5 es un grupo fenilo, un grupo fenilo que está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alcoxi C1-C6, un grupo cicloalquilo C3-C6, un halógeno alquilo C1-C6, un grupo fenilo y un grupo benciloxi, un átomo de halógeno o un átomo de hidrógeno; preferentemente un grupo fenilo que está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de flúor, un átomo de cloro, un grupo ciano, un grupo metilo, un grupo metoxi, un grupo ciclopropilo, un grupo trifluorometilo, un grupo fenilo y un grupo benciloxi, un átomo de flúor o un átomo de hidrógeno; más preferentemente, un grupo fenilo, un grupo fenilo que está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un grupo metilo, un grupo metoxi, un grupo trifluorometilo, un grupo fenilo y un grupo benciloxi, un átomo de flúor o un átomo de hidrógeno; y, particularmente preferentemente, un grupo fenilo, un grupo 3-metilfenilo, un grupo 4-metoxifenilo, un grupo 3-metoxi-4-metilfenilo, un grupo 3-trifluorometilfenilo, un grupo 3-benciloxifenilo, un átomo de flúor o un átomo de hidrógeno.

X es un grupo vinileno (grupo CH=CH), un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo carbonilo, y, preferentemente, un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o un grupo carbonilo.

Y es un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo carbonilo, y, preferentemente, un enlace sencillo, un átomo de oxígeno o un grupo carbonilo.

Z es un enlace sencillo o un grupo de alquileo C1-C8 y, preferentemente, un enlace sencillo, trimetileno, tetrametileno u octametileno.

n es 2 o 3, y, preferentemente, 2.

Entre los compuestos que se pueden usar como sustratos de la FN3K humana y/o la FN3KRP humana de la presente invención, los compuestos preferidos como derivados de aminoalcohol representados por la fórmula general (I) incluyen

2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol,

2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,

2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,

2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(4-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,

2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2,3-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,

2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2,4-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,

- 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2,5-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il} butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3,4-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3,5-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3-metil-4-metoxifenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 5 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3-metoksi-4-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(4-cianofenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 10 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2,3-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2,5-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,5-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 15 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3-metil-4-metoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3-metoksi-4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-cianofenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol,
 2-amino-2-[2-(4-heptiloxifenil)etil]propan-1,3-diol,
 20 2-amino-2-{2-[4-(5-fenilpentanoil)fenil]etil}propan-1,3-diol,
 2-amino-2-{2-[4-(5-ciclohexilpentanoil)fenil]etil}propan-1,3-diol,
 2-amino-2-{2-[4-(7-fenilheptanoil)fenil]etil}propan-1,3-diol,
 2-amino-2-(2-{4-[2-(4-metoxifenil)etoksi]fenil}etil)propan-1,3-diol,
 2-amino-2-(2-{4-[2-(4-etoxifenil)etoksi]fenil}etil)propan-1,3-diol,
 25 2-amino-2-(2-{4-[2-(3-fluoro-4-metoxifenil)etoksi]fenil}etil)propan-1,3-diol,
 2-amino-2-metil-4-[4-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiloksi)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[4-(3-bifenil-4-ilpropoxi)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[4-(3-bifenil-4-ilpropionil)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[3-metoksi-4-(4-fenilbutoxi)fenil]butan-1-ol,
 30 2-amino-2-metil-4-[4-(5-fenilpentiloksi)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[4-(5-fenilpentanoil)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-(4-hexiloxifenil)butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[4-(3-fenilpropoxi)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[4-(3-ciclohexilpropoxi)fenil]butan-1-ol,
 35 2-amino-2-metil-4-[4-(5-ciclohexilpentanoil)fenil]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-(4-heptiloxifenil)butan-1-ol,
 2-amino-2-[4-(3-benciloxifenoksi)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol,

- 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol,
 2-amino-2-metil-5-[4-(3-benciloxifenoxi)-2-clorofenil]pentan-1-ol,
 2-amino-2-metil-5-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]pentan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol,
- 5 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol (ROX-2127),
 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]etil-1,3-propanodiol (KRP-203),
 2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{3-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol,
- 10 2-amino-2-metil-4-{3-metil-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{3-cloro-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1,3-dimetil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-4-{1-metil-3-cloro-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
- 15 2-amino-2-metil-4-{1,3-dimetil-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 2-amino-2-metil-3-(4-heptanoilfenoxi)propan-1-ol,
 2-amino-2-metil-5-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}pentan-1-ol,
 2-amino-2-metil-5-{5-[4-(4-metilfenil)butanoil]tiofen-2-il}pentan-1-ol,
 2-amino-2-metil-3-{4-[4-(4-metilfenil)butanoil]fenilmetoxi}propan-1-ol,
- 20 2-amino-2-metil-3-{2-cloro-4-[4-(4-metilfenil)butanoil]fenilmetoxi}propan-1-ol,
 2-amino-2-metil-3-{S-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-ilmetoxi}propan-1-ol, y
 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol (FTY720).
- Compuestos más preferidos incluyen (2R)-2-amino-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
- 25 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(4-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2,3-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2,4-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(2,5-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
- 30 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3,4-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3,5-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3-metil-4-metoxifenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(3-metoxi-4-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[5-(4-cianofenil)pentanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
- 35 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,

- (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2,3-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(2,5-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 5 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,5-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3-metil-4-metoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3-metoksi-4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-cianofenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol,
 10 (2R)-2-amino-2-[2-(4-heptiloxifenil)etil]propan-1,3-diol,
 (2R)-2-amino-2-{2-[4-(5-fenilpentanoil)fenil]etil}propan-1,3-diol,
 (2R)-2-amino-2-{2-[4-(5-ciclohexilpentanoil)fenil]etil}propan-1,3-diol,
 (2R)-2-amino-2-{2-[4-(7-fenilheptanoil)fenil]etil}propan-1,3-diol,
 (2R)-2-amino-2-(2-{4-[2-(4-metoxifenil)etoksi]fenil}etil)propan-1,3-diol,
 15 (2R)-2-amino-2-(2-{4-[2-(4-etoxifenil)etoksi]fenil}etil)propan-1,3-diol,
 (2R)-2-amino-2-(2-{4-[2-(3-fluoro-4-metoxifenil)etoksi]fenil}etil)propan-1,3-diol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiloxi)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(3-bifenil-4-ilpropoxi)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(3-bifenil-4-ilpropionil)fenil]butan-1-ol,
 20 (2R)-2-amino-2-metil-4-[3-metoksi-4-(4-fenilbutoxi)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(5-fenilpentiloxi)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(5-fenilpentanoil)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-(4-hexiloxifenil)butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(3-fenilpropoxi)fenil]butan-1-ol,
 25 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(3-ciclohexilpropoxi)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[4-(5-ciclohexilpentanoil)fenil]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-(4-heptiloxifenil)butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-2-[4-(3-benciloxifenoksi)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol,
 (2R)-2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol,
 30 (2R)-2-amino-2-metil-5-[4-(3-benciloxifenoksi)-2-clorofenil]pentan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-5-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]pentan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol (ROX-2127),
 (2R)-2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]etil-1,3-propanodiol (KRP-203),
 35 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[3-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-il]butan-1-ol,

- (2R)-2-amino-2-metil-4-{3-metil-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{3-cloro-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1,3-dimetil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 5 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-3-cloro-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1,3-dimetil-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol,
 (2S)-2-amino-2-metil-3-(4-heptanoilfenoxi)propan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-5-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}pentan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-5-{5-[4-(4-metilfenil)butanoil]tiofen-2-il}pentan-1-ol,
 10 (2S)-2-amino-2-metil-3-[4-[4-(4-metilfenil)butanoil]fenilmetoxi]pentan-1-ol,
 (2S)-2-amino-2-metil-3-{2-cloro-4-[4-(4-metilfenil)butanoil]fenilmetoxi}propan-1-ol,
 (2S)-2-amino-2-metil-3-{5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-ilmetoxi}pentan-1-ol, y
 (2R)-2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol (FTY720).

Compuestos particularmente preferidos incluyen

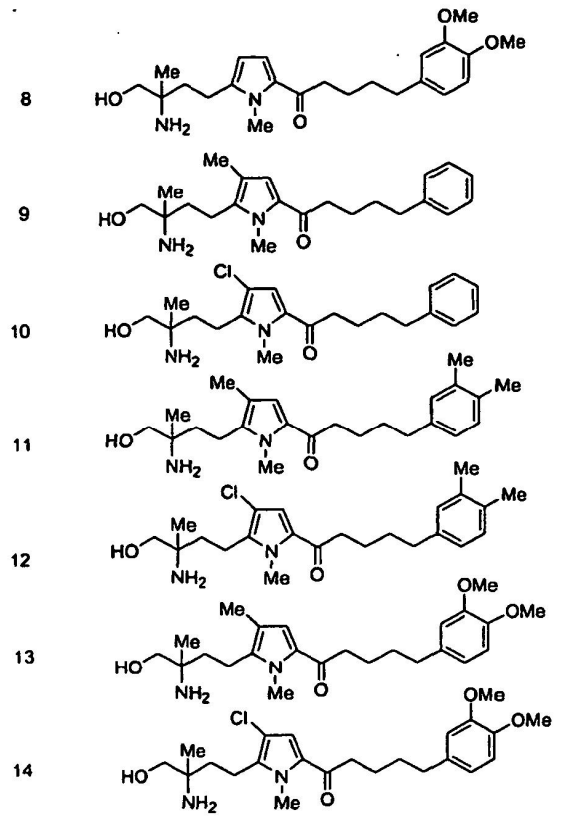
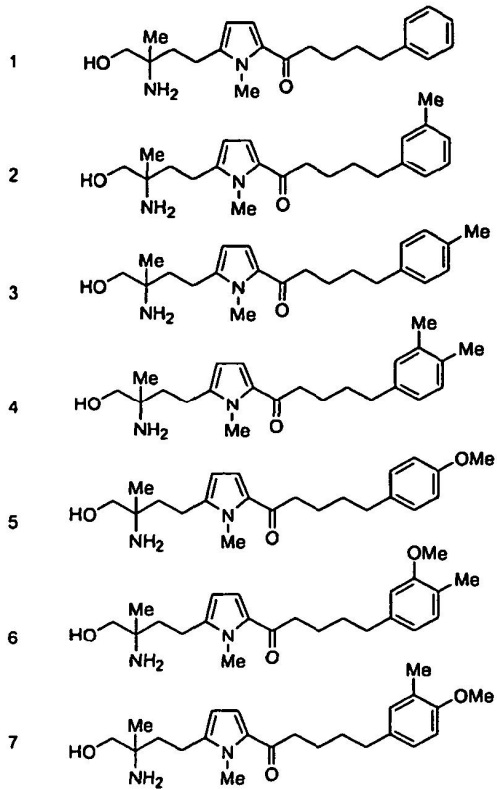
- 15 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[5-(4-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[5-(3,4-dimetilfenil)pentanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[5-(3-metil-4-metoxifenil)pentanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[5-(3-metoxi-4-metilfenil)pentanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 20 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[5-(4-cianofenil)pentanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(3-metil-4-metoxifenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(3-metoxi-4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 25 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(4-cianofenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol,

Compuestos más particularmente preferidos incluyen

- (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 30 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(3-metil-4-metoxifenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(3-metoxi-4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol,
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-[4-(4-cianofenil)butanoil]pirrol-2-il]butan-1-ol, y
 (2R)-2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]propan-1,3-diol,
 35 Las fórmulas estructurales de los compuestos preferidos como derivados de alcoholamino representados por la
 fórmula general (I) se mostrarán más adelante.

