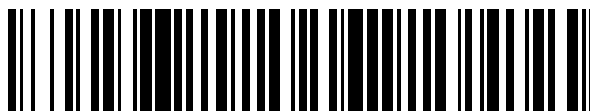


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 318**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007** **E 07122883 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 1936377**

54 Título: **Método para la detección de AMPc y GMPc**

30 Prioridad:

21.12.2006 EP 06126927

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

31.03.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**ENDERLE, THILO;
MATILE, HUGUES y
ROTH, DORIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 452 318 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

Método para la detección de AMPc y GMPc

5 Los nucleótidos desempeñan una función importante en la transducción de señales de una célula. Por ejemplo, el nucleótido AMPc está implicado en la transducción de señales de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

10 Los GPCR forman la clase más abundante de dianas farmacéuticas de fármacos. Para ensayar la actividad de posibles nuevas medicinas sobre los GPCR en el descubrimiento de fármacos, se requieren ensayos que inspeccionen la función de los receptores en su medio celular. Para el cribado de alto rendimiento, una de las primeras etapas del proceso de descubrimiento de fármacos, es necesario que estos ensayos funcionales sean sencillos y tengan pocas etapas, sean sensibles para detectar pequeños efectos de los compuestos en sus primeras fases de desarrollo e incluyan una lectura fiable que pueda aplicarse de manera automatizada.

15 Los ensayos funcionales para los GPCR pueden establecerse mediante la detección de moléculas de segundos mensajeros que reflejen el estado de activación del receptor. Dicha molécula de segundo mensajero es el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) formado tras la modulación de la actividad de la adenilil ciclasa. W. Thomsen et al. (*Current Opinion in Biotechnology* 2005, 16, 655-665) proporcionan una visión general de kits de ensayo funcionales disponibles en el mercado que determinan el nivel de AMPc celular basándose en la lectura de fluorescencia o quimioluminiscencia.

20 Kraemer et al. investigan en *Journal of Molecular Biology* 2001, 306, 1167-1177 el equilibrio y la cinética de la interacción del AMPc y Epac1 utilizando análogos de AMPc fluorescentes y diferentes construcciones de dominios de Epac1.

25 Gabriel et al. desvelan en *Assay and Drug Development Technologies*, 2003, 1, 291-303 bioensayos basados en fluorescencia para la detección de la actividad de receptores y efectos de ligandos en células que expresan los receptores de las rutas de transducción de señales respectivas mediante la determinación del AMPc en células con o sin tratamiento con ligando usando lisis.

30 Williams, C. revisa en *Nature Review, Drug Discovery*, 2004, 3, 125-135 métodos de detección de AMPc.

La presente invención proporciona un ensayo sencillo para detectar AMPc y su uso para detectar indirectamente la actividad de receptores y para seleccionar ligandos.

35 Esta invención se basa en el hecho sorprendente de que ciertos conjugados con derivados de AMPc, diseñados por modificación de la nucleobase, pueden desactivar la emisión de fluorescencia de un fluoróforo mientras que el AMPc no desactiva el fluoróforo.

40 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método in vitro para detectar monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que comprende a) poner en contacto una mezcla que comprende AMPc o GMPc con un complejo de un indicador y un reactivador, donde el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc, y el desactivador de AMPc puede desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador puede unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar, y b) medir el cambio de fluorescencia, donde el cambio de fluorescencia medido se compara con un control.

50 Sorprendentemente, el ensayo también puede usarse para detectar GMPc en una mezcla. A diferencia del AMPc, el GMPc tiene capacidades desactivadoras, pero solo a una concentración de aproximadamente 1 mM y superiores. Sin embargo, las concentraciones celulares de GMPc están normalmente en el intervalo de varios órdenes de magnitud por debajo de 1 mM.

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método in vitro para detectar AMPc o GMPc.

El cambio de la fluorescencia medido se compara con un control. El control puede ser una curva patrón con una cantidad de nucleótido predeterminada.

60 El término "mezcla" se refiere a dos o más sustancias mezcladas entre sí de tal manera que cada una de ellas permanece inalterada. La mezcla incluye, pero no se limita a, lisados celulares, sobrenadantes de cultivo celular, líquidos biológicos, tales como, suero, plasma, orina, líquido de lavado bronquial, esputo, o biopsias tales como líquido cefalorraquídeo.

65 El término "nucleótido" se refiere a una molécula que comprende una nucleobase, un azúcar y uno (MP), dos (DP) o tres (TP) grupos fosfato. Existen cinco nucleobases: Adenina (A), Uracilo (U), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). El azúcar es una ribosa o una desoxirribosa (d).

La expresión "nucleótido cíclico" se refiere a un nucleótido en el que el grupo fosfato está unido a dos de los grupos hidroxilo del azúcar, formando una estructura cíclica o de anillo. Estos incluyen AMP cíclico (AMPc), CMP cíclico (CMPc), TMP cíclico (TMPc), UMP cíclico (UMPc) y GMP cíclico (GMPc).

5 La expresión "desactivador de AMPc", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado de AMPc que puede desactivar el fluoróforo usado en el ensayo. El desactivador se une covalentemente a dicho fluoróforo. El desactivador de AMPc es un derivado de AMPc en el que la nucleobase se ha sustituido por un donador de electrones. Como se muestra en la Figura 11B, la posición de la nucleobase para la sustitución es la posición 2 u 8. Son derivados de AMPc 2-(6-aminohexil)amino-AMPc (2-AHA-AMPc), 8-(6-aminohexil)amino-AMPc (8-AHA-AMPc),
10 8-(8-amino-3, 6-dioxaoctilamino)-AMPc (8-ADOA-AMPc), 8-hidroxi-AMPc (8-OH-AMPc) y 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc (8-MBT-AMPc). El derivado más preferido es 2-AHA-AMPc.

El término "fluoróforo" se refiere a una molécula que emite fluorescencia cuando se excita con una longitud de onda específica y que puede desactivarse de forma estática. Un fluoróforo preferido es un derivado de oxazina como se describe en el documento EP 747 447 tal como, por ejemplo, MR121, Evoblue30 o JA314. Otros fluoróforos preferidos que pueden usarse son ATTO™ 590, ATTO™ 655, ATTO™ 680, Atto™ 700 (Atto-Tec GmbH, Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, Alemania). Más preferentemente, el fluoróforo es MR121 o Atto™ 700.

El término "reactivador", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que invierte el efecto de desactivación del desactivador de AMPc al unirse al desactivador de AMPc. Es esencial que el reactivador sea capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico que va a detectarse, es decir, AMPc o GMPc.

El reactivador puede ser una proteína de unión. Preferentemente, el reactivador es un anticuerpo específico contra AMPc. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Si el reactivador es una proteína, el valor de pH tiene que estar adaptado a un intervalo en el que la proteína sea capaz de unirse. Normalmente, este intervalo de pH es de 6,8 a 7,8.

Los expertos en la técnica conocen bien métodos para producir anticuerpos que son específicos para un nucleótido. Kohler y Milstein (Nature 1975, 256: 495-497), por ejemplo, describen métodos para producir anticuerpos monoclonales.

El complejo de detección comprende un indicador y un reactivador. El indicador consiste en un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc. El complejo de detección muestra fluorescencia si se excita. Cuando el complejo de detección entra en contacto con un nucleótido, el reactivador se une a un determinado porcentaje del nucleótido libre y abandona el complejo de detección. El indicador ahora ya no se reactiva más y cuando se excita no muestra fluorescencia o solo muestra una fluorescencia baja. Esta disminución de la fluorescencia es indicativa de la cantidad de nucleótido presente en el sistema.

El cambio de fluorescencia puede compararse con un control, tal como una curva patrón. Una curva patrón puede establecerse midiendo el cambio de fluorescencia para cantidades predeterminadas del nucleótido a detectar.

La presente invención también proporciona el uso de los métodos descritos anteriormente para determinar la concentración de AMPc en una mezcla. Adicionalmente, el método descrito anteriormente puede usarse para determinar la actividad de receptores cuando la transducción de señales de estos receptores comprende AMPc o GMPc. Preferentemente, el receptor es un receptor acoplado a proteínas G (GPCR).

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método in vitro para determinar la actividad de un receptor, donde la transducción de señales del receptor comprende AMPc o GMPc, que comprende a) poner en contacto células que expresan dicho receptor con un complejo de un indicador y un reactivador, donde el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3, 6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc, y el desactivador de AMPc es capaz de desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador es capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar, b) efectuar la lisis de las células y c) medir el cambio de fluorescencia, donde el cambio de fluorescencia medido se compara con un control.

Como alternativa, la etapa b) puede ser anterior a la etapa a).

