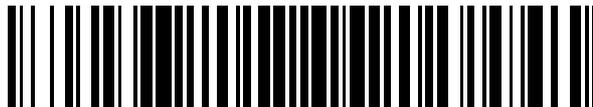


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 902**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2011 E 11738203 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2598886**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de moduladores de catecol O-metiltransferasa**

30 Prioridad:

27.07.2010 EP 10170957

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

21.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ENDERLE, THILO y
ROTH, DORIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 548 902 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

Procedimiento para la identificación de moduladores de catecol O-metiltransferasa

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de moduladores de la actividad de la enzima catecol O-metiltransferasa.

10 La catecol O-metiltransferasa (COMT) cataliza la O-metilación de sustratos que tienen un resto catecol. El donante de metilo en la metilación por COMT es la S-adenosilmetionina (SAM). La COMT desempeña un papel importante para el catabolismo de neurotransmisores de catecolamina endógenos, catecolestrógenos y moléculas xenobióticas. La inhibición de COMT es un enfoque importante para desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos en la enfermedad de Parkinson.

15 W.F. Herblin (*Analytical Biochemistry* 51, 19-22, 1973) describe un ensayo colorimétrico para la actividad de COMT. El ensayo usa nitrocatecol como aceptor de metilo para COMT. El nitrocatecol existe en forma de una solución amarilla en agua a pH ácido con un máximo de absorción a 350 nm. A pH ligeramente alcalino, la ionización del para-hidroxilo vuelve naranja la solución ($\lambda_{\text{máx}} = 430 \text{ nm}$). En base más fuerte, la ionización del meta-hidroxilo conduce a una solución de color rojo cereza ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$). El ensayo está basado en las observaciones de que el nitrocatecol se metila por COMT y que el nitrocatecol metilado no exhibe ya el color rojo cereza resultante de la segunda ionización. En este ensayo, el sustrato (nitrocatecol) y SAM tienen que estar en un intervalo de concentración μM que está en o por encima de la K_m , lo que limita la sensibilidad.

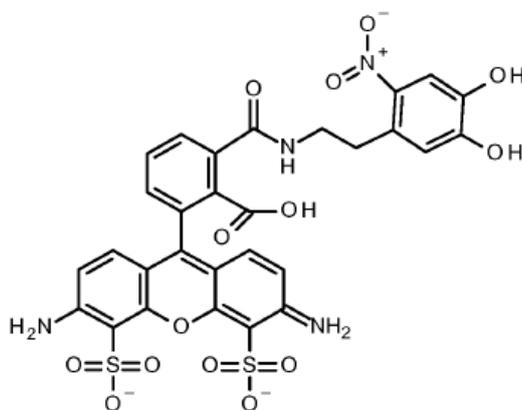
20 G. Zürcher y M. Da Prada (*Journal of Neurochemistry*, vol. 38, n° 1, 1982) describen un ensayo radioquímico de una etapa para la actividad de COMT. En este ensayo, el catecol se convierte en guayacol tritiado, un compuesto de muy baja polaridad, al incubar COMT con [^3H]metil-SAM, Mg^{2+} y adenosina desaminasa. El guayacol se extrae usando un medio de baja polaridad, p.ej. tolueno, y contando en un contador de centelleo.

25 Los ensayos anteriormente descritos no son adecuados para cribar en un gran número de compuestos su actividad moduladora de COMT debido a la sensibilidad limitada (ensayo colorimétrico) o debido a la configuración del ensayo (etapa de extracción en el ensayo radioquímico).

30 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento de ensayo homogéneo sensible adecuado para cribar en un gran número de compuestos su actividad moduladora de COMT.

35 En un primer objeto, la presente invención proporciona un procedimiento para la identificación de un modulador de la actividad de una enzima catecol O-metiltransferasa (COMT) que comprende las etapas de:

- 40 a) proporcionar 4-nitrocatecol ligado covalentemente con Alexa Fluor 488 que tiene la fórmula I,
 b) poner en contacto la molécula de la etapa a) con una enzima catecol O-metiltransferasa (COMT), S-adenosilmetilona (SAM) y un compuesto candidato y
 c) medir la lectura de fluorescencia de la mezcla de la etapa b), en la que una lectura de fluorescencia alterada en presencia del compuesto candidato en comparación con un blanco es indicativa de un modulador de una enzima catecol O-metiltransferasa (COMT).