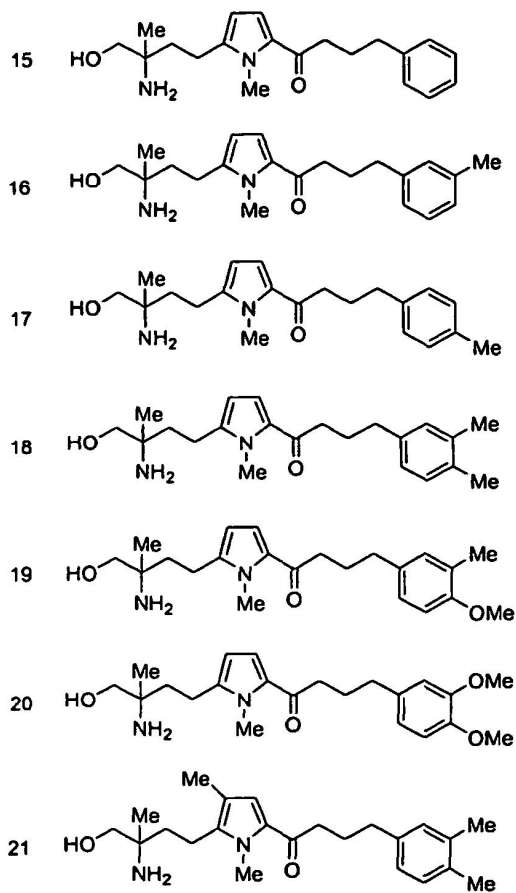
Nº de Compuesto

Fórmula estructural



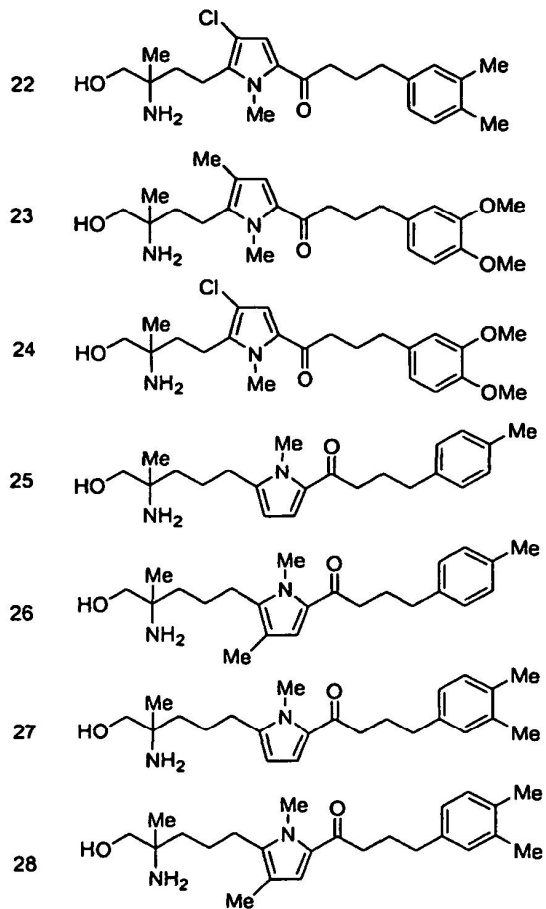
Nº de Compuesto

Fórmula estructural



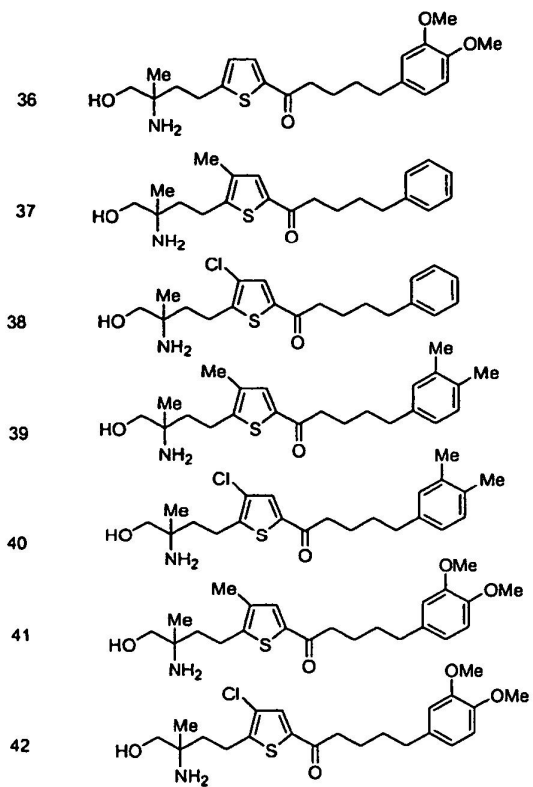
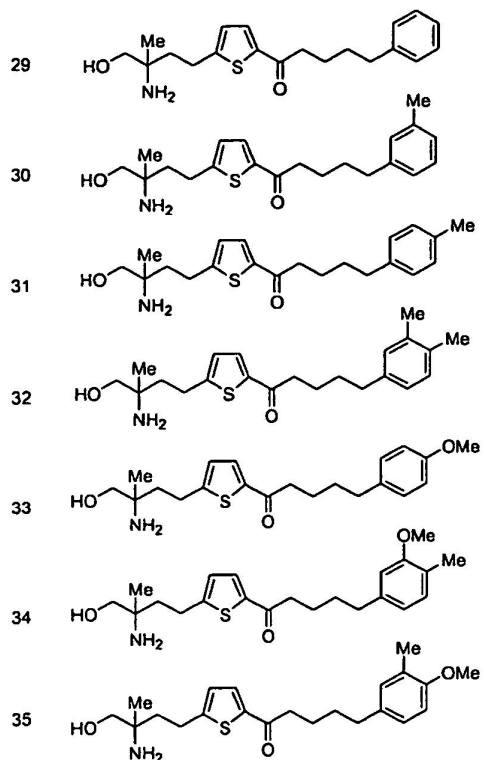
Nº de Compuesto

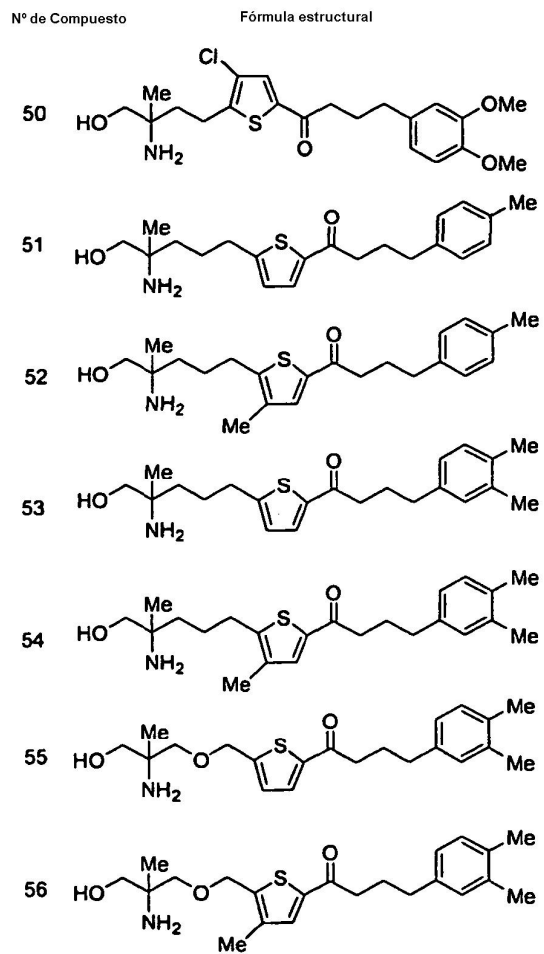
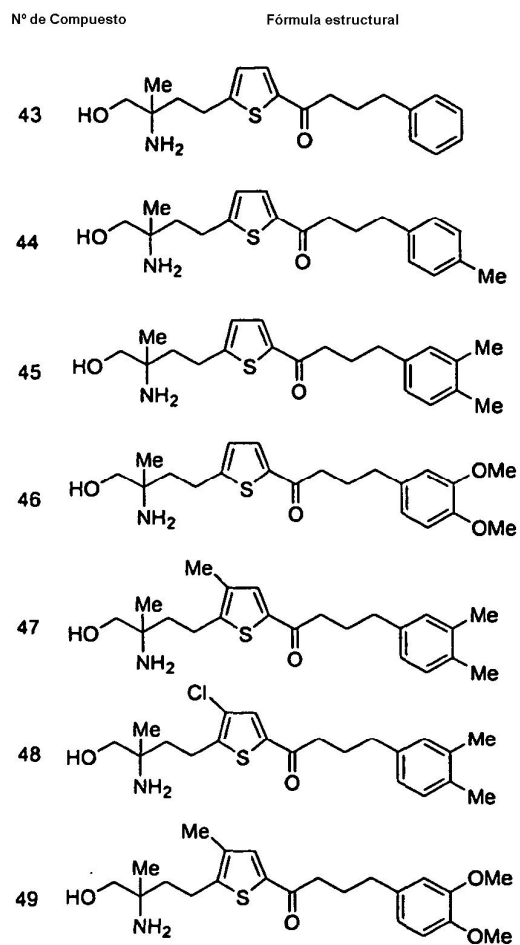
Fórmula estructural



Nº de Compuesto

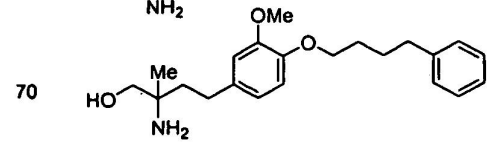
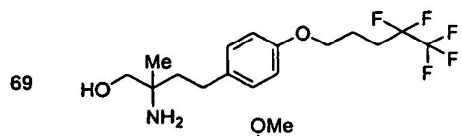
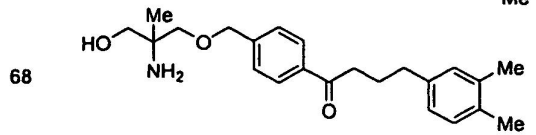
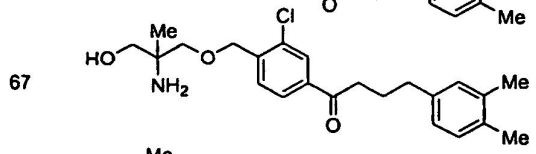
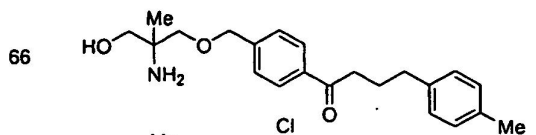
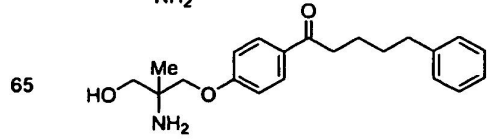
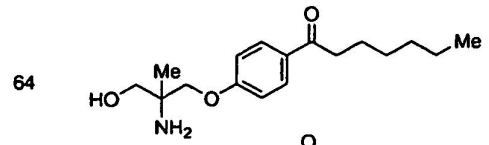
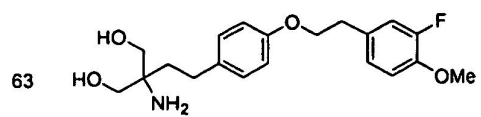
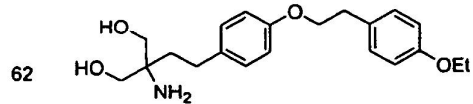
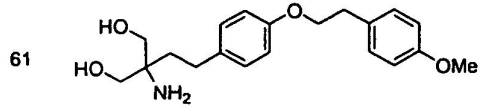
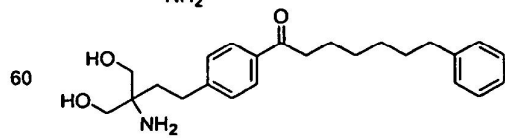
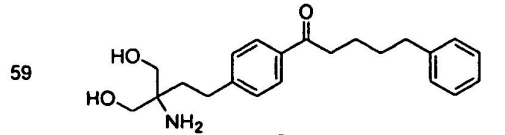
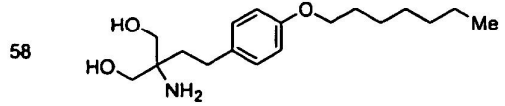
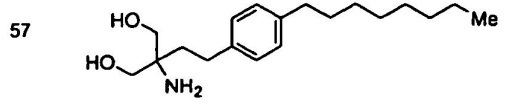
Fórmula estructural

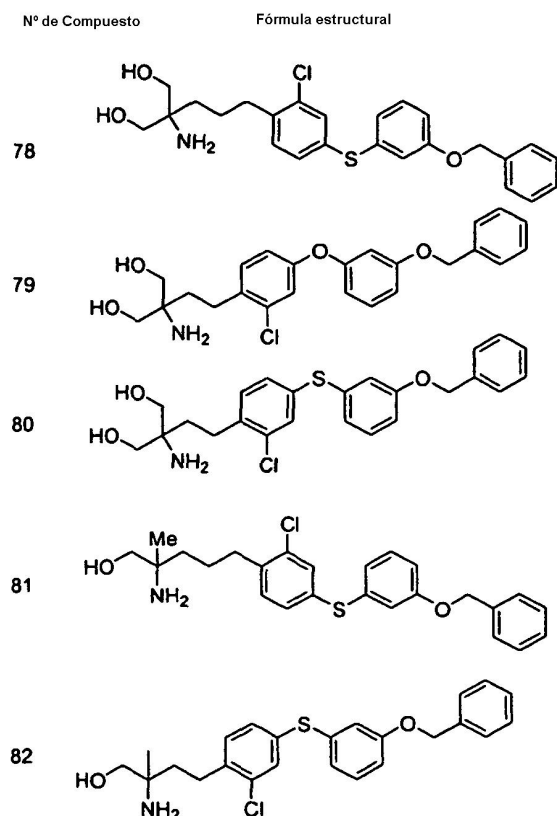
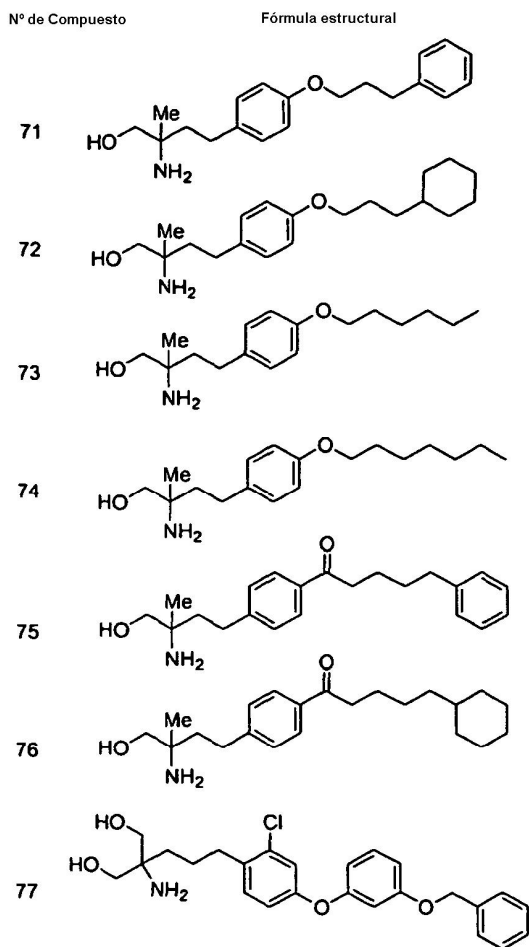




N° de Compuesto

Fórmula estructural





5 Ejemplos del "grupo alquilo C1-C6" en las definiciones de los R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ mencionados anteriormente incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo 2-metilpropilo, un grupo 3-metilpropilo, un grupo 2,2,2-trimetimetilo, un grupo pentilo y un grupo hexilo. Ejemplos preferidos del "grupo alquilo C1-C6" incluyen un grupo metilo, un grupo etilo y un grupo propilo. Ejemplos más preferidos incluyen un grupo metilo y un grupo etilo.

El "átomo de halógeno" en las definiciones de los R⁴ y R⁵ mencionados anteriormente es un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo o un átomo de yodo. El "átomo de halógeno" es, preferentemente, un átomo de flúor o un átomo de cloro.

10 Ejemplos del "grupo alcoxi C1-C6" en las definiciones de los R⁴ y R⁵ mencionados anteriormente incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo propoxi, un grupo isopropoxi, un grupo butoxi, un grupo 2-metilpropoxi, un grupo 3-metilpropoxi, un grupo 2,2,2-trimetimetoxi, un grupo pentiloxi y un grupo hexiloxi. Ejemplos preferidos del "grupo alcoxi C1-C6" incluyen un grupo metoxi y un grupo etoxi.

15 Ejemplos el "grupo cicloalquilo C3-C6" en las definiciones de R⁵ mencionado anteriormente incluyen un grupo ciclopropilo, un grupo ciclobutilo, un grupo ciclopentilo y un grupo ciclohexilo. Ejemplos preferidos del "grupo cicloalquilo C3-C6" incluyen un grupo ciclopropilo y un grupo ciclohexilo.