60 Una realización preferida es un método para determinar la actividad de un GPCR.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de los métodos descritos anteriormente para seleccionar ligandos de un receptor, cuando la transducción de señales de este receptor comprende AMPc o GMPc. Preferentemente, dicho receptor es un GPCR.

65

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método in vitro para seleccionar un ligando para un receptor, donde la transducción de señales del receptor comprende AMPc o GMPc, que comprende a) poner en contacto un compuesto candidato con una célula que expresa dicho receptor, b) añadir a las células un complejo de un indicador y un reactivador, donde el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc, y el desactivador de AMPc es capaz de desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador es capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar, c) efectuar la lisis de las células y d) medir el cambio de fluorescencia, donde el cambio de fluorescencia medido se compara con un control.

Como alternativa, la etapa c) puede ser anterior a la etapa b).

Una realización preferida es un método para seleccionar un ligando para un GPCR.

El cambio de fluorescencia medido se compara con un control. El control puede ser una curva patrón con una cantidad predeterminada de nucleótido.

Una célula que expresa un receptor tal como, por ejemplo, GPCR, puede ser una célula que exprese dicho receptor de manera endógena o una célula transgénica para dicho receptor.

Dicha célula transgénica puede crearse por métodos conocidos en la técnica. Un método preferido comprende las siguientes etapas: clonar un ADN que codifica el receptor de interés, insertar dicho ADN en un vector e introducir dicho vector en la célula. Preferentemente, dicho vector comprende tramos que son homólogos a tramos del genoma de la célula adecuada para la recombinación homóloga y, por lo tanto, permite la inserción dirigida del ADN que codifica el receptor en el genoma de la célula.

El término "ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que se une a un receptor. Un ligando puede ser un agonista, un antagonista, un modulador, un agonista parcial o un antagonista parcial.

El término "agonista" se refiere a una molécula que se une a un receptor y desencadena una respuesta en la célula. La expresión "agonista parcial" se refiere a una molécula que activa parcialmente un receptor. El término "antagonista" se refiere a una molécula que se une al receptor pero no lo activa y realmente bloquea su activación por un agonista.

La presente invención también se refiere a un kit que comprende un reactivador y un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc como se ha descrito anteriormente. El kit puede comprender el reactivador y el fluoróforo modificado por separado o formando un complejo.

El kit también puede comprender cualquier otro componente que se considere apropiado en el contexto de la medición del nivel, o niveles, de los fluoróforos respectivos, tales como tampones, filtros, etc. adecuados.

Opcionalmente, el kit también puede comprender un manual de usuario para interpretar los resultados de cualquier medición con respecto a la determinación de la actividad del GPCR. Particularmente, dicho manual puede incluir información para la interpretación del cambio de fluorescencia medido, preferentemente una curva patrón.

Habiéndose descrito en líneas generales esta invención, se entenderá mejor haciendo referencia a los ejemplos específicos, que se incluyen en el presente documento con la única finalidad de ser ilustrativos y sin pretender ser limitantes a menos que se especifique otra cosa, junto con las siguientes figuras.

Figuras

La Figura 1 muestra la estructura molecular del fluoróforo MR121 en forma de éster de NHS como se usó para marcar el derivado de AMPc en los ejemplos.

La Figura 2 muestra la estructura molecular de MR121-2-AHA-AMPc.

La Figura 3 muestra una representación esquemática del principio del ensayo con el ejemplo de determinar la concentración de AMPc en una célula. Las células se sometieron a lisis y a los lisados celulares se les añadió una mezcla de detección. La mezcla de detección comprendía un complejo de un fluoróforo (por ejemplo, MR121) unido a un desactivador de AMPc (derivado de AMPc, por ejemplo, 2-AHA-AMPc) y un anticuerpo contra AMPc (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-AMPc). El efecto de desactivación del desactivador sobre el fluoróforo se anula por el anticuerpo (= reactivador). Cuando entra en contacto con el AMPc, el anticuerpo se une a él en lugar de al derivado de AMPc. Sin el efecto de reactivación del anticuerpo, el desactivador de AMPc desactiva el fluoróforo y produce una disminución de la señal fluorescente. Cuanto mayor es la concentración de AMPc, menor es la fluorescencia.

La Figura 4 muestra una representación gráfica de diagramas de Stern-Volmer de MR121 y Triptófano (a), 2-AHA-AMPc, (b) y AMPc (c). I_0/I : cambio de intensidad de fluorescencia (I_0 intensidad de fluorescencia en ausencia e I en presencia de un desactivador), t_0/t : cambio de duración de la fluorescencia (t_0 duración de la fluorescencia en ausencia y t en presencia de un desactivador).

La Figura 5 muestra una representación gráfica de la disminución de la intensidad de fluorescencia (I_0/I) para diferentes derivados de AMPc (8-AHA-AMPc, 2-AHA-AMPc, N-6-aminohexil-AMPc, 8-OH-AMPc, 8-ADOA-AMPc, 2'-AEC-AMPc, 8-MBT-AMPc). La importante desviación de la linealidad en el caso de 8-AHA-AMPc por encima de 5 mM se debe a problemas de solubilidad. I_0/I : cambio de intensidad de fluorescencia.

La Figura 6: muestra una representación gráfica de la desactivación y reactivación de la fluorescencia del indicador MR121-2-AHA-AMPc usando dos anticuerpos diferentes, A y B, específicos contra AMPc. Ab: Anticuerpo.

La Figura 7 muestra una representación gráfica de la titulación del anticuerpo anti-AMPc a una concentración fija de indicador (MR121-2-AHA-AMPc 10 nM). Un ajuste de los datos experimentales dio como resultado un valor K_d de 28 nM.

La Figura 8 muestra una representación gráfica de dos curvas patrón de AMPc, una sin células (rombos negros) y la otra en presencia de células (rombos blancos), el ajuste de las curvas da un valor de CI_{50} =109 nM y 119 nM sin y con células, respectivamente.

La Figura 9 muestra una representación gráfica de una curva de respuesta a la dosis de la forskolina y una curva patrón de AMPc con 10.000 células/pocillo, el ajuste de las curvas da un valor de CI_{50} =102 nM para el AMPc y de 3,7 μ M para la forskolina.

La Figura 10 muestra una representación gráfica de diagramas de Stern-Vollmer de las siguientes moléculas: MR121-8-AHA-AMPc, ATTO590-8-AHA-AMPc y ATTO655-8-AHA-AMPc.

La Figura 11 muestra la estructura química del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (A) y el anillo de purina de AMPc (B).

La Figura 12 muestra las estructuras químicas de derivados de AMPc

- A): 2-(6-aminohexil)amino-AMPc (2-AHA-AMPc),
- B): 8-hidroxi-AMPc (8-OH-AMPc)
- C): 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc (8-MBT-AMPc)
- D): 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino) (8-ADOA-AMPc)
- E): 8-(6-aminohexil)amino-AMPc (8-AHA-AMPc)
- F): N-6-aminohexil-AMPc
- G): 2'-AEC-AMPc (AEC = 3-amino-9-etil carbazol)

La Figura 13 muestra una representación gráfica de la desactivación de MR121 por AMPc, GMPc, UMPc y TMPc a concentraciones de hasta 13 mM (a). (b) muestra una representación gráfica de la desactivación de MR121 por AMPc y GMPc a concentraciones de hasta 10 μ M en un diagrama de Stern-Vollmer. A bajas concentraciones, ni el AMPc ni el GMPc desactivan el MR121.

La Figura 14 muestra una representación gráfica de la disminución de fluorescencia en función de la concentración de AMPc y GMPc (curvas patrón).

La Figura 15 muestra una representación gráfica de la disminución de fluorescencia en función de la concentración de AMPc (curva patrón de AMPc) con Atto700-2-AHA-AMPc como indicador y anticuerpo anti-AMPc como reactivador. El ajuste de la curva da un valor de CI_{50} =48 nM.

Ejemplos

A menos que se indique otra cosa, los reactivos disponibles en el mercado a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Reactivos e instrumentación

El AMPc, GMPc, 2-AHA-AMPc, 8-AHA-AMPc, 8-ADOA-AMPc, 2'-AEC-AMPc, 8-MBT-AMPc, N-6-amino-hexil-AMPc y 8-OH-AMPc se adquirieron en Biolog Life Science Institute (28071 Bremen, Alemania), el éster de NHS de MR121 y el N-6-aminohexil-AMPc se adquirieron en Roche diagnostics (Penzberg, Alemania) y el éster de NHS de Atto™ 700 se adquirió en Atto-Tec GmbH (Atto-Tec GmbH, Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, Alemania). Los anticuerpos

monoclonales de ratón anti-APMc se produjeron internamente como describen Kohler y Milstein (Nature 1975, 256: 495-497).