(I).

45 En una realización preferida, el procedimiento es un procedimiento para la identificación de un inhibidor de COMT, en el que la lectura de fluorescencia reducida en la etapa c) en comparación con un blanco es indicativa de un inhibidor de COMT.

50 En una realización preferida adicional, la lectura de fluorescencia en la etapa c) es una lectura cinética.

En una realización preferida adicional, la COMT es COMT humana.

En una realización preferida adicional, el procedimiento es un procedimiento de cribado de alto rendimiento.

5 En una realización preferida adicional, el procedimiento se efectúa en una placa de microvaloración.

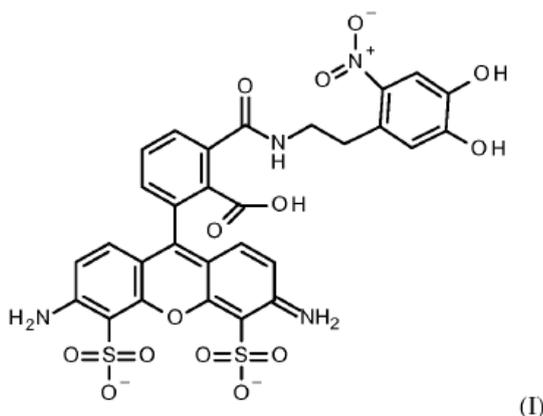
En una realización preferida adicional, la concentración final de COMT es de aproximadamente 25 nM.

10 En una realización preferida adicional, la concentración final del sustrato de COMT es de aproximadamente 200 nM.

En una realización preferida adicional, la concentración final de SAM es de aproximadamente 500 nM.

En un segundo objeto, la presente invención proporciona un procedimiento para la identificación de un sustrato de una enzima catecol O-metiltransferasa (COMT) que comprende las etapas de:

- 15 a) proporcionar 4-nitrocatecol ligado covalentemente con Alexa Fluor 488 que tiene la fórmula I y S-adenosilmetionina (SAM),
 b) poner en contacto la mezcla de la etapa a) con diferentes concentraciones de un compuesto candidato,
 c) poner en contacto las mezclas de las etapa b) con una enzima catecol O- metiltransferasa (COMT) y
 20 d) medir la lectura de fluorescencia cinética de las mezclas de la etapa c), en la que una meseta de lectura de fluorescencia descendente en función de una concentración creciente del compuesto candidato es indicativa de un sustrato de la enzima catecol O-metiltransferasa (COMT).



25 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la estructura química de Alexa Fluor® 488 acoplado covalentemente con 4-nitrocatecol.

La Fig. 2 muestra una gráfica de Stern Volmer para nitrocatecol (azul), 2-metoxi-5-nitrofenol (rojo) y 1,2-dimetoxi-4-nitrobenceno (verde); se mezcló Alexa Fluor 488 libre 20 nM con altas concentraciones, hasta 25 mM, de nitrocatecol, 2-metoxi-5-nitrofenol y 1,2-dimetoxi-4-nitrobenceno, respectivamente. Solo con nitrocatecol se observa un cambio de la intensidad de fluorescencia (I_0/I) de Alexa Fluor® 488, los productos metilados no influyen en la intensidad de fluorescencia de Alexa Fluor® 488.

La Fig. 3 muestra la cinética enzimática de la metilación catalizada por COMT de Alexa Fluor 488-nitrocatecol en el ensayo de fluorescencia de la presente invención.

La Fig. 4a muestra una medida cinética del cambio de la intensidad de fluorescencia en presencia de diversas concentraciones del inhibidor de COMT tolcapona.

La Fig. 4b muestra la curva de dosis-respuesta de tolcapona calculada a partir de las pendientes de la medida cinética de la Fig. 3a.

La Fig. 5 muestra el ensayo fluorescente en presencia de dopamina, un sustrato natural de COMT. Se alcanzaron mesetas descendientes con concentraciones crecientes de dopamina. Como la dopamina es un sustrato, está metilado así como el sustrato Alexa Fluor® 488-nitrocatecol. La disponibilidad de SAM es limitada (500 nM) así que, a altas concentraciones de dopamina, el sustrato no puede metilarse ya completamente.