20 Ejemplos del "grupo halógeno alquilo C1-C6" en las definiciones de R⁵ mencionado anteriormente incluyen grupos formados sustituyendo los grupos alquilo C1-C6 mencionados anteriormente con halógeno, tales como un grupo fluorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo fluoroetilo, un grupo difluoroetilo, un grupo trifluoroetilo, un grupo fluoropropilo, un grupo difluoropropilo, un grupo trifluoropropilo, un grupo fluorobutilo, un grupo difluorobutilo, un grupo trifluorobutilo, un grupo fluoropentilo, un grupo difluoropentilo, un grupo trifluoropentilo, un grupo fluorohexilo, un grupo difluorohexilo, un grupo trifluorohexilo, un grupo pentafluoroetilo, un grupo hexafluoropropilo, un grupo nonafluorobutilo, un grupo clorometilo, un grupo diclorometilo, un grupo triclorometilo, un grupo cloroetilo, un grupo dicloroetilo, un grupo tricloroetilo, un grupo cloropropilo, un grupo dicloropropilo, un grupo tricloropropilo, un grupo clorobutilo, un grupo diclorobutilo, un grupo triclorobutilo, un grupo cloropentilo, un grupo dicloropentilo, un grupo tricloropentilo, un grupo clorohexilo, un grupo diclorohexilo, un grupo triclorohexilo, un grupo

5 pentacloroetilo, un grupo hexacloropropilo y un grupo nonaclorobutilo. Ejemplos preferidos del "grupo halógeno alquilo C1-C6" incluyen un grupo fluorometilo, un grupo difluorometilo, un grupo trifluorometilo, un grupo fluoroetilo, un grupo difluoroetilo, un grupo trifluoroetilo, un grupo fluoropropilo, un grupo difluoropropilo y un grupo trifluoropropilo. Ejemplos más preferidos del "grupo alquilo C1-C6" incluyen un grupo trifluorometilo y grupo trifluoroetilo.

10 Ejemplos el "grupo alquileo C1-C8" en las definiciones de Z mencionado anteriormente incluyen un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo propileno, un grupo tetrametileno, un grupo pentametileno, un grupo hexametileno, un grupo heptametileno y un grupo octametileno. Un ejemplo preferido del "grupo alquileo C1-C8" es un grupo alquileo que tiene de 2 a 8 átomos de carbono. Ejemplos más preferidos incluyen un grupo etileno, un grupo propileno, un grupo tetrametileno, un grupo heptametileno y un grupo octametileno.

15 Ejemplos del "grupo alquileo C1-C8 sustituido con de 2 a 8 átomos de flúor" en las definiciones de Z mencionada anteriormente incluyen un grupo difluorometileno, un grupo 1,1-difluoroetileno, un grupo 1,1,2,2-tetrafluoroetileno, un grupo 1,1-difluoropropileno, un grupo 1,1,2,2-tetrafluoropropileno, un grupo 1,1-difluorotetrametileno, un grupo 1,1,2,2-tetrafluorotetrametileno, un grupo 1,1-difluoropentametileno y un grupo 1,1,2,2-tetrafluoropentametileno. Ejemplos preferidos del "grupo alquileo C1-C8 sustituido con de 2 a 8 átomos de flúor" incluyen un grupo 1,1-difluoropropileno, un grupo 1,1,2,2-tetrafluoropropileno, un grupo 1,1-difluorotetrametileno, un grupo 1,1,2,2-tetrafluorotetrametileno, un grupo 1,1-difluoropentametileno y un grupo 1,1,2,2-tetrafluoropentametileno.

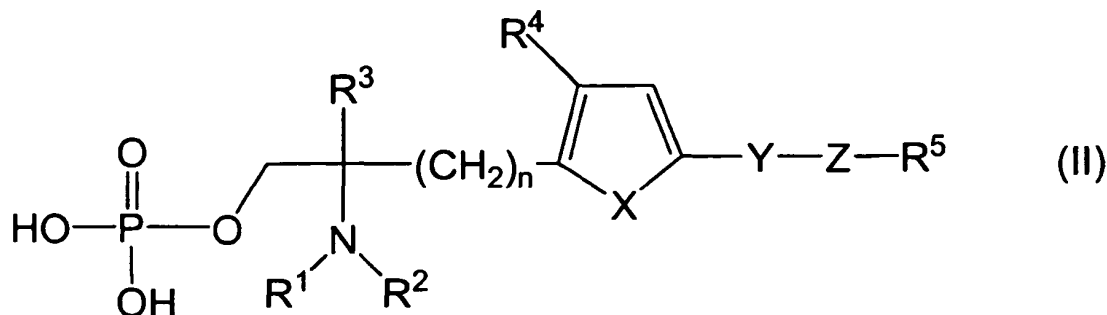
20 El derivado de aminoalcohol representado por la fórmula general (I) anterior tiene un grupo amino como grupo básico. Por tanto, la "sal" mencionada anteriormente significa una sal obtenida como resultado de la reacción del derivado alcohol amino con un ácido. Ejemplos de dicha sal incluyen: Sales de ácidos inorgánicos, incluyendo sales de ácido de halógeno tales como sal de ácido fluorhídrico, bromhidrato o yodhidrato, nitrato, perclorato, sulfato y fosfato; sales de ácidos orgánicos, incluyendo alquilsulfonatos inferiores tales como metanosulfonato, trifluorometanosulfonato o etanosulfonato, arilsulfonatos tales como bencenosulfonato o p-toluenosulfonato, acetato, malato, fumarato, succinato, citrato, ascorbato, tartrato, oxalato y maleato; y sales de aminoácido tales como una sal de glicina, una sal de lisina, una sal de arginina, una sal de ornitina, glutamato y aspartato. Entre estas sales se prefieren clorhidrato, acetato, fumarato, succinato y maleato.

30 En la presente invención, cuando el derivado de aminoalcohol representado por la fórmula general (I) anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un átomo de carbono asimétrico en su molécula, incluye un isómero óptico. Entre los derivados de aminoalcohol representados por la fórmula general (I) anterior, los compuestos que tienen un átomo de carbono asimétrico se pueden representar como una fórmula sencilla, es decir como la forma R. No obstante, dependiendo del procedimiento de producción y similares puede haber casos en los que la forma S esté mezclada como un subproducto. De acuerdo con esto, en este caso, el derivado de aminoalcohol representado por la fórmula general (I) anterior incluye principalmente la forma R como isómero óptico, pero incluye parcialmente la forma S también.

35 Cuando el derivado de aminoalcohol representado por la fórmula general (I) anterior o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se deja en el aire o se recristaliza, absorbe agua y, por tanto, contiene agua de adsorción o se convierte en un hidrato. Dichos hidratos también están incluidos en la sal farmacéuticamente aceptable del derivado de aminoalcohol representado por la fórmula general (I) anterior.

6. Procedimiento de producir éster fosfórico del compuesto (I) usando FN3KRP humana y/o F N3K humana

40 Un compuesto representado por la fórmula general (II) siguiente se puede producir a partir del compuesto representado por la fórmula general (I) anterior usando FN3KRP humana y/o FN3K humana:



45 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, X, Y y Z tiene las mismas definiciones que las descritas para el compuesto (I) mencionado anteriormente. En lo sucesivo en el presente documento, el compuesto representado por la fórmula general (II) también se denomina "compuesto (II)".

El compuesto (II) que es un éster fosfórico del compuesto (I) se puede producir poniendo en contacto el compuesto (I) con FN3KRP humana y/o FN3K humana.

Un ejemplo específico de un procedimiento de producir el compuesto (II) es el procedimiento siguiente. No obstante, los ejemplos no están limitados a ellos, siempre que sea un procedimiento capaz de producir el compuesto (II).

5 (1) FN3KRP humana y/o FN3K humana

La FN3KRP humana y/o la FN3K humana usadas en la producción de compuesto (II) se pueden obtener a partir de eritrocitos de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 4 anterior o se pueden obtener a partir de células que expresan dichas FN3KRP humana y/o FN3K humana. La FN3KRP humana y/o la FN3K humana se pueden usar tras purificación. Como alternativa también se pueden usar productos más o menos purificados o el propio extracto celular. Asimismo, se pueden usar directamente células que expresan FN3KRP humana y/o FN3K humana.

(2) Reacción enzimática

El procedimiento de producción de la presente invención se puede llevar a cabo en diversas realizaciones. Ejemplos del procedimiento de producción incluyen: (a) un procedimiento de poner en contacto el compuesto (I) con las células que expresan FN3K humana y/o FN3KRP humana; (b) un procedimiento de poner en contacto el compuesto (I) con un extracto de células que expresan FN3K humana y/o FN3KRP humana y (c) un procedimiento de poner en contacto el compuesto (I) con FN3K humana y/o FN3KRP humana purificadas o más o menos purificadas.

Cuando el compuesto (II) se produce a partir del compuesto (I) usando FN3K humana y/o FN3KRP humana, se desea usar condiciones en las que se produce la reacción enzimática.

El producto generado por la reacción enzimática se puede analizar midiendo la cantidad del compuesto (II) generado como producto de la reacción enzimática tras la finalización de la reacción enzimática. La cantidad del compuesto (II) generada no está particularmente limitada, siempre que sea suficiente para medir el nivel de generación del compuesto (II). Por ejemplo, el producto de reacción se somete a HPLC para medir el pico del compuesto (II), para llevar a cabo la medición.

Además, el compuesto (II) como producto de la reacción enzimática se puede purificar a partir del sistema de reacción.

7. Procedimiento de detección selectiva de una sustancia fosforilada por FN3K humana y/o FN3KRP humana

Una sustancia fosforilada por FN3KRP humana y/o FN3K humana se puede identificar mediante el procedimiento siguiente, El presente procedimiento comprende las etapas siguientes:

(1)

- 30 (i) poner en contacto la FN3KRP humana y/o la FN3K humana con una sustancia de ensayo;
- (ii) medir la cantidad de éster fosfórico de la sustancia de ensayo generada; y
- (iii) comparar la cantidad del éster fosfórico generado medida en (ii) anteriormente con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con FN3KRP humana o FN3K humana,

(2)

- 35 (i) poner en contacto la FN3KRP humana y/o la FN3K humana con una sustancia de ensayo;
- (ii) medir la cantidad de éster fosfórico de la sustancia de ensayo generada; y
- (iii) comparar la cantidad del éster fosfórico generado medida en (ii) anteriormente con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con FN3KRP humana o FN3K humana, y
- 40 (iv) determinar que la sustancia de ensayo se ha fosforilado, cuando la cantidad del éster fosfórico medida en (ii) anteriormente es mayor en comparación con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con FN3KRP humana o FN3K humana.

45 Cada etapa se describirá a continuación.

Concerniente a (1)

Respecto a (1)-(i)

El tipo de FN3KRP humana o FN3K humana usada en la presente etapa no está particularmente limitado. Las

células que expresan FN3KRP humana o FN3K humana se pueden usar directamente. Además, también se puede usar una solución de células disgregadas, FN3KRP humana o FN3K humana más o menos purificadas de dichas células y FN3KRP humana o FN3K humana purificadas. Adicionalmente, también se pueden usar las obtenidas mediante el procedimiento descrito en la sección anteriormente mencionada "4. Expresión de FN3K humana y/o FN3KRP humana".

Como sustancia de ensayo se pueden usar las sustancias descritas en la sección anteriormente mencionada "5. Compuesto fosforilado por enzima fosforilante" y también se pueden usar otros compuestos. Ejemplos de estos otros compuestos incluyen compuestos distintos al compuesto representado por la fórmula general (I), metabolitos microbianos, extractos de tejidos vegetales o animales, derivados de los mismos y mezclas de los mismos. La dosis y la concentración e la sustancia de ensayo se pueden determinar, según sea adecuado, o múltiples tipos de dosis también se pueden determinar preparando dilución en serie, por ejemplo. La sustancia de ensayo se puede administrar en un estado adecuado, tal como un sólido o un líquido. La sustancia de ensayo también se puede disolver en un tampón adecuado, o un estabilizante y similares se pueden añadir a la sustancia de ensayo. En el caso de un procedimiento de detección selectiva con células cultivadas, la sustancia de ensayo se puede añadir a un medio de cultivo y, después, se puede cultivar. En el caso de añadir la sustancia de ensayo a dicho medio, la sustancia de ensayo se puede añadir desde el principio del cultivo o durante el cultivo. Además, el número de adiciones de la sustancia de ensayo no está limitado a una. El periodo de cultivo para cultivar las células en presencia de la sustancia de ensayo se puede determinar según sea adecuado. Preferentemente es durante 30 minutos a 48 horas. Cuando la sustancia de ensayo se administra a un mamífero individual, se pueden usar formas de administración tales como administración oral, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección percutánea e inyección hipodérmica, según sea adecuado, dependiendo de las propiedades físicas de la sustancia de ensayo etc. Además, el tiempo requerido desde la administración de la sustancia de ensayo a la obtención de una muestra se puede seleccionar, según sea adecuado.

Se puede añadir un tampón para ajustar el pH a la solución de reacción, según sea necesario.

Estos materiales se mezclan y después se lleva a cabo la reacción siguiente, por ejemplo.

Condiciones de temperatura: 0° C a 45° C, preferentemente 37° C

pH de la solución de reacción: pH 6 - 9, preferentemente pH 7,4

Tiempo de reacción: de 30 segundos a 24 horas, preferentemente 3 horas

La reacción se puede llevar a cabo usando una placa de ensayo de 384 pocillos, por ejemplo.

Respecto a (1)-(ii)

Un ejemplo de un procedimiento de medir el éster fosfórico del compuesto de ensayo es un procedimiento de realizar una determinación separada sobre un producto usando HPLC. Como tal procedimiento, se aplica el siguiente procedimiento, por ejemplo. No obstante, ejemplos del procedimiento no se limitan a éste.

Columna: YMC-Pack ODS-A A-312 (6,0 mm (diámetro) 150 mm (longitud);

Tamaño de partícula: 5 µm; YMC)

Fase móvil: 40% de acetonitrilo / 0,1 % de ácido trifluoroacético

Caudal: 1 ml / min

Procedimiento de elución: Elución isocrática

Temperatura de la columna: 40° C

Longitud de onda de detección: 295 nm

Respecto a (1)-(iii)

La cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con FN3KRP humana o FN3K humana se puede medir mediante el mismo procedimiento que el descrito en (1)-(ii) anteriormente. Después, la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo que está en contacto con FN3KRP humana o FN3K humana se puede comparar con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo que no está en contacto con FN3KRP humana o FN3K humana.