5 Todos los experimentos se realizaron en PBS (pH 7,4) que contenía BSA (Albúmina, suero bovino, $\geq 96\%$, esencialmente sin ácidos grasos, A6003, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, Suiza) al 0,1%. Para efectuar la lisis de las células se usó un tampón de lisis de PBS 3x (pH 7,4) que contenía BSA (Albúmina de suero bovino, fracción V, $\geq 96\%$, 05480, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) al 0,1%, Triton[®] X-100 (9342, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) al 0,45%, NP40 (Nonidet P40 Substitute, 19628, USB Corporation, Cleveland, OH USA) al 0,075% y NaN_3 al 0,3% (purum p.a., $>99\%$, 71290, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) al 0,3%. El medio de cultivo para las células fue F-12K (Gibco 21127-002) con FCS al 10% y Penicilina-Estreptomina (Gibco 15140-122) al 1%.

15 Todas las mediciones de intensidad de fluorescencia se realizaron mediante un lector de fluorescencia plate::vision (Evotec Technologies GmbH, Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburgo, Alemania) equipado con una lámpara de arco de Xe de alta presión, usando para las mediciones con MR121 un filtro de excitación a 630 nm (ancho de banda 50 nm) y un filtro de emisión a 695 nm (ancho de banda 55 nm) y para las mediciones con Atto 700 un filtro de excitación a 655 nm (ancho de banda 50 nm) y un filtro de emisión a 710 nm (ancho de banda 40 nm). La intensidad de fluorescencia se ajustó aproximadamente al 60% de la señal máxima de la cámara iCCD empleada usando filtros de atenuación y tiempos de exposición variables. Las mediciones de duración se realizaron mediante un lector de TRF plate::vision (Evotec Technologies GmbH, Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburgo, Alemania) con un sistema OPO como fuente de luz (GWU Lasertechnik Vertriebsgesellschaft m.b.H., 50374 Ertstadt, Alemania) ajustado a 630 nm para la excitación y el filtro de emisión a 695 nm.

25 Todos los experimentos se realizaron en placas de microtitulación de 384 pocillos (Costar 384, negras con fondo plano, transparente, tratadas para cultivo de tejidos, Prod. N^o 3712), variando el volumen de ensayo total de 30 a 40 ml.

Ejemplo 1: desactivación de MR121

30 1.1 Capacidades de desactivación de nucleótidos cíclicos

Con una pipeta, se transfirieron a una placa de microtitulación 20 μl de MR121 (en PBS, concentración final 20 nM) y 20 μl de desactivador en PBS (concentración final de DMSO en el ensayo: 1,25%). Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a TA se midieron la fluorescencia y la duración. Las concentraciones ensayadas de los nucleótidos cíclicos fueron 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 y 12,8 mM.

La GMPc desactiva el MR121 a concentraciones más altas (Figura 13a). Sin embargo, esta desactivación no afecta a la ventana de ensayo porque en un ensayo de GMPc no se alcanzan dichas concentraciones. A bajas concentraciones de hasta 10 μM (que corresponden al intervalo de concentraciones celulares), ni el AMPc ni el GMPc desactivan el fluoróforo (Figura 13b). En el ensayo de desplazamiento con el indicador MR121-2-AHA-AMPc, la ventana de ensayo para el desplazamiento con AMPc o GMPc pasa de 1 (MR121-2-AHA-AMPc reactivado después de unirse al anticuerpo) a 1,7 I/I_0 (MR121 desactivado por 2-AHA-AMPc).

45 1.2 Desactivación con derivados de AMPc

Para analizar el mecanismo de desactivación, se realizaron mediciones de intensidad de fluorescencia y de duración de fluorescencia de MR121 libre en función de diferentes moléculas (Trp, AMPc, 2-AHA-AMPc, 8-AHA-AMPc, 8-ADOA-AMPc, 2'-AEC-AMPc, N-6-aminohexil-AMPc, 8-MBT-AMPc y 8-OH-AMPc, véanse las Figuras 4, 5).

50 Con una pipeta, se transfirieron a una placa de microtitulación 20 μl de MR121 (en PBS, concentración final 20 nM) y 20 μl de desactivador en PBS (concentración final de DMSO en el ensayo: 1,25%). Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a TA, se midió la fluorescencia y la duración. Con el Trp se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia sin cambio en la duración de la fluorescencia. Sorprendentemente, la disminución de la intensidad de fluorescencia es incluso más pronunciada para 2-AHA-AMPc, 8-AHA-AMPc, 8-ADOA-AMPc, 8-MBT-AMPc y 8-OH-AMPc (con un duración constante de la fluorescencia) mientras que el AMPc, 2'-AEC-AMPc y N-6-aminohexil-AMPc no mostraron desactivación en absoluto. Por analogía con las referencias 2-5, se llega a la conclusión de que MR121 forma un complejo no fluorescente en estado fundamental con 2-AHA-AMPc, 8-AHA-AMPc, 8-ADOA-AMPc, 8-MBT-AMPc y 8-OH-AMPc, pero no con AMPc, 2'-AEC-AMPc y N-6-aminohexil-AMPc.

60 En 2-AHA-, 8-AHA- y 8-ADOA-AMPc, el enlazador está acoplado a través de un enlace amina, en 8-MBT-AMPc a través de un azufre y en 8-OH-AMPc a través de un enlace de oxígeno directamente al sistema de anillo de purina de la adenosina. Sin embargo, en N-6-aminohexil-AMPc y 2'-AEC-AMPc, el enlazador está acoplado al grupo amino o al resto de ribosa de la adenosina. Aparentemente, la modificación de la adenosina conduce a un cambio en el estado electrónico del sistema de anillo que favorece la formación del complejo con el colorante de oxazina.

En la Figura 5 se representa gráficamente el cambio en la intensidad de fluorescencia (I_0/I) para todos los derivados de AMPc investigados. La constante de asociación, K_s , se calculó a partir de la región lineal (hasta 3,2 mM) de la gráfica, dando valores de 514 M^{-1} , 475 M^{-1} , 512 M^{-1} , 758 M^{-1} y 236 M^{-1} para 8-AHA-AMPc, 8-ADOA-AMPc, 2-AHA-AMPc, 8-MBT-AMPc y 8-OH-AMPc, respectivamente. Esta desactivación es muy eficaz, la K_s para la mayoría de los derivados de AMPc es más del doble en comparación con lo publicado en la bibliografía para el triptófano ($\sim 220 \text{ M}^{-1}$).

Cuando el MR121-2-AHA-AMPc está unido a un anticuerpo específico contra AMPc, no puede formarse este complejo no fluorescente y se observa un aumento en la intensidad de la fluorescencia de MR121 (Figura 6). La intensidad de fluorescencia del MR121 libre 20 nM, MR121-2-AHA-AMPc 20 nM (desactivación máxima) y una mezcla de MR121-2-AHA-AMPc 20 nM y anticuerpo 1000 nM (reactivación máxima) se midió en PBS que contenía BSA al 0,1%.

En comparación con el MR121 libre (100%), el indicador muestra una intensidad de fluorescencia del 25%. El anticuerpo A reactiva la fluorescencia al 61% y el anticuerpo B al 87%. Aparentemente, el grado de reactivación también depende de la afinidad de unión del anticuerpo anti-AMPc y de la secuencia de aminoácidos que forma el dominio de unión del anticuerpo. Un triptófano cerca del dominio de unión del anticuerpo puede desactivar la fluorescencia de MR121 en un cierto grado. Esto puede explicar el hecho de que diferentes anticuerpos muestren diferentes grados de reactivación.

Para el ensayo es crucial que el anticuerpo reconozca el indicador que es un AMPc marcado y modificado y el AMPc "puro" producido en las células. Para el desarrollo posterior del ensayo se usó el anticuerpo A, aunque la reactivación es menor en comparación con el anticuerpo B. Sin embargo, el desplazamiento del indicador con AMPc es mejor con el anticuerpo A y la ventana de desactivación completa - reactivación completa sigue siendo suficientemente buena como para desarrollar un ensayo sólido.

Ejemplo 2: determinación de la K_d del anticuerpo anti-AMPc

La afinidad de unión del anticuerpo anti-AMPc (anticuerpo A) por MR121-2-AHA-AMPc (K_d) se determinó mediante la titulación del anticuerpo frente a diversas concentraciones de indicador (2, 6, 10, 15 y 20 nM) en tampón de lisis 1x. Con una pipeta, se transfirieron 20 μl de diluciones de anti-AMPc en 4 copias a una placa de microtitulación de 384 pocillos. Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 20 μl de MR121-2-AHA-AMPc y, después de 30 minutos de incubación a TA en un agitador de 384 pocillos, se leyó la intensidad de la fluorescencia. Los datos se normalizaron fijando los valores sin anticuerpo al 0%. La Figura 7 muestra las curvas de titulación correspondientes. El ajuste a un modelo de cuatro parámetros produjo valores K_d de 25 a 29 nM para las diferentes concentraciones de indicador.