La Fig. 6 muestra las curvas de dosis-respuesta para un sustrato con concentraciones baja (500 nM) y alta (200 μ M) de SAM y para cada concentración de SAM con y sin una preincubación de 1 hora de compuesto y SAM antes de añadir el sustrato Alexa Fluor® 488-nitrocatecol. La preincubación con poco SAM desplaza la curva de dosis-respuesta a una menor CI_{50} debido a que el compuesto consume la SAM. A altas concentraciones de SAM, no hay diferencia entre con y sin preincubación, porque la SAM no es limitante y la curva de dosis-respuesta se desplaza a una mayor CI_{50} en comparación con la baja SAM, porque el compuesto se consume.

La Fig. 7 muestra curvas de dosis-respuesta con concentraciones baja (500 nM) y alta (200 μ M) de SAM de nuevo con y sin preincubación de 1 hora del compuesto con SAM o un compuesto competitivo con SAM. Para un

compuesto competitivo con SAM, actuar con y sin preincubación no afecta a la CI_{50} para cada concentración de SAM, pero con alta concentración de SAM, la CI_{50} se desplaza a valores mayores.

Descripción detallada de la invención

El ensayo de la presente invención está basado en los hallazgos de que un tinte fluorescente acoplado covalentemente con un sustrato de COMT, p.ej. Alexa Fluor® 488 ligado covalentemente con nitrocatecol, muestra una fluorescencia reducida debido al apagamiento intramolecular y que la metilación del sustrato de COMT por COMT en el complejo de sustrato de COMT-tinte fluorescente anula el apagamiento de la fluorescencia, concretamente la metilación del sustrato de COMT en el complejo de sustrato de COMT-tinte fluorescente, conduciendo a una fluorescencia aumentada en comparación con el complejo no metilado.

El término "COMT" se usa en la presente memoria para hacer referencia a una secuencia nativa de COMT de cualquier especie animal, p.ej. mamíferos incluyendo seres humanos, y a variantes de COMT (que se definen adicionalmente a continuación). Los polipéptidos de COMT pueden aislarse de una variedad de fuentes, incluyendo tipos de tejido humano o se preparan mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos.

Puede usarse en este ensayo la COMT producida natural o recombinantemente. Una "proteína recombinante" es una proteína aislada, purificada o identificada en virtud de expresión en una célula heteróloga, habiéndose transducido o transfectado dicha célula, de forma transitoria o estable, con un vector de expresión recombinante genomanipulado para activar la expresión de la proteína en la célula hospedadora. La COMT recombinante puede producirse en células procarióticas, p.ej. *E.coli*, en levadura, p.ej. *S.pombe* o en células eucarióticas, p.ej. HEK 293 o células de insecto Sf9. Preferiblemente, se usan las células de insecto Sf9 para una alta expresión de COMT recombinante. La COMT usada en el ensayo puede purificarse. El término "purificarse", como se usa en la presente memoria, hace referencia a polipéptidos que se retiran de su entorno natural o de la fuente de producción recombinante, se aíslan o separan y están al menos un 60 %, y más preferiblemente al menos un 80 %, libres de otros componentes, p.ej. membranas y microsomas, con los que están naturalmente asociados.

"COMT de secuencia nativa" hace referencia a un polipéptido que tiene la misma secuencia aminoacídica que el polipéptido de COMT que aparece en la naturaleza, independientemente de su modo de preparación. Una COMT de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o prepararse mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos. El término "COMT de secuencia nativa" engloba específicamente formas de origen natural truncadas o secretadas, formas variantes de origen natural (p.ej. formas cortadas y empalmadas de forma alternativa) y variantes alélicas de origen natural de COMT. El identificador del polipéptido de COMT humana en la base de datos NCBI es AAA68927 (Seq. Id. No. 1).

El término "variante de COMT" hace referencia a variantes de secuencia aminoacídica de una COMT de secuencia nativa que contienen una o más sustituciones y/o deleciones y/o inserciones aminoacídicas en la secuencia nativa. Las variantes de secuencia aminoacídica tienen generalmente al menos aproximadamente un 75 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 80 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 85 %, aún más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 %, lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia con la secuencia aminoacídica de una COMT de secuencia nativa.