Concerniente a (2)

Respecto a (2)-(i) a (iii)

Estas etapas se pueden llevar a cabo mediante los mismos procedimientos que los descritos en (1)-(i) a (iii)

anteriormente.

Respecto a (2)-(iv)

5 Como resultado de la comparación en (2)-(iii) anterior, cuando la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo en (ii) anterior es mayor que en (iii) anterior, se puede determinar que la sustancia de ensayo se ha fosforilado.

8. Procedimiento de analizar la capacidad de un paciente para metabolizar el fármaco usando la capacidad de fosforilación

La FN3KRP humana y/o la FN3K humana tienen la función de fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I) para convertirlo en el éster fosfórico representado por la fórmula general (II).

10 De acuerdo con el procedimiento siguiente se puede analizar la capacidad de un paciente para metabolizar un fármaco representado por la fórmula general (I).

(1) Procedimiento que usa el nivel de expresión del gen de FN3KRP humana y/o de FN3K humana como indicador

Este procedimiento comprende las siguientes etapas (i) a (iii):

(i) extraer el ARN total de una muestra obtenida de un sujeto;

15 (ii) medir el nivel de expresión del gen de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en el ARN total; y

(iii) comparar el nivel de expresión del gen de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en (ii) anterior con el nivel de expresión del gen de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

20 (2) Procedimiento que usa el nivel de expresión de la proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana como indicador

Este procedimiento comprende las siguientes etapas (i) a (ii):

25 (i) medir el nivel de expresión de una proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en una muestra recogida de un sujeto, usando un anticuerpo o un ligando que se une específicamente a la proteína mencionada con anterioridad; y

(ii) comparar el nivel de expresión de la proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en (i) anterior con el nivel de expresión de la proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

30 (3) Procedimiento que usa la actividad enzimática de la proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana como indicador

Este procedimiento comprende las siguientes etapas (i) a (ii):

(i) medir la actividad enzimática de una proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en una muestra recogida de un sujeto; y

35 (ii) comparar la actividad enzimática de la proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en (i) anterior con la actividad enzimática de la proteína de FN3KRP humana y/o de FN3K humana en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

(4) Procedimientos que usan mutación genética

40 (i) determinar la secuencia nucleotídica de la FN3KRP humana y/o la FN3K humana en un gen de FN3KRP humana y/o la FN3K humana en una muestra recogida de un sujeto;

(ii) examinar en la secuencia de nucleótidos del gen de la FN3KRP humana y/o la FN3K humana la presencia o ausencia de una mutación que afecte a la actividad enzimática; y

45 (iii) determinar que un sujeto que en la secuencia de nucleótidos una mutación que disminuye la actividad del gen de la FN3KRP humana y/o la FN3K humana tiene únicamente una actividad baja de fosforilación del compuesto representado por la fórmula general (I) y determinar que un sujeto que no tiene en la secuencia de nucleótidos ninguna mutación que disminuya la actividad del gen de la FN3KRP humana y/o la FN3K humana tiene la capacidad de fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

9. Kit diagnóstico

La FN3KRP humana y/o la FN3K humana tiene la capacidad de fosforilar un compuesto que se activa mediante la fosforilación *in vivo*. De acuerdo con esto, usando el siguiente kit se puede analizar la capacidad de un sujeto para metabolizar un fármaco.

5 Específicamente, el kit es el siguiente:

Un kit para diagnosticar la capacidad para metabolizar un fármaco, que comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (1) a (5):

10 (1) un cebador oligonucleotídico que comprende de 15 a 30 nucleótidos contiguos que se usa para amplificar específicamente una parte de todo el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o 3 en el listado de secuencias:

(2) una sonda polinucleotídica que comprende 15 o más nucleótidos contiguos que hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o 3 en el listado de secuencias, para detectar el polinucleótido descrito anteriormente;

15 (3) una muestra en fase sólida que tiene un polinucleótido seleccionado del cebador oligonucleotídico descrito en (1) anteriormente o la sonda polinucleotídica descrita en (2) anterior inmovilizada en la misma;

(4) un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido seleccionado de los siguientes (a) a (c) para detectar la proteína:

(a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos n° 1-309 de la SEC ID N° 2 en el listado de secuencias:

20 (b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos n° 1-309 de la SEC ID N° 4 en el listado de secuencias; y

25 (c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una deleción, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido seleccionado del anterior (a) y (b) y que tiene la capacidad de fosforilar el (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol; y

(5) un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo descrito en (4) anteriormente.

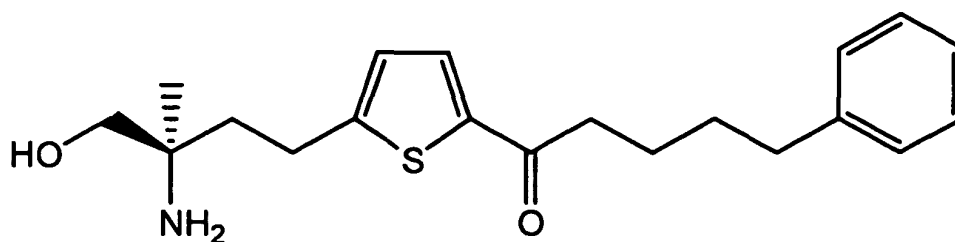
Ejemplos

30 La invención se describirá en los ejemplos siguientes. No obstante, estos ejemplos no están destinados a limitar el ámbito de la presente invención. En los ejemplos siguientes se llevaron a cabo procedimientos para manipulación genética de acuerdo con los procedimientos descritos en Molecular Cloning, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, y otros manuales experimentales y también de acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, a menos que se especifique lo contrario. Cuando se usan reactivos o kits disponibles comercialmente, los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los manuales de instrucción incluidos en los productos disponibles comercialmente,

35 **(Ejemplo de referencia)**

Obtención de (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol,

40 (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol (en lo sucesivo en el presente documento también denominado "compuesto 1") representado por la fórmula general (I), que se usará en el experimento siguiente, se puede producir mediante los procedimientos descritos en, por ejemplo, la publicación internacional Boletín WO94/08943, la publicación internacional Boletín WO96/06068, la publicación internacional Boletín WO98/45249, la publicación internacional Boletín WO03/029184, la publicación internacional Boletín WO03/029205, la publicación internacional Boletín WO02/06268 (Ejemplo 19), la publicación internacional Boletín WO03/059880, la publicación internacional Boletín WO05/005383, la publicación internacional Boletín WO05/063671, etc.



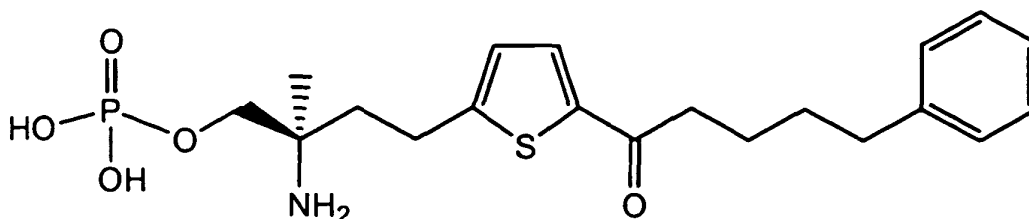
(I) (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol (compuesto 1)

(Ejemplo 1)– Preparación de sangre entera humana

5 Se recogieron aproximadamente 100 ml de cada uno de sangre periférica de cada uno de los dos donantes de sangre anónimos. Se añadió aproximadamente 11 ml de una solución acuosa de citrato trisódico bihidrato al 3,2 % (peso/volumen) como anticoagulante hasta 100 ml de sangre periférica humana para preparar sangre entera humana. Después, la sangre entera humana se fraccionó en fracciones tales como eritrocitos, plasma, trombocitos y linfocitos de acuerdo con un procedimiento habitual.

10 **(Ejemplo 2) Confirmación de la actividad fosforilante y localización de la actividad fosforilante**

Se midió la actividad fosforilante de cada componente constitucional obtenido en el Ejemplo 1 del compuesto 1. El compuesto 1 se usó como sustrato de reacción y la actividad fosforilante se midió cuantificando la cantidad de éster mono(2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butílico de ácido fosfórico (el éster fosfórico del compuesto 1) generado como producto de reacción.



15

Éster mono(2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butílico del ácido fosfórico

Se prepararon trece tubos de 1,5 ml de polipropileno. La sangre entera, el plasma, eritrocitos, trombocitos y linfocitos obtenidos en el Ejemplo 1 se usaron de forma individual o en combinaciones, tales como sangre entera, plasma, eritrocitos, trombocitos, linfocitos, eritrocitos + plasma, trombocitos + plasma, linfocitos + plasma, eritrocitos + trombocitos + linfocitos + plasma, eritrocitos + trombocitos + linfocitos, eritrocitos + trombocitos + plasma, eritrocitos + linfocitos + plasma y trombocitos + linfocitos + plasma. Estas combinaciones de los componentes constituyentes de la sangre se dispensaron en los tubos, seguido de enfriamiento en hielo. La cantidad dispensada del componente de la sangre dispensada en cada tubo siempre se fijó a 500 µl. Cuando se mezclaron dos o más componentes constituyentes se mezclaron cantidades iguales hasta una cantidad total de 500 µl. Es decir, cuando se mezclaron dos componentes constituyentes se dispensaron 250 µl de cada componente. Cuando se mezclaron tres tipos de componentes se dispensaron 166,7 µl de cada componente. Cuando se mezclaron cuatro tipos de componentes se dispensaron 125 µl de cada componente. Por tanto, la cantidad total siempre se fijó a 500 µl. 0,5 µl de un compuesto 100 mg/ml de una solución de 1/dimetil sulfóxido se añadieron a cada tubo, seguido de mezclado (concentración final: 100 µg/ml). Después, la solución se enfrió en hielo y se incubó después en un baño de agua caliente a 37 °C durante 30 minutos. Después el tubo se transfirió a hielo. A cada tubo se añadió 1 ml de metanol y después se mezclaron. Después, la solución resultante se conservó a -20 °C hasta que se llevó a cabo la medición con HPLC.

La cantidad del ácido fosfórico éster mono(2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butílico (el éster fosfórico del compuesto 1) generado como producto de reacción se midió usando el aparato siguiente en las condiciones siguientes.

35 HPLC: Sistema LC-10A_{VP} (Shimadzu Corp.)

Columna: YMC-Pack ODS-A A-312 (6,0 mm (diámetro) 150 mm (longitud); tamaño de partícula: 5 µm; YMC)

Fase móvil: 40% de acetonitrilo / 0,1% de ácido trifluoroacético

Caudal: 1 ml / min

40 Procedimiento de elución: Elución isocrática

Temperatura de la columna: 40° C

Longitud de onda de detección: 295 nm

Tiempo de retención: 6,7 minutos (el éster fosfórico del compuesto 1); 11,1 minutos (compuesto 1); 14,2 minutos (1-naftol, una sustancia patrón interna)

5 Tras la finalización de la reacción se añadieron al tubo 10 µg/ml de una solución de 1-naftol/metanol hasta una concentración final de 2,5 µg/ml. Después, la mezcla obtenida se centrifugó a 21.600 x g a 4 °C durante 3 minutos. Después se cargaron 30 µl del sobrenadante en el aparato de HPLC mencionado anteriormente y se midió el valor de la AUC de un pico que aparece durante cada tiempo de retención. El valor de la AUC del compuesto se calibró con el valor de la AUC de 1-naftol usado como sustancia patrón interno y después se extrapola mediante una curva de calibración, que se había producido por separado, para obtener la concentración del compuesto.

10 Como resultado de la medición, como se muestra en la Figura 1, cuando los eritrocitos estaban presentes en el sistema de reacción, la cantidad del éster fosfórico del compuesto 1 generado se convirtió en elevada y, por tanto, se reveló que el compuesto 1 se había fosforilado. De acuerdo con esto, se hizo claro que, de entre los componentes constituyentes en sangre entera, los eritrocitos desempeñan un papel fundamental en la fosforilación del compuesto 1.

(Ejemplo 3) Localización de la enzima que fosforila el compuesto 1 en eritrocitos humanos

Los eritrocitos se fraccionaron en una fracción soluble y una fracción de membrana de acuerdo con un procedimiento habitual. La reacción de fosforilación del compuesto 1 se examinó mediante el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 2, se confirmó que había una fuerte actividad de fosforilación en la fracción soluble de eritrocitos. Por tanto, se reveló que una enzima que fosforila compuesto 1 está fundamentalmente presente en la fracción soluble de eritrocitos.

(Ejemplo 4) Purificación de la enzima que fosforila el compuesto 1 de la fracción soluble de eritrocitos (1)

Una enzima que fosforila el compuesto 1 se purificó de una fracción soluble de eritrocitos humana de acuerdo con el procedimiento siguiente,

25 (1) Procedimiento de medición de la actividad enzimática

100 µg/ml del compuesto 1, ATP 1 mM, 0,5% de CHAPS y HEPES 100 mM (pH 7,0) se añadieron a 45 µl de una muestra usada en la medición de la actividad enzimática, hasta una cantidad total de 75 µl. Cuando a la solución de reacción se añadió 1-desoxi-1-morfolinofructosa (DMF; Sigma), se añadió hasta una concentración final de 1 mM. La solución mixta se incubó a 37 °C durante 1 hora para fosforilar el compuesto 1. Después, la solución de reacción se añadieron 150 µl de metanol y la mezcla se filtró después a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,45 µm, para terminar la reacción y eliminar la proteína. 10 µl del filtrado se sometieron a una columna de cromatografía de fase inversa (TSK-gel ODS-100S; 4,6 mm (diámetro) x 150 mm (longitud); Tosoh Corp) La elución isocrática se llevó a cabo usando 40 % de acetonitrilo que comprende 0,1 % de ácido trifluoroacético a un caudal de 1 ml/min a una temperatura de columna de 40 °C. El compuesto 1 y el éster fosfórico del compuesto 1 generados se detectaron a 295 nm. La cantidad del éster fosfórico del compuesto 1 generado se midió en base a un área pico. La actividad necesaria para generar 1 µg/ml del éster fosfórico del compuesto 1 en las condiciones mencionadas anteriormente se definió como 1 U/ml. En el posterior procedimiento de purificación, con el fin de medir la actividad de una enzima que fosforila el compuesto 1 se usó el presente procedimiento de medición.