Ejemplo 3: curvas de respuesta a la dosis

AMPc

Basándose en la $K_d=28 \text{ nM}$, se seleccionaron el anticuerpo anti-AMPc 40 nM y el MR121-2-AHA-AMPc 20 nM para una detección sensible de AMPc con un valor de CI_{50} de aproximadamente 100 nM. La Figura 8 presenta dos curvas patrón de AMPc, una sin células y la otra con células. Para la curva patrón sin células, se titularon 20 μl de diluciones de AMPc en PBS, que contenía BSA al 0,1%, en una placa de microtitulación de 384 pocillos y después se añadieron 10 μl de la mezcla de detección (anti-AMPc 120 nM y MR121-2-AHA-AMPc 60 nM en tampón de lisis 3x). Para la curva patrón con células, se sembraron en placas 10.000 células/pocillo (CHO-K1) en 25 μl de medio y se mantuvieron durante 20 h a 37 °C. Después se retiró el medio y se añadieron 20 μl de diluciones de AMPc en PBS + BSA al 0,1% seguidos de 10 μl de mezcla de detección. Posteriormente las placas se incubaron a TA en un agitador de 384 pocillos antes de leer la señal de fluorescencia. Los valores de CI_{50} determinados son similares para las dos curvas patrón (109 y 119 nM sin y con células, respectivamente, véase la Figura 8).

La estabilidad de la curva patrón de AMPc con respecto al tiempo y a la tolerabilidad frente a DMSO y BSA se ensayó sin células usando la mezcla de detección en tampón de lisis. Con hasta un 5% de DMSO y un 0,8% de BSA, no se observaron cambios en la CI_{50} ni se observó una disminución significativa de la señal. La señal y la CI_{50} fueron estables durante al menos 6 h.

La Figura 15 muestra una curva de respuesta a la dosis de AMPc realizada con indicador Atto700-2-AHA-AMPc 5 nM y anticuerpo 5 nM, proporcionando una CI_{50} de 48 nM. Se diluyó AMPc en PBS que contenía BSA al 0,1%. Se titularon 20 μl de las diluciones de AMPc en una placa de microtitulación de 384 pocillos y se añadieron 10 μl de mezcla de detección. La placa se incubó a TA en un agitador de 384 pocillos antes de la lectura de la señal fluorescente.

GMPc

La Figura 14 muestra una comparación de las curvas patrón para el AMPc y el GMPc realizadas con el indicador MR121-2-AHA-AMPc 20 nM y el anticuerpo 40 nM dando un valor CI_{50} de 134 nM para el AMPc y de 387 nM para el GMPc. Estos valores de CI_{50} así como la sensibilidad para el AMPc y el GMPc dependen de la selección del anticuerpo. Un anticuerpo diferente puede ser mucho más sensible para el GMPc y menos sensible para el AMPc.

Se diluyeron AMPc y GMPc en PBS que contenía BSA al 0,1%. Para la curva patrón sin células, se titularon 20 μ l de diluciones de AMPc y 20 μ l de diluciones de GMPc en una placa de microtitulación de 384 pocillos y después se añadieron 10 μ l de la mezcla de detección (anti-AMPc 40 nM y MR121-2-AHA-AMPc 20 nM en tampón de lisis 3x). Las placas se incubaron después a temperatura ambiente en un agitador de 384 pocillos antes de la lectura de la señal fluorescente.

Ejemplo 4: ensayo celular de AMPc

Se realizó una curva de respuesta a la dosis de forskolina con células CHO-K1. En 25 μ l de medio se sembró en placas una cantidad de células de 2.500 a 20.000 células/pocillo y se incubó durante 20 h a 37 °C. El medio se retiró y después de añadir 10 μ l de PBS con BSA al 0,1% e IBMX 1 mM, las células se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Se añadieron 10 μ l de diluciones de forskolina en PBS + BSA al 0,1% + IBMX 1 mM a concentraciones de 0,01 a 300 μ M (concentración final en volumen de ensayo 20 μ l) y se incubaron durante 30 minutos más a 37 °C. Después, las células se sometieron a lisis añadiendo 10 μ l de mezcla de detección (MR121-2-AHA-AMPc 20 nM + anti-AMPc 40 nM, concentración final en 30 μ l) en tampón de lisis 3x y se leyó la señal de fluorescencia después de 30 minutos de incubación a TA en un agitador de 384 pocillos. Con 10.000 células/pocillo se alcanzó el nivel máximo de AMPc y la CI_{50} mínima para la forskolina (3,7 μ M). La Figura 9 muestra una curva de respuesta a la dosis de forskolina y una curva patrón de AMPc con 10.000 células/pocillo.

Ejemplo 5: Desactivación de ATTO™ 590 y ATTO™ 655

Con una pipeta, se transfirieron a una placa de microtitulación 20 μ l de ATTO™ 590 y ATTO™ 655 respectivamente (en PBS, concentración final 20 nM) y 20 μ l de desactivador (8-AHA-AMPc) en PBS (concentración final de DMSO en el ensayo: 1,25%). Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a TA se midieron la fluorescencia y la duración. Los resultados se incorporaron en un diagrama de Stern-Vollmer. La constante de asociación, K_s , se calculó a partir de la región lineal (hasta 3,2 mM) del diagrama.

El 8-AHA-AMPc desactivó el Atto™ 590 y el Atto™ 655 con una $K_s=282 \text{ M}^{-1}$ y una $K_s=347 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Figura 10).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método in vitro para detectar el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) o el monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que comprende
- 10 a) poner en contacto una mezcla que comprende AMPc o GMPc con un complejo de un indicador y un reactivador, donde el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc, y el desactivador de AMPc es capaz de desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador es capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar, y
- 15 b) medir el cambio de fluorescencia, donde el cambio de fluorescencia medido se compara con un control.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mezcla es un lisado celular.
3. Un método in vitro para determinar la actividad de un receptor, en el que la transducción de señales del receptor comprende AMPc o GMPc, que comprende
- 20 a) poner en contacto células que expresan dicho receptor con un complejo de un indicador y un reactivador, donde el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc y el desactivador de AMPc es capaz de desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador es capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar,
- 25 b) lisar las células, y
- c) medir el cambio de fluorescencia, donde el cambio de fluorescencia medido se compara con un control.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa b) es anterior a la etapa a).
- 30 5. Un método in vitro para seleccionar un ligando para un receptor, en el que la transducción de señales del receptor comprende AMPc o GMPc, que comprende
- a) poner en contacto un compuesto candidato con una célula que expresa dicho receptor,
- 35 b) añadir a las células un complejo de un indicador y un reactivador, donde el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc y el desactivador de AMPc es capaz de desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador es capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar,
- 40 c) efectuar la lisis de las células, y
- d) medir el cambio de fluorescencia, donde el cambio de fluorescencia medido se compara con un control.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la etapa c) es anterior a la etapa b).
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el receptor es un receptor acoplado a proteínas G.
- 45 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil) amino-AMPc.
- 50 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el fluoróforo es 1-[3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonil)-propil]-11-etil-3,4,8,9,10,11-hexahidro-2H-13-oxa-6,11-diaza-1-azonia-pentaceno (MR121).
10. El uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 8 y 9 para determinar la concentración de AMPc o de GMPc en una mezcla.
- 55 11. Un kit que comprende un indicador y un reactivador, en el que el indicador es un fluoróforo unido covalentemente a un desactivador de AMPc, el desactivador de AMPc es 2-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(6-aminohexil)amino-AMPc, 8-(8-amino-3,6-dioxaoctilamino)-AMPc, 8-hidroxi-AMPc u 8-(4-mercaptobutiltio)-AMPc, y el desactivador de AMPc es capaz de desactivar el fluoróforo al que está unido covalentemente, y el reactivador es capaz de unirse al desactivador de AMPc así como al nucleótido cíclico a detectar.
- 60