El término "compuesto" se usa en la presente memoria en el contexto de un "compuesto de ensayo" o "compuesto candidato a fármaco" descrito en relación con los ensayos de la presente invención. Como tales, dichos compuestos comprenden compuestos orgánicos o inorgánicos, derivados sintéticamente o de fuentes naturales. Los compuestos incluyen compuestos inorgánicos u orgánicos tales como polinucleótidos, lípidos o análogos hormonales que se caracterizan por pesos moleculares relativamente bajos. Otros compuestos de ensayo orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos que comprenden de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 aminoácidos y polipéptidos mayores que comprenden de aproximadamente 40 a aproximadamente 500 aminoácidos, tales como anticuerpos o conjugados de anticuerpo.

El término "lectura cinética" hace referencia a la diferencia de la señal fluorescente medida en ciertos dos puntos temporales en la parte lineal de una reacción enzimática. Se realiza una medida al inicio de la reacción enzimática (punto de partida) y se efectúa una segunda lectura después de un tiempo de incubación (punto final). La señal final se calcula entonces en ufr/min como $(ufr \text{ (punto final)} - ufr \text{ (punto de partida)}) / \text{tiempo de incubación}$. (ufr : unidades de fluorescencia relativa).

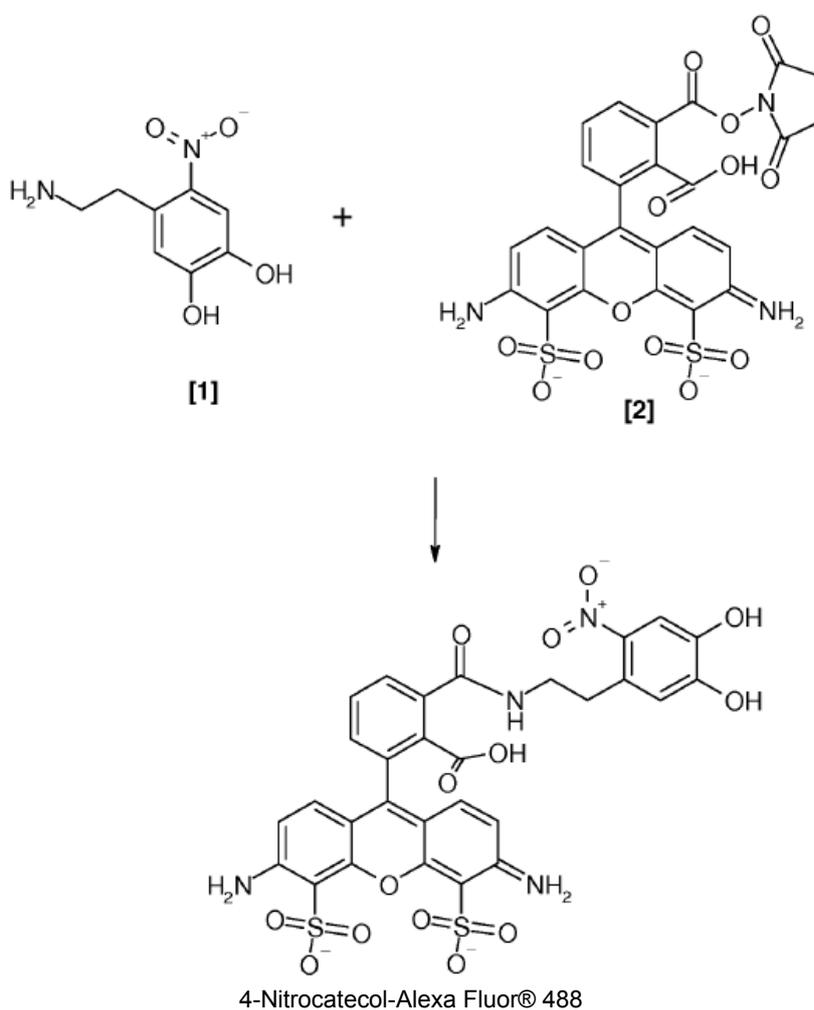
El procedimiento de la presente invención puede emplearse para identificar compuestos que inhiben la enzima catecol O-metiltransferasa (COMT). Por tanto, los inhibidores de COMT identificados mediante el procedimiento de la presente invención pueden usarse en procedimientos para el tratamiento, prevención o control de dolencias en que desempeña un papel la desactivación de catecolaminas extraneuronales por COMT, por ejemplo, en la prevención o el control de depresiones. En este caso, pueden usarse los compuestos de la invención como compuestos individuales o en combinación con otras sustancias terapéuticamente activas que influyen favorablemente en el curso de la dolencia. Los compuestos de la invención pueden usarse también como comedición con otras sustancias terapéuticamente activas.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para determinar la actividad de COMT en muestras de tejido de animales que se han tratado con un compuesto de ensayo. Por ejemplo, el ensayo es adecuado para determinar la actividad de COMT en muestras de cerebro y tejido hepático de animales, p.ej. ratones y ratas, que se han tratado con un compuesto de ensayo (modulador de COMT).