(2) Purificación de la enzima que fosforila el compuesto 1 de la fracción soluble de eritrocitos humanos

40 Se recogieron 100 ml de sangre de cinco voluntarios anónimos, de modo que se recogió un total de 500 ml de sangre. Usando la actividad de fosforilación el compuesto 1 como indicador, una fracción soluble de eritrocitos preparada de acuerdo con un procedimiento habitual se purificó usando cada uno de desalación de sulfato amónico, una columna de interacción hidrofóbica (HiTrap Phenyl HP 5 ml, GE Healthcare Biosciences), una columna de afinidad de unión a pigmento (HiTrap Blue HP 1 ml, GE Healthcare Biosciences), una columna de intercambio aniónico (Resource Q 1 ml, GE Healthcare Biosciences), una columna de intercambio catiónico (Resource S 1 ml, GE Healthcare Biosciences), columna de intercambio catiónico (Mono S PC 1,6/5, GE Healthcare Biosciences), y una columna de filtración en gel (Superdex 75 PC 3,2/30, GE Healthcare Biosciences). Como resultado, la actividad del compuesto fosforilante 1 en la fracción soluble de eritrocitos humana se concentró hasta aproximadamente 10.000 veces, como se muestra en la Tabla 1.

50 Tabla 1. Tabla de purificación de FN3K humana

Etapa de purificación	Concentración de proteína [µg/ml]	Actividad [U/ml]	Volumen [ml]	Cantidad de proteína total [mg]	Actividad total [U]	Actividad específica [U/mg]	Eficiencia de la purificación.	Tasa de recuperación de la actividad [%]
-----------------------	-----------------------------------	------------------	--------------	---------------------------------	---------------------	-----------------------------	--------------------------------	--

(Cont.)

Fracción soluble	83000	3,2	50	4100	160	0,039	1,0	100
1) Precipitación en sulfato amónico	9000	7,3	50	450	367	0,81	21	230
2) columna de interacción hidrofóbica	170	1,7	60	10	100	10	260	63
3) Columna de afinidad de unión a pigmento	870	5,1	4,0	3,5	20	5,9	150	13
4) Cromatografía de intercambio aniónico	210	2,1	10	2,1	21	10	260	13
5) Cromatografía de intercambio catiónico	87	2,8	4,0	0,35	11	32	820	6,9
6) Cromatografía de intercambio catiónico	10	7,1	0,20	0,0020	1,4	710	18000	0,88
7) Cromatografía de filtración en gel	4	1,6	0,10	0,00040	0,16	410	10000	0,10

(Ejemplo 5) Identificación de la enzima que fosforila el compuesto 1 mediante espectrometría de masas (1)

- 5 La fracción activa obtenida en el Ejemplo 4 se sometió a SDS-PAGE y después se cortó cada banda del gel de SDS-PAGE. De acuerdo con un procedimiento habitual se añadió tripsina (tripsina modificada, Promega) y se llevó a cabo una reacción de digestión a 37 °C durante 12 horas. El péptido digerido se sometió a cromatografía de líquidos (CL)/tándem con espectrometría de masas (EM/EM). Los datos obtenidos de la espectrometría de masas se analizaron mediante software buscando en la base de datos (Mascot, Matrix Science). Como base de datos se usó la base de datos nr de GenBank por el National Center for Biotechnology Information.

10 Como resultado se reveló que la enzima que fosforila el compuesto 1 es una secuencia de fructosamina-3-quinasa humana (FN3K, GenBank N° de acceso NP_071441).

(Ejemplo 6) Purificación de la enzima que fosforila el compuesto 1 de la fracción soluble de eritrocitos (2)

- 15 Con el fin de confirmar que la FN3K humana es una enzima que fosforila el compuesto 2 se llevó a cabo un experimento de inhibición usando DMF, que se sabe que es un inhibidor competitivo de la FN3K inmunoglobulina (Biochem. J. (2000) Vol. 352, pág. 835-839). La fracción activa de la columna de interacción hidrofóbica en la segunda etapa de purificación en el ejemplo 4 se inhibió significativamente con DMF y el valor de la Cl_{50} del mismo fue de aproximadamente 1 μ M. Por tanto, se confirmó que la FN3K humana es una enzima que fosforila el compuesto 1.
- 20 Por otro lado, en el caso de una fracción soluble y una muestra obtenida mediante resolubilización del precipitado de sulfato amónico obtenido en la primera etapa de purificación, dicha inhibición por DMF apenas se observó. Por tanto, existe una fuerte sugerencia de la presencia de otra enzima para fosforilar el compuesto 1 que difiere de la FN3K humana. Considerando el grado de inhibición por DMF se supuso que esta enzima que difería de la FN3K humana es una enzima que fosforila principalmente el compuesto 1. Por tanto, esta enzima se purificó después.
- 25 Para la purificación, la actividad enzimática siempre se midió en presencia o ausencia de DMF 1 mM, de modo que

la purificación se llevó a cabo usando actividad que no ha sido inhibida por DMF como indicador.

5 El precipitado en sulfato amónico obtenido en el ejemplo 4 se fraccionó por cada una de una columna de intercambio aniónico (HiPrep Q 16/10 XL, GE Healthcare Biosciences), una columna de afinidad de unión a pigmento (HiTrap Blue HP 1 ml), una columna de intercambio catiónico (Mono S PC 1.6/5), una columna de filtración en gel (Superdex 75 PC 3.2/30).

Como resultado del procedimiento de purificación de 5 etapas mencionado anteriormente, como se muestra en la tabla 2, el DMF no inhibió la actividad enzimática tras la segunda etapa de purificación y la actividad específica de la enzima que fosforila el compuesto 1 se incrementó finalmente en aproximadamente 16.000 veces mediante este procedimiento de purificación.

Tabla 2. Tabla de purificación de FN3KRP humana

Etapas de purificación	Concentración de proteína [$\mu\text{g/ml}$]	Actividad [U/ml]	Volumen [ml]	Cantidad de proteína total [mg]	Actividad total [U]	Actividad específica [U/mg]	Eficiencia de la purificación.	Tasa de recuperación de la actividad [%]	Actividad restantes [%]
Fración soluble	100000	3	50	5200	150	0,029	1,0	100	81
1) Precipitación en sulfato amónico	9100	5,0	50	460	250	0,55	19	170	89
2) Cromatografía de intercambio aniónico	640	5,5	10	6,4	55	8,7	300	36	98
3) Columna de afinidad de unión a pigmento	310	10	1,0	0,31	10	32	1100	6,6	110
4) Cromatografía de intercambio catiónico	5,0	8,5	0,20	0,00010	1,7	1700	58000	1,1	98
5) Cromatografía de filtración en gel	3,0	1,4	0,10	0,00030	0,14	450	16000	0,090	Sin medir
Actividad restante (actividad enzimática en presencia de DMF 1 mM) + (actividad enzimática en ausencia de DMF) x 100 (%)									

(Ejemplo 7) Identificación de la enzima que fosforila el compuesto 1 mediante espectrometría de masas (2)

Las bandas de alrededor de 33 kDa obtenidas sometiendo a la fracción activa purificada a SDS-PAGE se sometieron a espectrometría de masas con el fin de identificar las proteínas de estas bandas. Como resultado se confirmó que todas estas bandas eran idénticas a una secuencia humana hipotética de la proteína de tipo fructosamina quinasa (FN3KRP, que se ha registrado en la base de datos de proteínas de GenBank con el número de acceso Q9HA64).

Se encontró que el peso molecular predicho de la secuencia de la FN3KRP humana era 35 kDa y este peso molecular era casi idéntico al supuesto peso molecular obtenido mediante SDS-PAGE (33 kDa) y el supuesto SDS-PAGE (33 kDa) obtenido mediante filtración en gel (24-38 kDa).

De acuerdo con lo anterior quedó claro que la enzima fosforilante del compuesto 1, que se purificó en el presente ejemplo, era la FN3KRP humana.

(Ejemplo 8) Construcción del vector de expresión de FN3KRP humana

El clon de ADNc (ID del clon: 3351601) de la FN3KRP humana adquirida en Invitrogen se trató con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI, con el fin de extraer el ADNc. Después se dejó que este ADNc se uniera a un vector plasmídico tratado con XhoI y EcoRI, es decir pcDNA3.1 (+)neo (Invitrogen). Después, se transformó *Escherichia coli* DH5 α con el plásmido como producto de reacción de unión. El transformante obtenido se cultivó en una gran cantidad para obtener un vector plasmídico de expresión que contiene el ADNc de la FN3KRP humana, hFN3KRP/pcDNA3.1 (+)neo.

(Ejemplo 9) Construcción del vector de expresión de FN3K humana

Usando Gateway Technology (Invitrogen), el ADNc se transfirió del clon de ADNc (n° de catálogo GC-W 1392) de la FN3K adquirida en GeneCopoeia a un vector plasmídico de expresión usado para las células de mamífero, pcDNA3.2DEST. Una vez finalizada la reacción, *Escherichia coli* DH5 α se transformó con la solución de ADN obtenida. El transformante obtenido se cultivó en una gran cantidad para obtener un vector plasmídico de expresión que contiene el ADNc de la FN3K humana, hFN3K/pcDNA3.2-DEST.

(Ejemplo 10) Introducción de genes usando el vector de expresión FN3KRP/FN3K humano y preparación de la fracción citoplásmica a partir de células de expresión transitoria

Con el fin de confirmar que la FN3KRP humana y la FN3K humana tienen en realidad actividad fosforilante del compuesto 1, un vector de expresión de cada gen se introdujo en las células cultivadas de modo que se dejó que expresaran de forma transitoria en su interior, preparando de este modo la fracción citoplásmica del mismo.

Células HEK293 se inocularon a tres matraces de cultivo de 75 cm² y después se cultivaron hasta una confluencia del 80 %. Usando una lipofectamina más reactivo (Invitrogen), se llevó a cabo la introducción del gen sin ADN plasmídico, con 4 μ g de hFN3KRP/pcDNA3.1(+)-neo y con 4 μ g de hFN3K/pcDNA3.2-DEST, para cada uno de los matraces. Después, las células se cultivaron durante aproximadamente 27 horas. Después se lavaron las células con PBS y a las células se añadieron 2,5 ml de un lisado celular (HEPES 100 mM (pH 7.4), 80 % (v/v) CellLytic-M (Sigma), ditiotreitól 1 mM, un cóctel de un solo inhibidor de la proteasa para 20 ml (Complete EDTA-free, Roche)) A continuación se agitaron intensivamente las células hasta la agitación de todas. Las células agitadas de este modo y el sobrenadante se recuperaron y, después, se sometieron a ultracentrifugación a 20.000 x g a 4 °C durante 15 minutos. Después se recuperó el sobrenadante y alícuotas de cada uno de 200 μ l se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron a -80 °C hasta su uso. Además, una porción del sobrenadante se sometió a medición de la concentración de proteínas.

(Ejemplo 11) Medición de la actividad de la fracción citoplásmica para fosforilar el compuesto 1

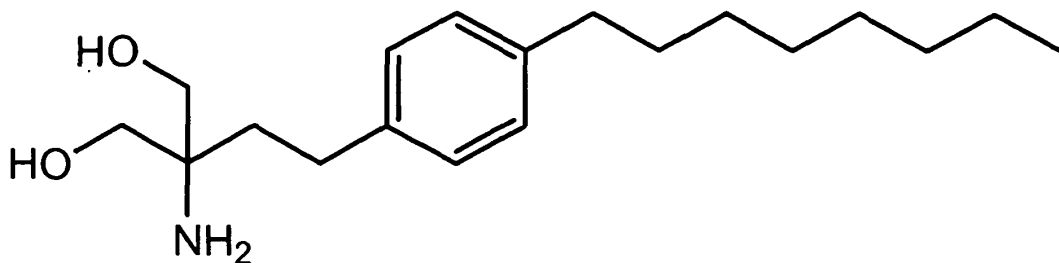
Cada uno de los componentes se añadió a un tubo de 1,5 ml de polipropileno a las concentraciones finales siguientes, con la cantidad total fijada en 250 μ l, seguido de dejar la solución obtenida en reposo en hielo (HEPES 100 mM, (pH 7.4), cloruro de magnesio 5 mM, ATP 1 Mm, ditiotreitól 1 mM, 0,5 % de CHAPS, 100 μ g/ml del compuesto 1, y cada fracción citoplásmica obtenida en el Ejemplo 10 en una cantidad de 18,2, 54,6 y 163,8 μ g o no añadida). La mezcla obtenida se incubó en un baño de agua caliente a 37 °C durante 3 horas y después se transfirió a hielo. A cada tubo se añadió 0,5 ml de metanol y después se mezclaron con el producto de reacción. Después, la mezcla se conservó a -20 °C hasta que se llevó a cabo la medición con HPLC.

La cantidad de éster fosfórico del compuesto 1 generado se midió mediante el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Como resultado, como se muestra en la Figura 3, el éster fosfórico del compuesto 1 se generó únicamente cuando se usó la fracción citoplásmica en la que la FN3KRP humana o FN3K humana se había expresado. A partir de los resultados mencionados anteriormente quedó claro que la FN3KRP humana y la FN3K humana de hecho tienen actividad para fosforilar el compuesto 1.

(Ejemplo 12) Confirmación de la capacidad para fosforilar FTY720 y esfingosina

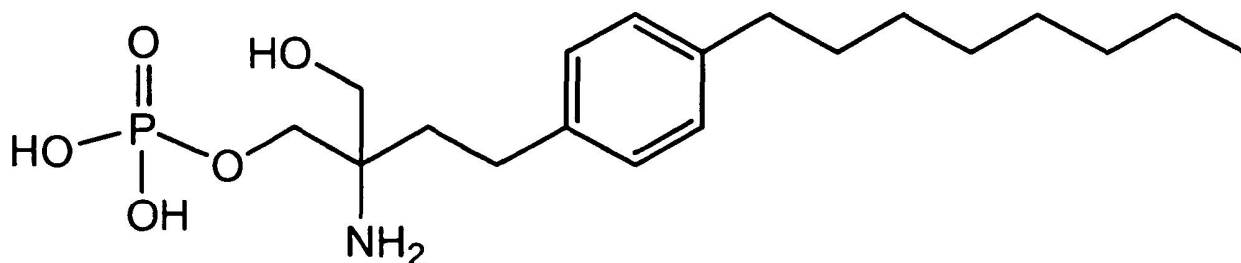
La esfingosina quinasa 1 y 2 son enzimas que convierten la esfingosina en esfingosina-1-fosfato (S1P) *in vivo*.