Figura 1

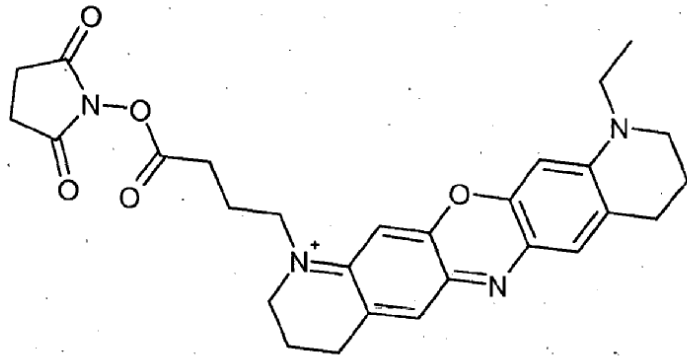


Figura 2

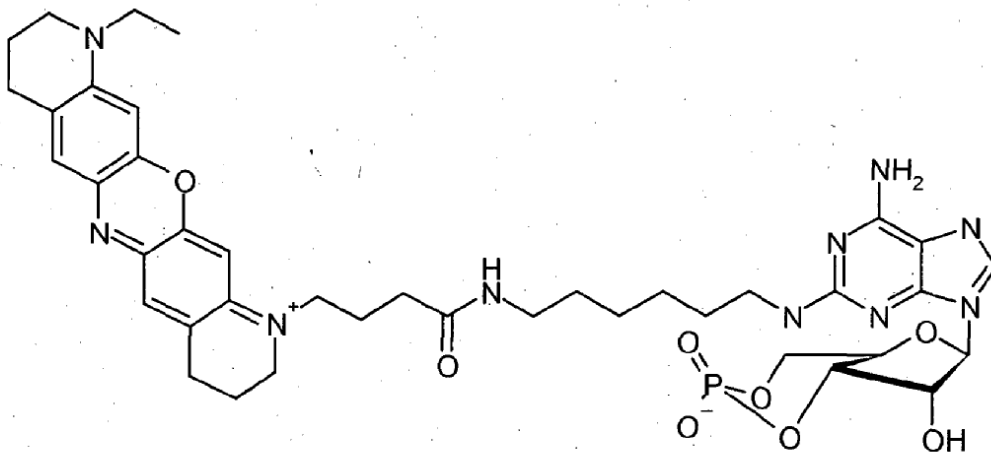


Figura 3

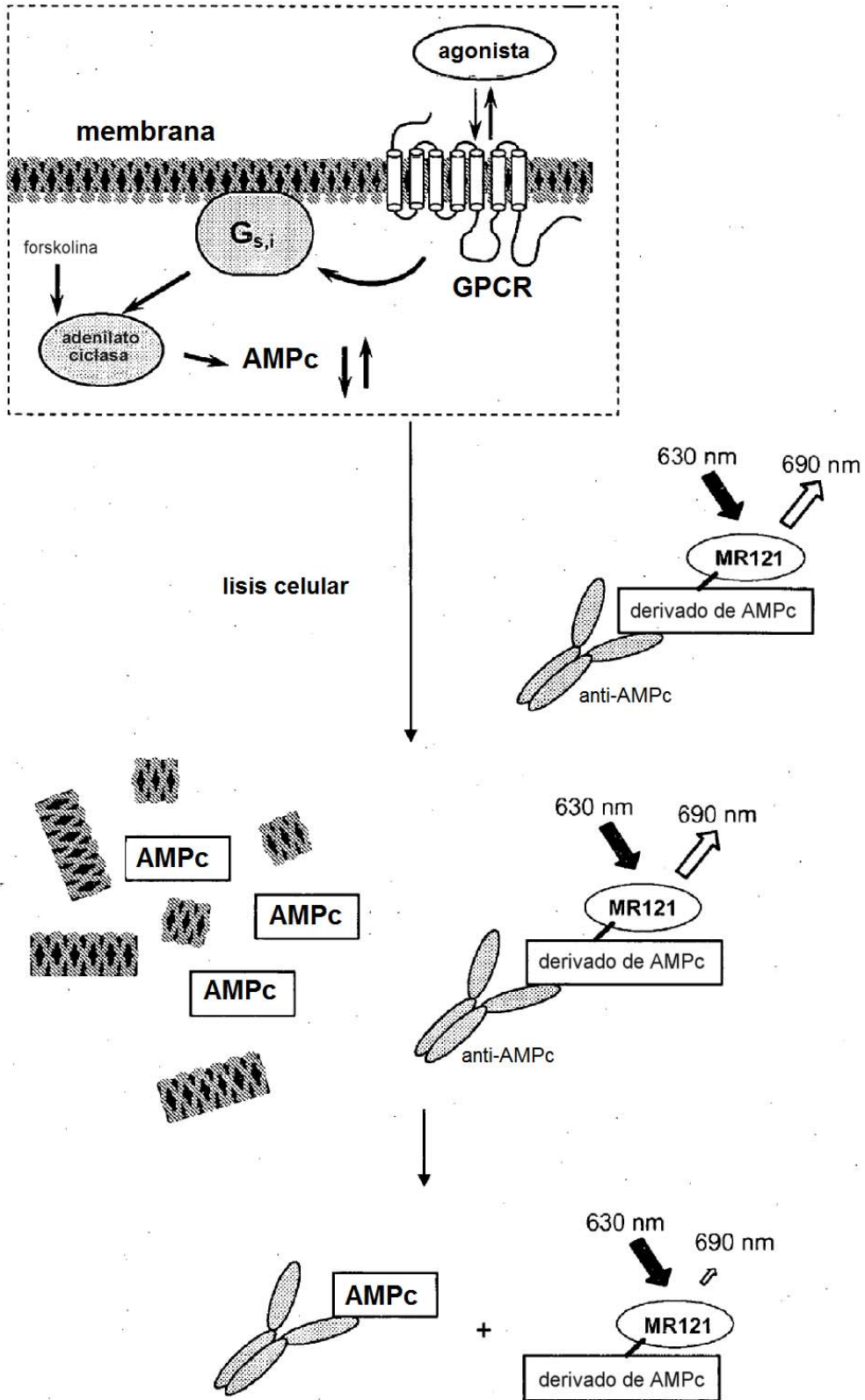


Figura 4

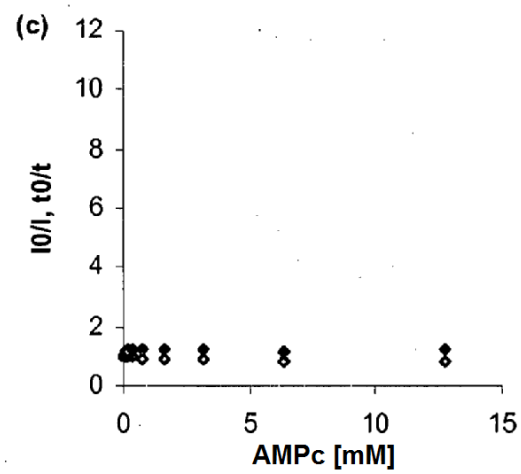
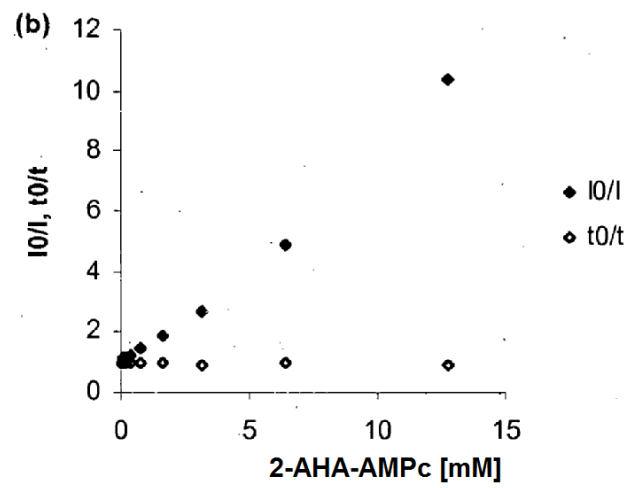
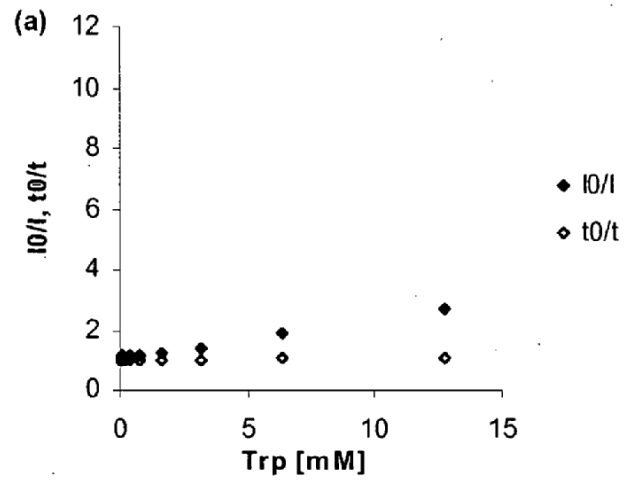