Se ha conocido que estas enzimas fosforilan FTY720 para generar un éster fosfórico de FTY720.



5

FTY720



Éster fosfórico FTY720

(J Biol Chem. (2003) Vol. 278, pág. 47408-47415) (FEBS Lett. (2003) Vol. 554, pág. 189-193)

10 Por tanto, se analizó si o no por el contrario, la FN3KRP humana y FN3K humana actúan fosforilando FTY720 o la esfingosina,

15 Se prepararon dieciocho tubos de 1,5 ml de polipropileno. Los componentes se añadieron a cada tubo a las concentraciones finales siguientes, con la cantidad total fijada en 250 μ l, seguido de dejar la solución obtenida en reposo en hielo (HEPES 100 mM, (pH 7,4), cloruro de magnesio 5 mM, ATP 1 mM, ditioneitol 1 mM, 0,5 % de CHAPS, FTY720 10 μ M o esfingosina; cada fracción citoplásmica obtenida en el Ejemplo 10 en una cantidad de 91 μ g). La mezcla obtenida se incubó en un baño de agua caliente a 37 °C durante 3 horas y después se transfirió a hielo. A cada tubo se añadió 0,5 ml de metanol y después se mezclaron con el producto de reacción. Después, la mezcla se conservó a -20 °C hasta que se llevó a cabo la medición con CL/EM/EM.

La cantidad del éster fosfórico de FTY720 o de S1P generada se analizó usando el siguiente sistema de CL/EM/EM.

Sistema CL:

20 Nombre del aparato de HPLC: Agilent 1100 series (Agilent Technologies)

Nombre del automuestreador: HTC PAL (CTC Analytics)

Sistema de EM/EM:

Nombre del aparato: API4000 (Applied Biosystems/MDS Sciex)

25 Como resultado se descubrió que tanto la FN3KRP humana como la FN3K humana fosforilan ligeramente FTY720, pero que no tienen la capacidad para fosforilar la esfingosina (Figura 4). De acuerdo con lo anterior quedó claro que la FN3KRP humana y la FN3K humana son enzimas que fosforilan el compuesto 1 y FTY720.

(Ejemplo 13) Reacción de fosforilación del compuesto 1 y sus análogos usando la fracción citoplásmica de expresión de FN3KRP

Los compuestos siguientes se fosforilaron usando la fracción citoplásmica de expresión de FN3KRP preparada en el Ejemplo 10:

- 5 (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol (compuesto 1);
 2-amino-2-[4-(3-benciloxifeniltio)-2-clorofenil]propil-1,3-propanodiol (ROX-2127);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-[1-metil-5-(5-fenilpentanoil)pirrol-2-il]butan-1-ol (compuesto 2);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol (compuesto 3);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{3-metil-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol (compuesto 4);
 10 (2R)-2-amino-2-metil-4-{3-metil-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol (compuesto 5);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-5-[4-(3,4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol (compuesto 6);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{3-cloro-5-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-il}butan-1-ol (compuesto 7);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1,3-dimetil-5-[4-(3,4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol (compuesto 8);
 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1-metil-3-cloro-5-[4-(3,4-dimetoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol (compuesto 9);
 15 (2R)-2-amino-2-metil-4-{1,3-dimetil-5-[4-(3,4-metoxifenil)butanoil]pirrol-2-il}butan-1-ol (compuesto 10);
 2-amino-2-metil-3-(4-heptanoilfenoxi)propan-1-ol (compuesto 11);
 (2R)-2-amino-2-metil-5-{1-metil-5-[4-(4-metilfenil)butanoil]pirrol-2-il}pentan-1-ol (compuesto 12);
 (2R)-2-amino-2-metil-5-{5-[4-(4-metilfenil)butanoil]tiofen-2-il}pentan-1-ol (compuesto 13);
 2-amino-2-metil-3-[4-[4-(4-metilfenil)butanoil]fenilmetoxi]propan-1-ol (compuesto 14);
 20 2-amino-2-metil-3-[2-cloro-4-[4-(4-metilfenil)butanoil]fenilmetoxi]propan-1-ol (compuesto 15);
 2-amino-2-metil-3-{S-[4-(3,4-dimetilfenil)butanoil]tiofen-2-ilmetoxi}propan-1-ol (compuesto 16).

Reacción de solución: HEPES 100 mM (pH 7.4), cloruro de magnesio 5 mM, ATP 5 mM, ditiotreitól 1 mM, CHAPS 0,5 % y 0,328 mg/ml de la fracción citoplásmica de expresión de FN3KRP.

25 Volumen de reacción: 100 µl

Sustrato de reacción: 100 µM

Condiciones de la reacción: 37° C, 3 horas

30 Tras la finalización de la reacción, se añadieron a la solución de reacción 200 µl de metanol y la mezcla se agitó. La solución mezclada se centrifugó (16.000 x g, 10 minutos, 4° C) y después 20 µl del sobrenadante se sometieron a HPLC de modo que el análisis se llevó a cabo en las condiciones siguientes.

Aparato de HPLC: HP1100 (Agilent Technologies)

Columna: YMC-pack ODS A-312

Temperatura de la columna: 40° C

Caudal: 1 ml/min

35 Fase móvil: 30% de acetonitrilo (0,1 % de ácido trifluoroacético) →

90 % de acetonitrilo (0,1% de ácido trifluoroacético)

Procedimiento de elución: Se llevó a cabo elución por gradiente. La concentración inicial de acetonitrilo y la inclinación del gradiente se cambiaron en función del tipo de compuesto. Un procedimiento de elución típico comprende las condiciones siguientes:

40 30 % de acetonitrilo (0,1 % de ácido trifluoroacético) →

90 % de acetonitrilo (0,1 % de ácido trifluoroacético)

Inclinación del gradiente: 2 % de acetonitrilo/min

Longitud de onda de detección: 295 nm, 254 nm, o 230 nm

5 La eficiencia de la fosforilación de cada compuesto se calculó usando las áreas pico del éster fosfórico y el sustrato sin reaccionar, como se muestra en la fórmula siguiente.

$$\text{Eficiencia de la fosforilación (\%)} = \frac{\text{área pico del éster fosfórico}}{\text{área pico del éster fosfórico} + \text{área pico del sustrato sin reaccionar}} \times 100$$

10 Como resultado de la medición mencionada anteriormente, se confirmó que la FN3KRP humana es una enzima que fosforila varios tipos de compuestos (Tabla 3).

Tabla 3. Eficiencia de la fosforilación de FN3KRP humana

Compuesto	Eficiencia de la fosforilación (%)
Compuesto 1	97,6
ROX-2127	37,5
Compuesto 2	95,6
Compuesto 3	91,5
Compuesto 4	32,6
Compuesto 5	38,3
Compuesto 6	95,2
Compuesto 7	44,7
Compuesto 8	3,3
Compuesto 9	10,6
Compuesto 10	4,8
Compuesto 11	14,9
Compuesto 12	97,5
Compuesto 13	98,6
Compuesto 14	34,0
Compuesto 15	18,1
Compuesto 16	29,1

(Ejemplo 14) Reacción de fosforilación del compuesto 1 y sus análogos usando la fracción citoplásmica de expresión de FN3K

15 Se llevó a cabo una reacción de fosforilación del mismo compuesto 1 y los mismos análogos del mismo como se usa en el Ejemplo 13 en las condiciones siguientes, usando la fracción citoplásmica de expresión de FN3K humana preparada en el Ejemplo 10.

Reacción de solución: HEPES 100 mM (pH 7.4), cloruro de magnesio 5 mM, ATP 5 mM, ditiotreitol 1 mM, CHAPS 0,5% y 0,3 mg/ml de la fracción citoplásmica de expresión de FN3K.

20 Volumen de reacción: 100 µl

Sustrato de reacción: 100 µM

Condiciones de la reacción: 37° C, 3 horas

25 Tras la finalización de la reacción, se añadieron a la solución de reacción 200 µl de metanol y la mezcla se agitó. La solución mezclada se centrifugó (16.000 x g, 10 minutos, 4° C) y después 20 µl del sobrenadante se sometieron a HPLC de modo que el análisis se llevó a cabo en las condiciones descritas en el Ejemplo 13.

La eficiencia de la fosforilación de cada análogo se calculó usando la fórmula que se muestra en el Ejemplo 13.

Como resultado se confirmó que la FN3K humana es una enzima que fosforila el compuesto 1 y análogos (Tabla 4).

Tabla 4. Eficiencia de la fosforilación de FN3K humana

Compuesto	Eficiencia de la fosforilación (%)
Compuesto 1	28,1
ROX-2127	0,0
Compuesto 2	17,9
Compuesto 3	16,4
Compuesto 4	4,7
Compuesto 5	4,9
Compuesto 6	19,3
Compuesto 7	5,4
Compuesto 8	0,0
Compuesto 9	2,2
Compuesto 10	0,0
Compuesto 11	0,0
Compuesto 12	24,8
Compuesto 13	23,3
Compuesto 14	0,0
Compuesto 15	0,0
Compuesto 16	3,4

5

(Ejemplo 15) Reacción de fosforilación del compuesto 1 y sus análogos usando eritrocitos de rata

Los eritrocitos se prepararon a partir de ratas Wistar-Imamichi (adquiridas del Institute for Animal Reproduction) del mismo modo que en el Ejemplo 1. Una reacción de fosforilación del mismo compuesto 1 y los mismos análogos del mismo que en el Ejemplo 13 se llevó a cabo en las condiciones siguientes usando estos eritrocitos de rata.

10

Reacción de solución: Eritrocitos de rata

Volumen de reacción: 500 µl

Sustrato de reacción: 100 µg

Condiciones de la reacción: 37° C, 3 horas

15

Tras la finalización de la reacción, se añadieron a la solución de reacción 1 ml de metanol y, después, se agitó la mezcla. La solución mezclada se centrifugó (16.000 x g, 5 minutos, 4° C). El sobrenadante se centrifugó de nuevo (16.000 x g, 10 minutos, 4° C) y después 20 µl del sobrenadante recién obtenido se sometieron a HPLC de modo que el análisis se llevó a cabo en las condiciones descritas en el Ejemplo 13. La eficiencia de la fosforilación de cada análogo se calculó usando la fórmula que se muestra en el Ejemplo 13.

Como resultado se confirmó que los eritrocitos de rata fosforilan el compuesto 1 y análogos del mismo (Tabla 5).

20

Tabla 5. Eficiencia de la fosforilación en eritrocitos de rata

Compuesto	Eficiencia de la fosforilación (%)
Compuesto 1	96,5
ROX-2127	31,7
Compuesto 2	72,0

Compuesto	Eficiencia de la fosforilación (%)
Compuesto 3	61,4
Compuesto 4	17,5
Compuesto 5	45,9
Compuesto 6	66,2
Compuesto 7	25,9
Compuesto 8	3,6
Compuesto 9	13,3
Compuesto 10	7,7
Compuesto 11	44,6
Compuesto 12	73,4
Compuesto 13	82,2
Compuesto 14	45,4
Compuesto 15	31,6
Compuesto 16	39,0

La serie de experimentos realizados en los Ejemplos 1 a 15 demostraron que la FN3KRP humana y la FN3K humana están presentes en eritrocitos humanos y que éstas son enzimas que fosforilan el compuesto 1, análogos del mismo y FTY720.

5 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención puede aclarar una enzima que fosforila *in vivo* un compuesto tal como (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiofen-2-il]butan-1-ol y proporcionar un procedimiento de fosforilación del compuesto mencionado anteriormente usando la enzima mencionada anteriormente. Además, la presente invención también puede proporcionar un procedimiento de detección selectiva de una sustancia fosforilada mediante la enzima mencionada anteriormente. Adicionalmente, la invención también puede proporcionar un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para fosforilar un compuesto de ensayo. Adicionalmente, la invención también puede proporcionar un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto de metabolizar un fármaco usando la capacidad de fosforilación de la presente enzima como indicador.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra fosforilación del compuesto 1 por cada componente constituyente existente en la sangre humana;

La Figura 2 muestra la concentración del producto de reacción en cada fracción;

La Figura 3 muestra la actividad para fosforilar el compuesto 1; y

La Figura 4(A) muestra la fosforilación de FTY720, y la Figura 4(B) muestra la fosforilación de esfingosina.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED	
	<120> Enzima de fosforilación de fármacos	
5	<130> EPP101497	
	<140> EP07791906.6 (PCT/JP2007/065232)	
	<141> 2007-08-03	
10	<150> JP2006-213734	
	<151> 2006-08-04	
	<160> 8	
15	<170> PatentIn versión 3,4	
	<210> 1	
	<211> 1466	
20	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (6)..(935)	
	<400> 1	
	actcc atg gag cag ctg ctg cgc gcc gag ctg cgc acc gcg acc ctg cgg	50
	Met Glu Gln Leu Leu Arg Ala Glu Leu Arg Thr Ala Thr Leu Arg	
	1 5 10 15	
	gcc ttc ggc ggc ccc gcc gcc gcc tgc atc agc gag ggc cga gcc tac	98
	Ala Phe Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys Ile Ser Glu Gly Arg Ala Tyr	
	20 25 30	
	gac acg gac gca gcc cca gtg ttc gtc aaa gtc aac cgc agg acg cag	146
	Asp Thr Asp Ala Gly Pro Val Phe Val Lys Val Asn Arg Arg Thr Gln	
	35 40 45	
	gcc cgg cag atg ttt gag ggg gag gtg gcc agc ctg gag gcc ctc cgg	194
	Ala Arg Gln Met Phe Glu Gly Glu Val Ala Ser Leu Glu Ala Leu Arg	
	50 55 60	
	agc acg ggc ctg gtg cgg gtg ccg agg ccc atg aag gtc atc gac ctg	242
	Ser Thr Gly Leu Val Arg Val Pro Arg Pro Met Lys Val Ile Asp Leu	
	65 70 75	
	ccg gga ggt ggg gcc gcc ttt gtg atg gag cat ttg aag atg aag agc	290
	Pro Gly Gly Gly Ala Ala Phe Val Met Glu His Leu Lys Met Lys Ser	
	80 85 90 95	
	ttg agc agt caa gca tca aaa ctt gga gag cag atg gca gat ttg cat	338
	Leu Ser Ser Gln Ala Ser Lys Leu Gly Glu Gln Met Ala Asp Leu His	
	100 105 110	
	ctt tac aac cag aag ctc agg gag aag ttg aag gag gag gag aac aca	386
	Leu Tyr Asn Gln Lys Leu Arg Glu Lys Leu Lys Glu Glu Glu Asn Thr	
	115 120 125	
	gtg ggc cga aga ggt gag ggt gct gag cct cag tat gtg gac aag ttc	434
	Val Gly Arg Arg Gly Glu Gly Ala Glu Pro Gln Tyr Val Asp Lys Phe	
	130 135 140	
	ggc ttc cac acg gtg acg tgc tgc gcc ttc atc ccg cag gtg aat gag	482
	Gly Phe His Thr Val Thr Cys Cys Gly Phe Ile Pro Gln Val Asn Glu	
	145 150 155	