Figura 5

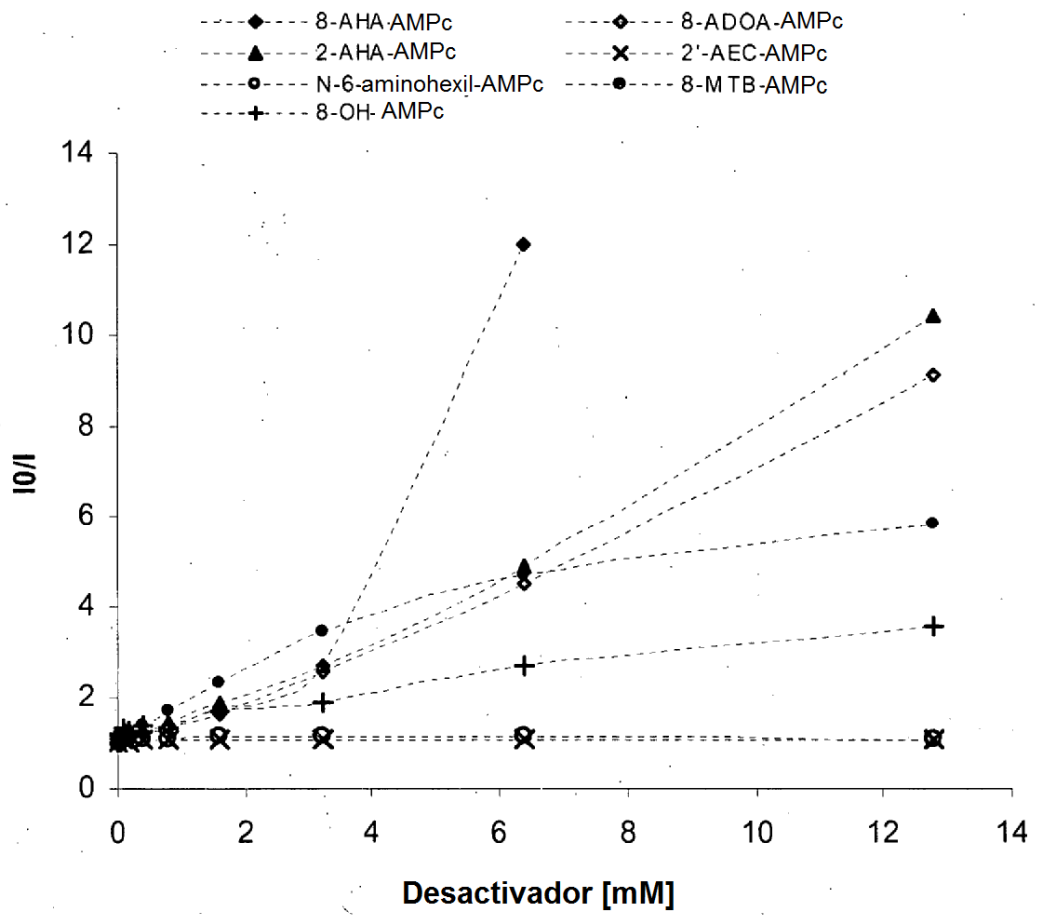


Figura 6

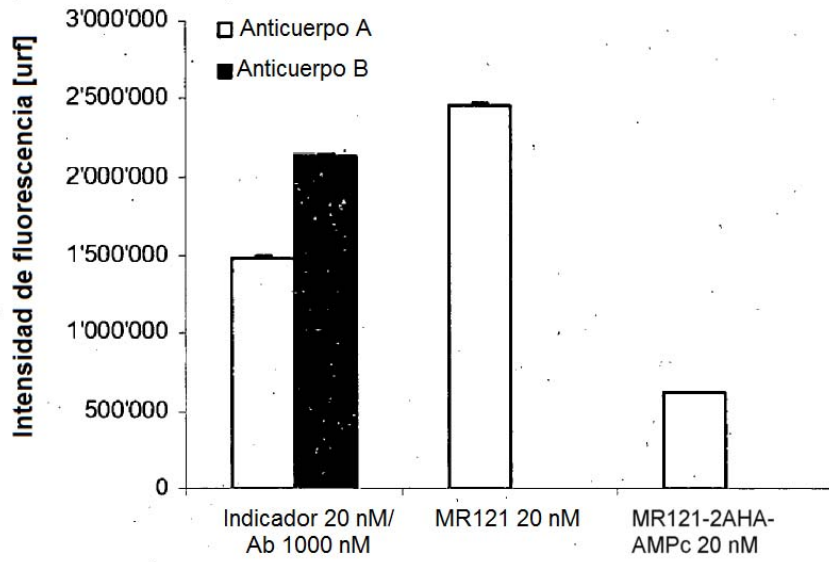


Figura 7

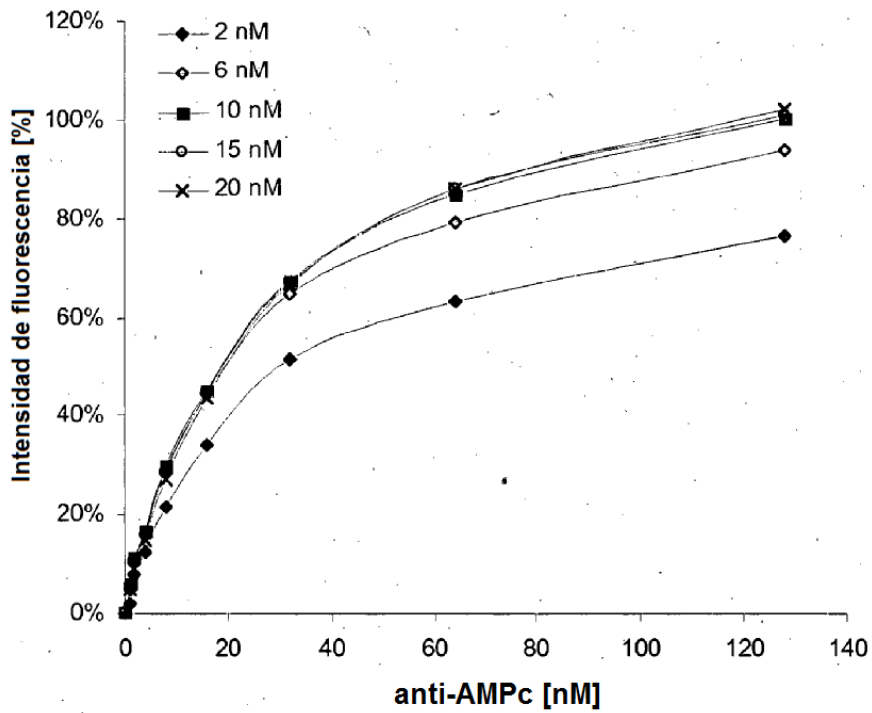


Figura 8

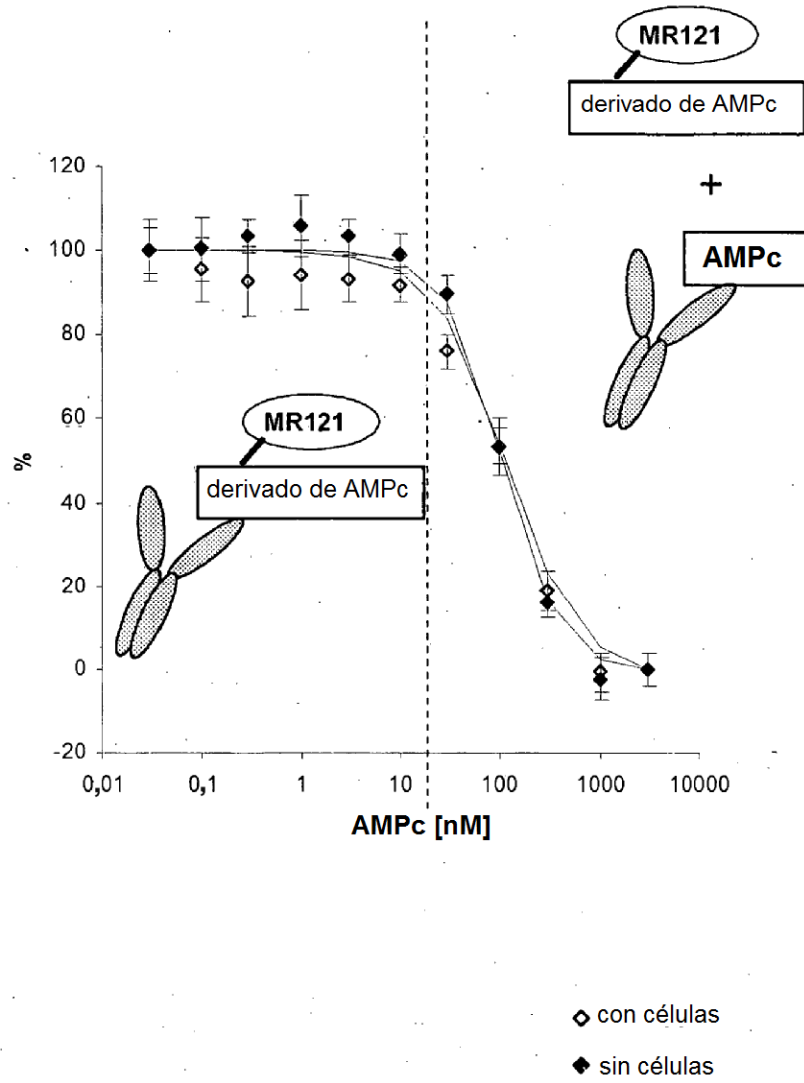


Figura 9

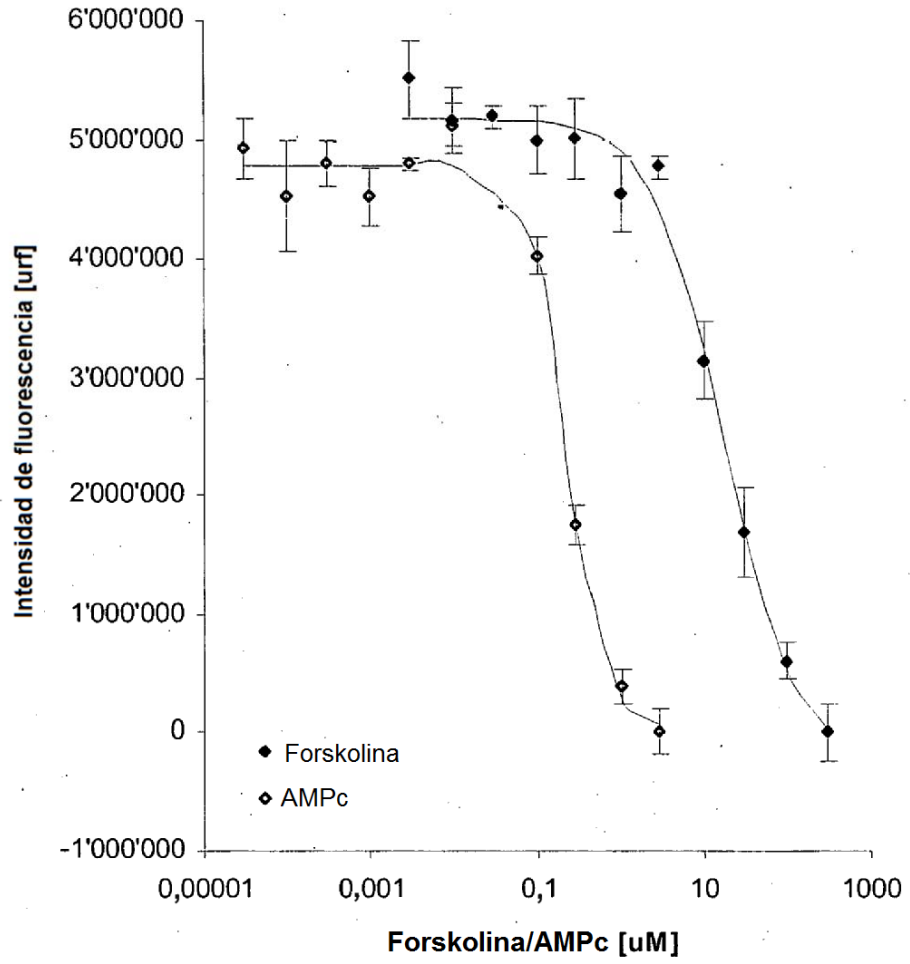


Figura 10

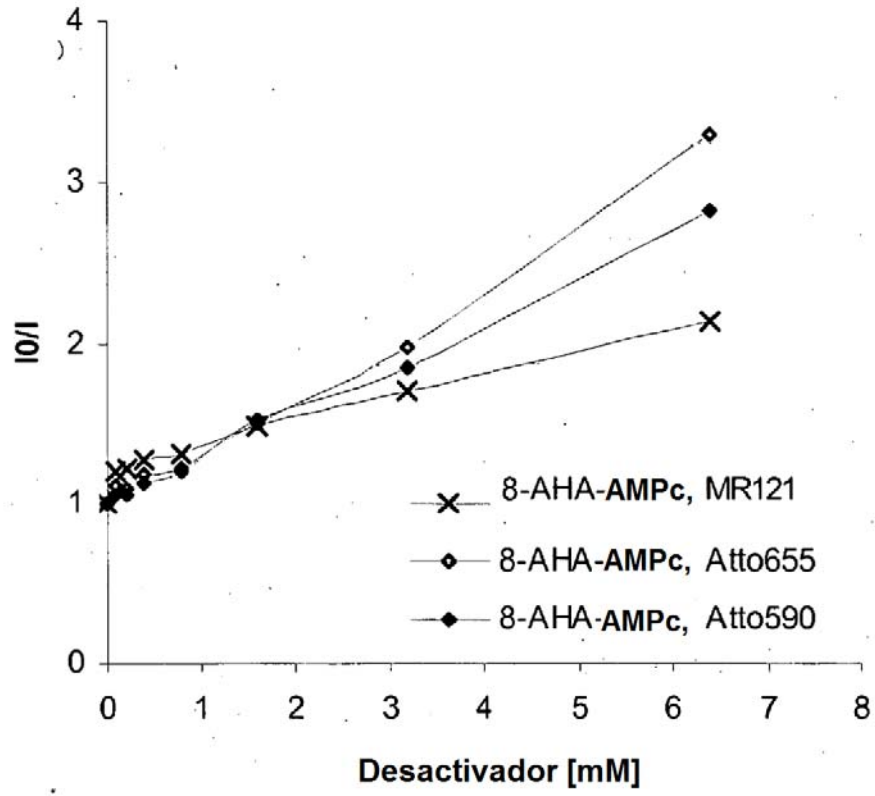