ES 2 396 713 T3

tgg cag gat gac tgg ccg acc ttt ttc gcc cgg cac cgg ctc cag gcg	530
Trp Gln Asp Asp Trp Pro Thr Phe Phe Ala Arg His Arg Leu Gln Ala	
160 165 170 175	
cag ctg gac ctc att gag aag gac tat gct gac cga gag gca cga gaa	578
Gln Leu Asp Leu Ile Glu Lys Asp Tyr Ala Asp Arg Glu Ala Arg Glu	
180 185 190	
ctc tgg tcc cgg cta cag gtg aag atc ccg gat ctg ttt tgt ggc cta	626
Leu Trp Ser Arg Leu Gln Val Lys Ile Pro Asp Leu Phe Cys Gly Leu	
195 200 205	
gag att gtc ccc gcg ttg ctc cac ggg gat ctc tgg tcg gga aac gtg	674
Glu Ile Val Pro Ala Leu Leu His Gly Asp Leu Trp Ser Gly Asn Val	
210 215 220	
gct gag gac gac gtg ggg ccc att att tac gac ccg gct tcc ttc tat	722
Ala Glu Asp Asp Val Gly Pro Ile Ile Tyr Asp Pro Ala Ser Phe Tyr	
225 230 235	
ggc cat tcc gag ttt gaa ctg gca atc gcc ttg atg ttt ggg ggg ttc	770
Gly His Ser Glu Phe Glu Leu Ala Ile Ala Leu Met Phe Gly Gly Phe	
240 245 250 255	
ccc aga tcc ttc ttc acc gcc tac cac cgg aag atc ccc aag gct ccg	818
Pro Arg Ser Phe Phe Thr Ala Tyr His Arg Lys Ile Pro Lys Ala Pro	
260 265 270	
ggc ttc gac cag cgg ctg ctg ctc tac cag ctg ttt aac tac ctg aac	866
Gly Phe Asp Gln Arg Leu Leu Leu Tyr Gln Leu Phe Asn Tyr Leu Asn	
275 280 285	
cac tgg aac cac ttc ggg cgg gag tac agg agc cct tcg ttg ggc acc	914
His Trp Asn His Phe Gly Arg Glu Tyr Arg Ser Pro Ser Leu Gly Thr	
290 295 300	
atg cga agg ctg ctc aag tag cggcccctgc cctcccctcc cctgtccccg	965
Met Arg Arg Leu Leu Lys	
305	
tccccgtctc cgtctccccg tcctgtccc cccgtcccc gtcctgtgc ccccgtccct	1025
gtccccctgt tcccgtctcc ccgtcccctcc gtctccatcc ccccgtcccc ccctcctctc	1085
gtccccgtcc ccccgtcccc gtcccctcat cctgtcccc cgtccccctg tcctgtcccc	1145
cctgtccaca taccaatccc cctgtccccg acccccatcc ccgtccccca tctccgtccc	1205
cgccccccct gccccgtccc cgtctccggt cccccgtccc catcctccat ccccgtctcc	1265
catcgccgtc cccccgtccc cgtccccctg cccccgtgc ccccgtcccc gtccccctg	1325
tcctgtccc cttcccccg acccctccca gatcctgggg accaataaag cccgcagcgg	1385
gcctcggctg gcgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1445
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	1466

<210> 2
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Gln Leu Leu Arg Ala Glu Leu Arg Thr Ala Thr Leu Arg Ala
1 5 10 15

ES 2 396 713 T3

Phe Gly Gly Pro Gly Ala Gly Cys Ile Ser Glu Gly Arg Ala Tyr Asp
 20 25 30
 Thr Asp Ala Gly Pro Val Phe Val Lys Val Asn Arg Arg Thr Gln Ala
 35 40 45
 Arg Gln Met Phe Glu Gly Glu Val Ala Ser Leu Glu Ala Leu Arg Ser
 50 55 60
 Thr Gly Leu Val Arg Val Pro Arg Pro Met Lys Val Ile Asp Leu Pro
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Ala Ala Phe Val Met Glu His Leu Lys Met Lys Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ser Gln Ala Ser Lys Leu Gly Glu Gln Met Ala Asp Leu His Leu
 100 105 110
 Tyr Asn Gln Lys Leu Arg Glu Lys Leu Lys Glu Glu Glu Asn Thr Val
 115 120 125
 Gly Arg Arg Gly Glu Gly Ala Glu Pro Gln Tyr Val Asp Lys Phe Gly
 130 135 140
 Phe His Thr Val Thr Cys Cys Gly Phe Ile Pro Gln Val Asn Glu Trp
 145 150 155 160
 Gln Asp Asp Trp Pro Thr Phe Phe Ala Arg His Arg Leu Gln Ala Gln
 165 170 175
 Leu Asp Leu Ile Glu Lys Asp Tyr Ala Asp Arg Glu Ala Arg Glu Leu
 180 185 190
 Trp Ser Arg Leu Gln Val Lys Ile Pro Asp Leu Phe Cys Gly Leu Glu
 195 200 205
 Ile Val Pro Ala Leu Leu His Gly Asp Leu Trp Ser Gly Asn Val Ala
 210 215 220
 Glu Asp Asp Val Gly Pro Ile Ile Tyr Asp Pro Ala Ser Phe Tyr Gly
 225 230 235 240
 His Ser Glu Phe Glu Leu Ala Ile Ala Leu Met Phe Gly Gly Phe Pro
 245 250 255
 Arg Ser Phe Phe Thr Ala Tyr His Arg Lys Ile Pro Lys Ala Pro Gly
 260 265 270
 Phe Asp Gln Arg Leu Leu Leu Tyr Gln Leu Phe Asn Tyr Leu Asn His
 275 280 285

ES 2 396 713 T3

Trp Asn His Phe Gly Arg Glu Tyr Arg Ser Pro Ser Leu Gly Thr Met
 290 295 300

Arg Arg Leu Leu Lys
 305

<210> 3
 <211> 1781
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (27)..(956)

<400> 3

```

ggcgggtccg cggccgcggc gggaac atg gag gag ctg ctg agg cgc gag ctg      53
                        Met Glu Glu Leu Leu Arg Arg Glu Leu
                        1                               5

ggc tgc agc tct gtc agg gcc acg ggc cac tcg ggg ggc ggg tgc atc      101
Gly Cys Ser Ser Val Arg Ala Thr Gly His Ser Gly Gly Gly Cys Ile
10                               15                               20                               25

agc cag ggc cgg agc tac gac acg gat caa gga cga gtg ttc gtg aaa      149
Ser Gln Gly Arg Ser Tyr Asp Thr Asp Gln Gly Arg Val Phe Val Lys
                               30                               35                               40

gtg aac ccc aag gcg gag gcc aga aga atg ttt gaa ggt gag atg gca      197
Val Asn Pro Lys Ala Glu Ala Arg Arg Met Phe Glu Gly Glu Met Ala
                               45                               50                               55

agt tta act gcc atc ctg aaa aca aac acg gtg aaa gtg ccc aag ccc      245
Ser Leu Thr Ala Ile Leu Lys Thr Asn Thr Val Lys Val Pro Lys Pro
                               60                               65                               70

atc aag gtt ctg gat gcc cca ggc ggc ggg agc gtg ctg gtg atg gag      293
Ile Lys Val Leu Asp Ala Pro Gly Gly Gly Ser Val Leu Val Met Glu
75                               80                               85

cac atg gac atg agg cat ctg agc agt cat gct gca aag ctt gga gcc      341
His Met Asp Met Arg His Leu Ser Ser His Ala Ala Lys Leu Gly Ala
90                               95                               100                               105

cag ctg gcc gat tta cac ctt gat aac aag aag ctt gga gag atg cgc      389
Gln Leu Ala Asp Leu His Leu Asp Asn Lys Lys Leu Gly Glu Met Arg
                               110                               115                               120

ctg aag gag gcg ggc aca gtg ggg aga gga ggt ggg cag gag gaa cgg      437
Leu Lys Glu Ala Gly Thr Val Gly Arg Gly Gly Gly Gln Glu Glu Arg
                               125                               130                               135

ccc ttt gtg gcc cgg ttt gga ttt gac gtg gtg acg tgc tgt gga tac      485
Pro Phe Val Ala Arg Phe Gly Phe Asp Val Val Thr Cys Cys Gly Tyr
                               140                               145                               150

ctc ccc cag gtg aat gac tgg cag gag gac tgg gtc gtg ttc tat gcc      533
Leu Pro Gln Val Asn Asp Trp Gln Glu Asp Trp Val Val Phe Tyr Ala
155                               160                               165

cgg cag cgc att cag ccc cag atg gac atg gtg gag aag gag tct ggg      581
Arg Gln Arg Ile Gln Pro Gln Met Asp Met Val Glu Lys Glu Ser Gly
170                               175                               180                               185

gac agg gag gcc ctc cag ctt tgg tct gct ctg cag tta aag atc cct      629
Asp Arg Glu Ala Leu Gln Leu Trp Ser Ala Leu Gln Leu Lys Ile Pro
    
```

15

ES 2 396 713 T3

	190		195		200		
	gac ctg ttc cgt	gac ctg gag atc atc	cca gcc tta ctc cac	ggg gac	677		
	Asp Leu Phe Arg	Asp Leu Glu Ile Ile	Pro Ala Leu Leu His	Gly Asp			
		205	210	215			
	ctc tgg ggt gga	aac gta gca gag gat	tcc tct ggg ccg	gtg att ttt	725		
	Leu Trp Gly	Asn Val Ala Glu Asp	Ser Ser Gly Pro	Val Ile Phe			
		220	225	230			
	gac cca gct tct	ttc tac ggc cac	tcg gaa tat gag	ctg gca ata gct	773		
	Asp Pro Ala Ser	Phe Tyr Gly His	Ser Glu Tyr Glu	Leu Ala Ile Ala			
		235	240	245			
	ggc atg ttt ggg	ggc ttt agc agc	tcc ttt tac tcc	gcc tac cac ggc	821		
	Gly Met Phe Gly	Gly Phe Ser Ser	Ser Phe Tyr Ser	Ala Tyr His Gly			
		255	260	265			
	aaa atc ccc aag	gcc cca gga ttc	gag aag cgc ctt	cag ttg tat cag	869		
	Lys Ile Pro Lys	Ala Pro Gly Phe	Glu Lys Arg Leu	Gln Leu Tyr Gln			
		270	275	280			
	ctc ttt cac tac	ttg aac cac tgg	aat cat ttt gga	tcg ggg tac aga	917		
	Leu Phe His Tyr	Leu Asn His Trp	Asn His Phe Gly	Ser Gly Tyr Arg			
		285	290	295			
	gga tcc tcc ctg	aac atc atg agg	aat ctg gtc aag	tga gcgggcctta	966		
	Gly Ser Ser Leu	Asn Ile Met Arg	Asn Leu Val Lys				
		300	305				
	ctctggaagg	aggcctcaga	ggtttctcca	cagtcctctt	ctgggcaaat	tcttgtttct	1026
	tcacatgccg	gactagctta	agaccaatgc	agtagcttat	ttccaagcct	tgcaaagtat	1086
	ataatatcta	agaggaaagg	ttttgtcatc	ccagcgttgt	ccactttgtg	gggctttgta	1146
	ggtagacgga	gccacactac	aggcagggta	tgagcagagg	gatgtatgga	gtgtgggtga	1206
	ctctgagcct	cactgctgct	gcaagggtggg	gaaactgtaa	gtgaaccct	gtgggtgctg	1266
	gggagggtat	ccggtgcaca	gggagggtggc	cagcgcctcc	gggactgct	gctcataggt	1326
	acctttccgc	tgctctctcc	ctgctctctt	gtgcaggaat	gtctctgagc	tgttcacggt	1386
	gatgcttctt	ggttggcaag	acttgggtgt	agatatgaaa	ccatcttact	aaaagcgtct	1446
	taaaatgacc	aattccagaa	tcaagcgtat	tccgttttct	tcttgcata	tcttgggccc	1506
	tcccgcaggc	tgagcaagtc	tgtaaactga	ttctgggaga	aaccaagctg	ctggccgtag	1566
	gggtgccttg	ggtacatcca	ggagtcttca	ttgcttctgt	tattaccccg	tctcctctgc	1626
	cattttctac	agcttgctga	gttgtcattc	ctttgcaaca	ttaaaataca	tgctgaactc	1686
	atatttttcc	ttccttcaact	gttgtagtaa	agagacatat	ttcatgaatg	gcattgatgc	1746
	taataaatcc	tttgcaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaa			1781

<210> 4
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

10 Met Glu Glu Leu Leu Arg Arg Glu Leu Gly Cys ser ser Val Arg Ala
 1 5 10 15

ES 2 396 713 T3

Thr Gly His Ser Gly Gly Gly Cys Ile Ser Gln Gly Arg Ser Tyr Asp
 20 25 30
 Thr Asp Gln Gly Arg Val Phe Val Lys Val Asn Pro Lys Ala Glu Ala
 35 40 45
 Arg Arg Met Phe Glu Gly Glu Met Ala Ser Leu Thr Ala Ile Leu Lys
 50 55 60
 Thr Asn Thr Val Lys Val Pro Lys Pro Ile Lys Val Leu Asp Ala Pro
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Ser Val Leu Val Met Glu His Met Asp Met Arg His Leu
 85 90 95
 Ser Ser His Ala Ala Lys Leu Gly Ala Gln Leu Ala Asp Leu His Leu
 100 105 110
 Asp Asn Lys Lys Leu Gly Glu Met Arg Leu Lys Glu Ala Gly Thr Val
 115 120 125
 Gly Arg Gly Gly Gly Gln Glu Glu Arg Pro Phe Val Ala Arg Phe Gly
 130 135 140
 Phe Asp Val Val Thr Cys Cys Gly Tyr Leu Pro Gln Val Asn Asp Trp
 145 150 155 160
 Gln Glu Asp Trp Val Val Phe Tyr Ala Arg Gln Arg Ile Gln Pro Gln
 165 170 175
 Met Asp Met Val Glu Lys Glu Ser Gly Asp Arg Glu Ala Leu Gln Leu
 180 185 190
 Trp Ser Ala Leu Gln Leu Lys Ile Pro Asp Leu Phe Arg Asp Leu Glu
 195 200 205
 Ile Ile Pro Ala Leu Leu His Gly Asp Leu Trp Gly Gly Asn Val Ala
 210 215 220
 Glu Asp Ser Ser Gly Pro Val Ile Phe Asp Pro Ala Ser Phe Tyr Gly
 225 230 235 240
 His Ser Glu Tyr Glu Leu Ala Ile Ala Gly Met Phe Gly Gly Phe Ser
 245 250 255
 Ser Ser Phe Tyr Ser Ala Tyr His Gly Lys Ile Pro Lys Ala Pro Gly
 260 265 270
 Phe Glu Lys Arg Leu Gln Leu Tyr Gln Leu Phe His Tyr Leu Asn His
 275 280 285
 Trp Asn His Phe Gly Ser Gly Tyr Arg Gly Ser Ser Leu Asn Ile Met
 290 295 300
 Arg Asn Leu Val Lys
 305

ES 2 396 713 T3

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<400> 5

atggagcagc tgctgcgcgc cgagctgcgc 30
10

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15

<400> 6

ctacttgagc agccttcgca tgggccc aa 30
20

<210> 7
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25

<220>
<223> Cebador para PCR para amplificación de ADNc de FN3KRP

<400> 7
30

ataagaatgc ggccgccacc atggaggagc tgctgaggcg 40

<210> 8
<211> 37
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para PCR para amplificación de ADNc de FN3KRP
40

<400> 8

atagtttagc ggccgctcac ttgaccagat tcctcat 37
45

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección selectiva de una sustancia fosforilada por la FN3KRP humana y/o la FN3K humana, que comprende las etapas siguientes (1) a (3):

5 (1) poner en contacto una sustancia de ensayo con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c):

(a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos nº 1-309 de la SEC ID Nº 2 en el listado de secuencias;

(b) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos nº 1-309 de la SEC ID Nº 4 en el listado de secuencias; y

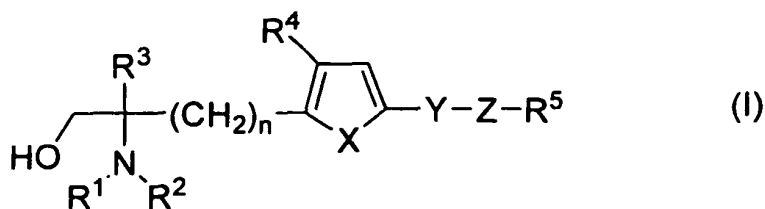
10 (c) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido seleccionado del anterior (a) y (b) y que tiene la capacidad de fosforilar el (2R)-2-amino-2-metil-4-[5-(5-fenilpentanoil)tiófen-2-il]butan-1-ol;

(2) medir la cantidad de éster fosfórico de la sustancia de ensayo generada; y

15 (3) comparar la cantidad del éster fosfórico generado medida en (2) anteriormente con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con el polipéptido seleccionado de los anteriores (a) a (c).

que se caracteriza porque la sustancia de ensayo es un compuesto representado por la fórmula general (I) siguiente:

20



25 en la que cada uno de R¹ y R² representa un átomo de hidrógeno; R³ representa un grupo alquilo C1-C6 o un grupo hidroximetilo; R⁴ representa un átomo de hidrógeno; un átomo de halógeno o un grupo alquilo C1-C6; R⁵ representa un grupo fenilo, un grupo fenilo que está sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo alquilo C1-C6, un grupo alcoxi C1-C6, un grupo cicloalquilo C3-C6, un grupo halógeno alquilo C1-C6, un grupo fenilo y un grupo benciloxi, un átomo de halógeno o un átomo de hidrógeno; X representa un grupo vinileno (grupo CH=CH), un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo metilamino; Y representa un enlace sencillo, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo carbonilo; Z representa un enlace sencillo o un grupo alquileo C1-C8; y n es 2 o 3, con la condición de que Z no puede representar un enlace sencillo cuando Y representa un enlace sencillo.

30

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa:

35 (4) determinar que la sustancia de ensayo ha sido fosforilada, cuando la cantidad del éster fosfórico medida en (2) anteriormente es mayor en comparación con la cantidad del éster fosfórico de la sustancia de ensayo medida cuando la sustancia de ensayo no está en contacto con el polipéptido seleccionado de los anteriores (a) a (c).

3. Un procedimiento de producción de un éster fosfórico, que comprende las etapas siguientes (1) y (2):

40 (1) poner en contacto el compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en la reivindicación 1 con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en de (a) a (c) como se ha definido en la reivindicación 1; y

(2) obtener el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) de la solución de reacción en (1) anterior.

45 4. Un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes (1) a (3):

(1) extraer el ARN total de una muestra obtenida de un sujeto;

(2) medir el nivel de expresión de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) en el ARN total:

5 (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 6-935 de la SEC ID N° 1 en el listado de secuencias:

(b) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 27-956 de la SEC ID N° 3 en el listado de secuencias; y

10 (c) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (a) o (b) anterior, y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I); y

15 (3) comparar el nivel de expresión del polinucleótido medido en (2) anterior con el nivel de expresión del dicho polinucleótido en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

5. Un procedimiento de determinar la capacidad de un paciente para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes (1) y (2):

20 (1) medir el nivel de expresión de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en de (a) a (c) como se ha definido en la reivindicación 1 en una muestra obtenida de un sujeto; y

(2) comparar el nivel de expresión del polipéptido en (1) anterior con el nivel de expresión de dicho polipéptido en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

25 6. Un procedimiento de determinar la capacidad de un paciente para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes (1) y (2):

30 (1) medir la actividad enzimática de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en de (a) a (c) como se ha definido en la reivindicación 1 en una muestra obtenida de un sujeto; y

(2) comparar la actividad enzimática del polipéptido en (1) anterior con la actividad enzimática de dicho polipéptido en una muestra que se ha confirmado que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I), para examinar la capacidad del sujeto para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I).

35 7. Un procedimiento de determinar la capacidad de un sujeto para generar el éster fosfórico del compuesto representado por la fórmula general (I) como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende las etapas siguientes (1) a (3):

(1) examinar la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (a) a (c) en una muestra obtenida de un sujeto:

40 (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 1-1466 de la SEC ID N° 1 en el listado de secuencias:

(b) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos N° 1-1781 de la SEC ID N° 3 en el listado de secuencias; y

45 (c) un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos descrita en (a) o (b) anterior, y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad para fosforilar *in vivo* el compuesto representado por la fórmula general (I);

(2) examinar la presencia o ausencia de una mutación en la secuencia de nucleótidos de dicho polinucleótido que influye sobre la actividad de la enzima; y

50 (3) determinar que el sujeto tiene únicamente una capacidad baja para fosforilar el compuesto representado por la fórmula general (I) cuando el sujeto tiene, en la secuencia de nucleótidos, una mutación que disminuye la actividad de fosforilación del polipéptido codificado por dicho polinucleótido descrito anteriormente, y determinar que el sujeto tiene la capacidad para fosforilar el compuesto representado por la

fórmula general (I) cuando el sujeto no tiene en la secuencia de nucleótidos una mutación que disminuye la actividad de fosforilación dicho polipéptido.

8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizado porque** la muestra es sangre periférica.

5 9. Uso de un kit que comprende al menos uno seleccionado del grupo que consiste en los siguientes (1) a (5):

(1) un cebador oligonucleotídico que comprende de 15 a 30 nucleótidos contiguos que se usa para amplificar específicamente una parte de todo el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o 3 en el listado de secuencias:

10 (2) una sonda polinucleotídica que comprende 15 o más nucleótidos contiguos que hibrida en condiciones rigurosas con el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o 3 en el listado de secuencias, para detectar dicho polinucleótido;

(3) una muestra en fase sólida que tiene un polinucleótido seleccionado de entre el cebador oligonucleotídico descrito en (1) anteriormente o la sonda polinucleotídica descrita en (2) anterior inmovilizada en la misma;

15 (4) un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido seleccionado de (a) a (c) como se define en la reivindicación 1, para detectar la proteína; y

(5) un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo descrito en (4) anterior,

para determinar la capacidad para metabolizar un compuesto farmacológico representado por la fórmula general (I) definida en la reivindicación 1.

Figura 1

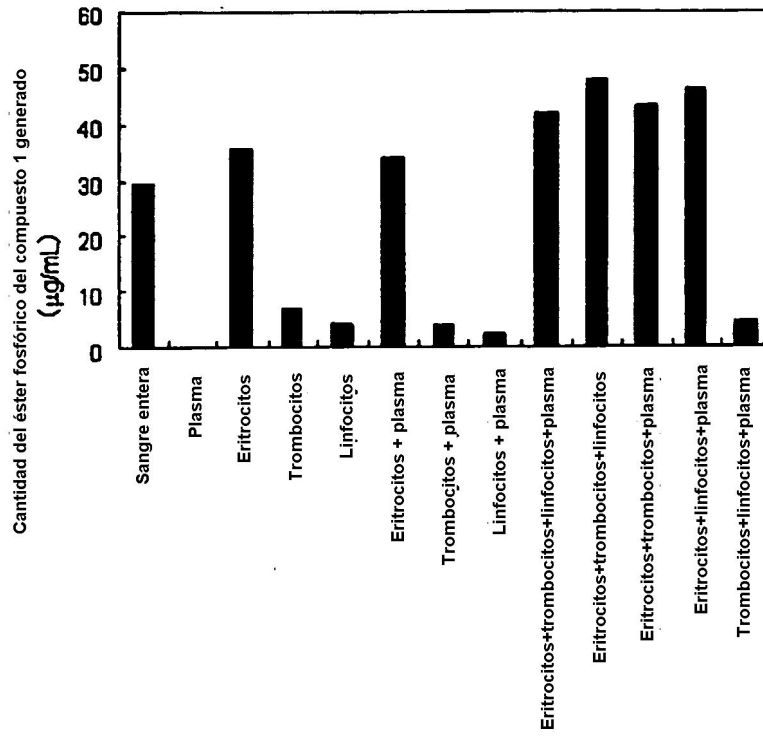


Figura 2

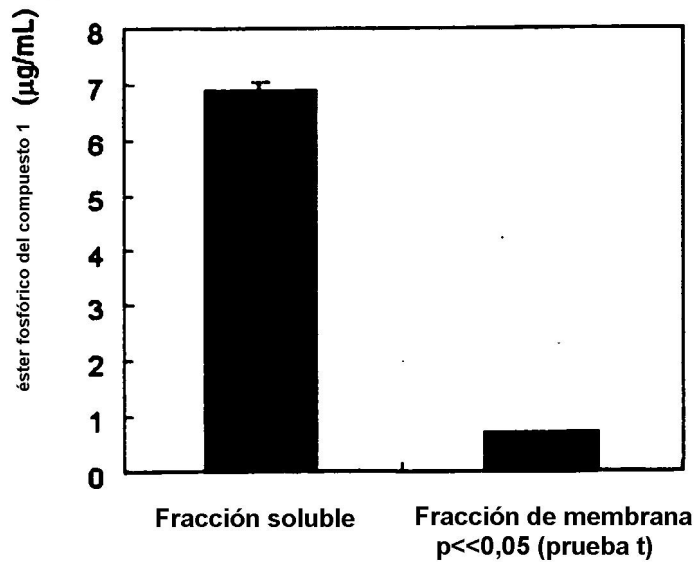


Figura 3

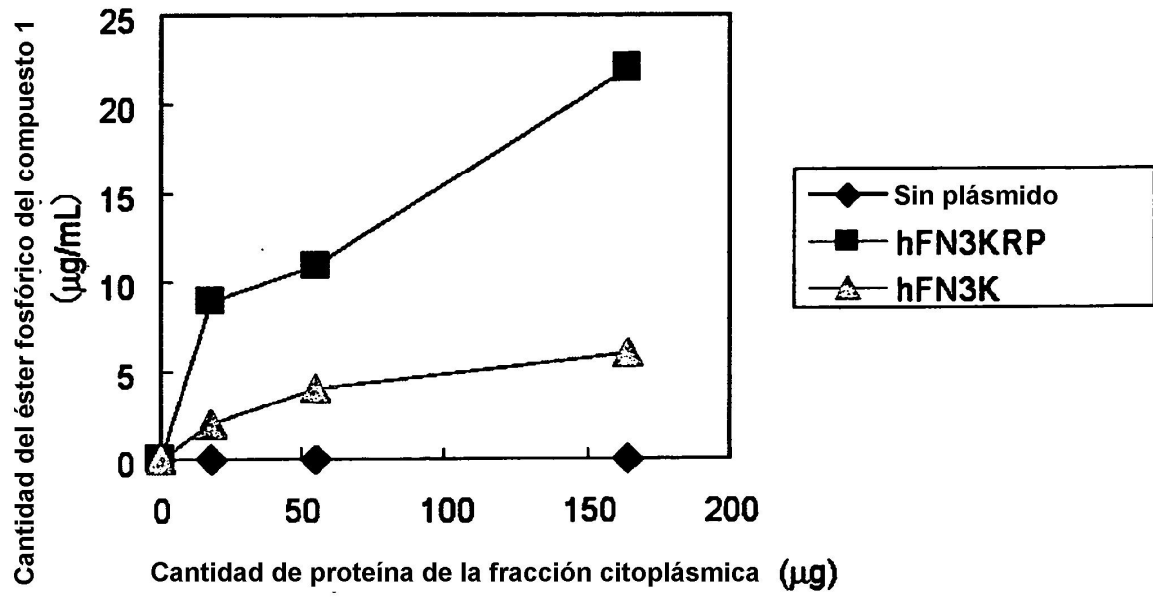


Figura 4