Figura 11A

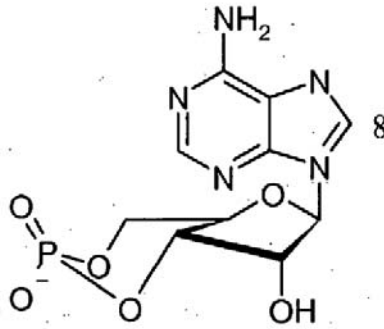


Figura 11B

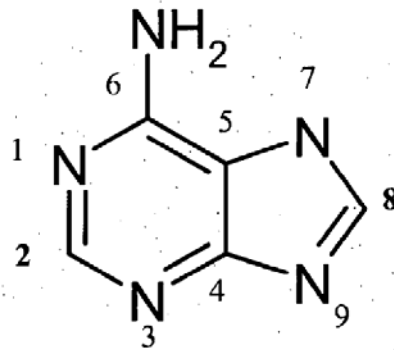


Figura 12A

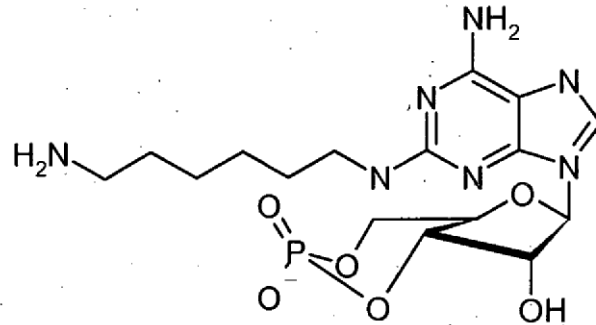


Figura 12B

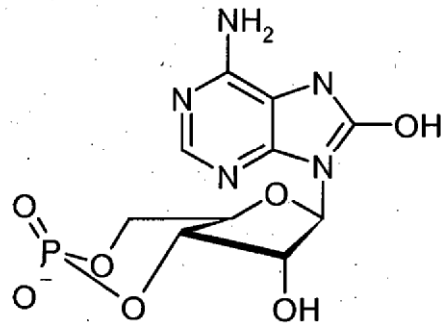


Figura 12C

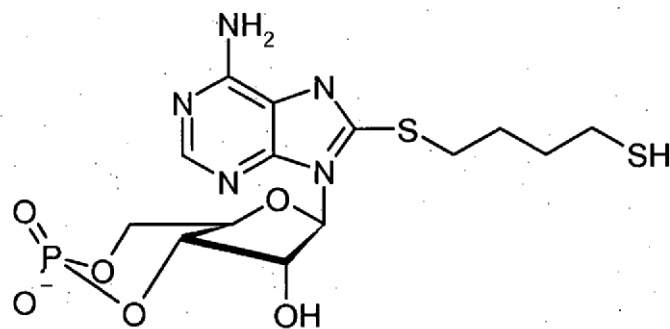


Figura 12D

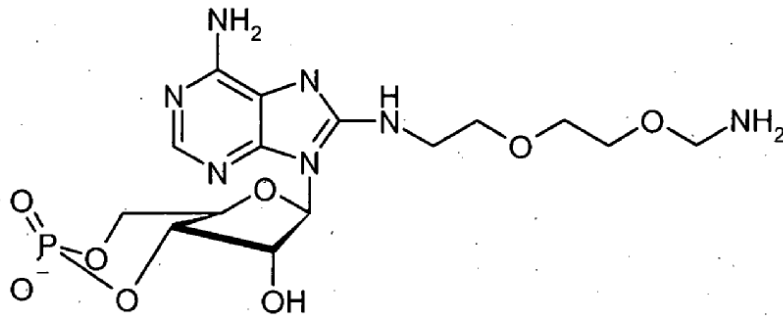


Figura 12E

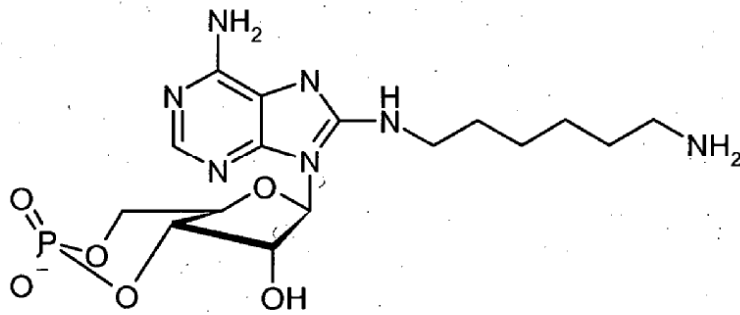


Figura 12F

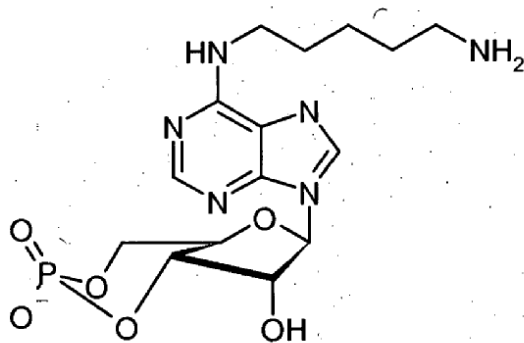


Figura 12G

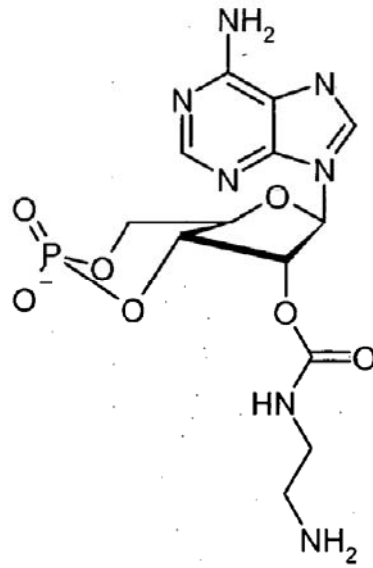


Figura 13

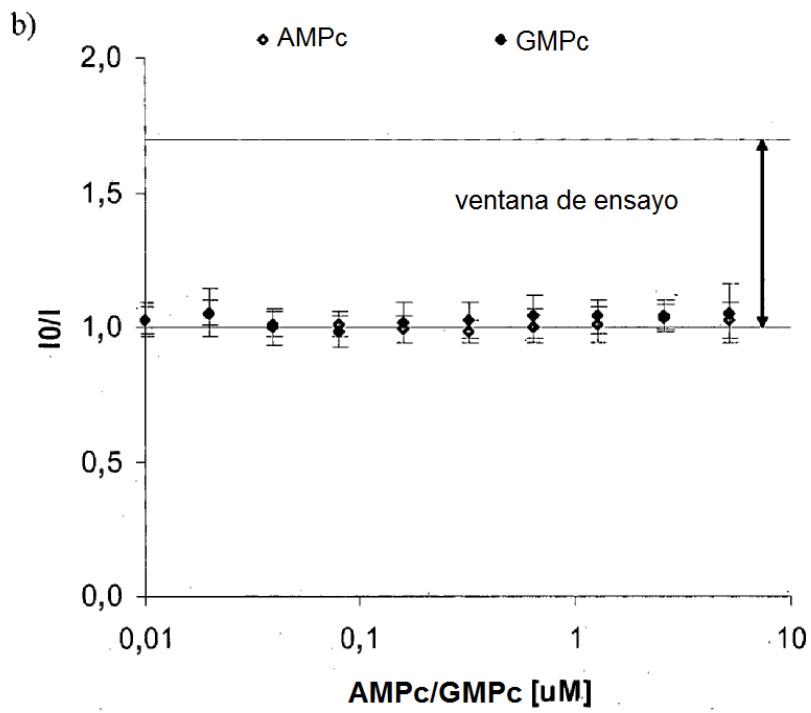
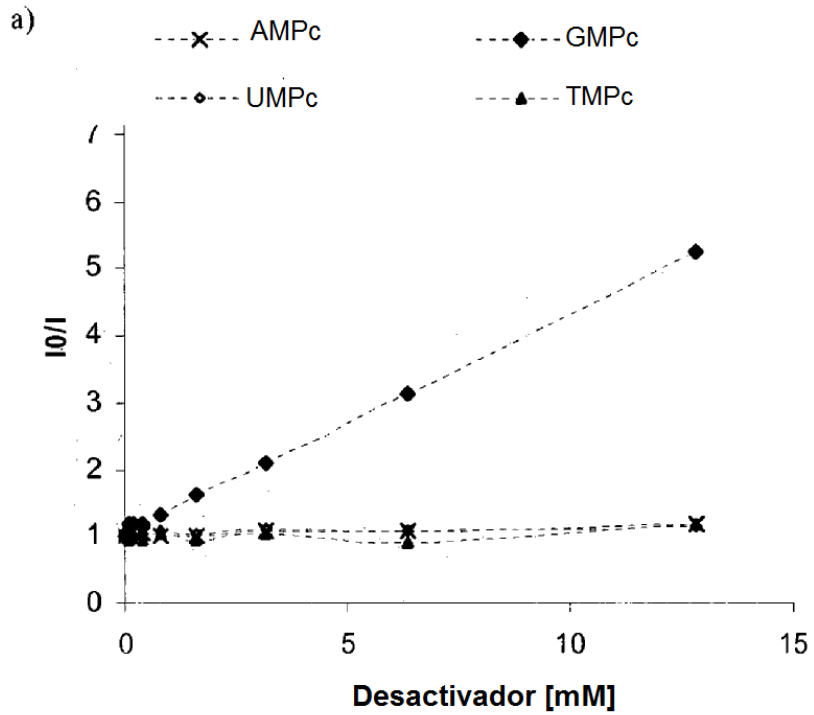


Figura 14

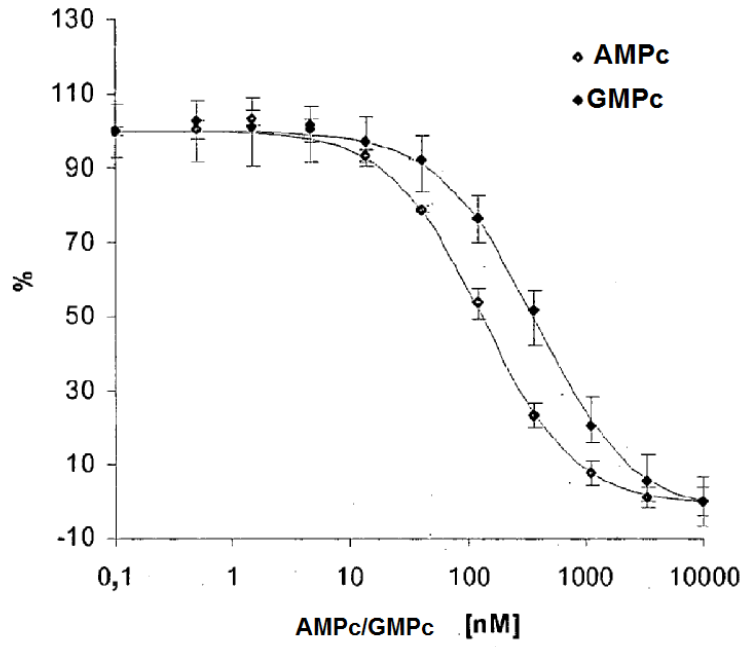


Figura 15