Parte experimental

Síntesis de 4-nitrocatecol - Alexa Fluor® 488

Se mezcló una solución de aminoetilnitropirocatecol 10 mM [1] en DMSO que contenía 1 % de trietilamina con una solución de éster succinimidilo del ácido carboxílico Alexa Fluor® 488 10 mM [2] (Invitrogen Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008) en DMSO con 1 % de trietilamina a un cociente estequiométrico 1:1. Se mezcló suavemente la mezcla de reacción durante una noche a temperatura ambiente y se purificó en HPLC en fase inversa Äkta Explorer 100. Se liofilizó el producto y se resuspendió en DMSO.



20 Protocolo de ensayo de fluorescencia

Se usaron los siguientes protocolo de ensayo, reactivos y materiales en los ejemplos de la presente invención. Se describen los resultados de los ejemplos en las figuras 1-7.

25 Placas de microvaloración:

Placa de microvaloración de 384 pocillos Corning negras con fondo transparente plano, sin superficie de unión, de poliestireno (ref. 3655)

30 Soluciones madre de reactivo y tampón

ES 2 548 902 T3

- Soluciones madre de tampón:
 - tampón fosfato M a pH 7,6 (Na_2HPO_4 Fluka 71644, NaH_2PO_4 Merck 6346.0500) almacenado a 4 °C
 - MgCl_2 580 mM (Merck 1.0833.0250), almacenado a TA
 - CaCl_2 1 mM almacenado a 4 °C
 - DTT 65 mM (Sigma D-0632), almacenado a -20 °C
- COMT humana recombinante: preparada en el laboratorio, almacenada a -80 °C
- 4-nitrocatecol-Alexa Fluor 488: preparado en el laboratorio, 1,3 mM en DMSO, almacenado a TA en la oscuridad
- S-adenosilmetionina: 10 mM en H_2O (Sigma-Aldrich A2804), almacenada a -20 °C

Soluciones de reactivo y tampón

- Tampón de ensayo (concentraciones finales):
 - tampón fosfato 40 mM, pH 7,6
 - MgCl_2 2,88 mM
 - DTT 0,9 mM
 - CaCl_2 0,25 mM
- Diluciones de compuesto: diluciones en 100 % de DMSO (Sigma 41640), concentración de ensayo final 6,25 % de DMSO
- COMT humana rec: 80 nM en tampón de ensayo, concentración de ensayo final 25 nM
- 4-nitrocatecol-Alexa Fluor® 488: 320 nM en tampón de ensayo, concentración de ensayo final 200 nM
- S-adenosilmetionina: 800 nM en tampón de ensayo, concentración de ensayo final 500 nM.

Procedimiento de ensayo

- 10 μl de COMTh (COMT humana)
- 2 μl de compuesto de ensayo
- 1 min en agitador
- 20 μl de mezcla de sustrato-SAM
- 5 min en agitador

Lectura: medida cinética en placa: lector Vision™ (exc. 475(40) nm, em. 535(45) nm, intensidad 7,5 %, tiempo de exposición 1 s.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Procedimiento para la identificación de moduladores de catecol O-metiltransferasa
- <130> 26600 WO
- <150> EP10170957.4
- <151> 27-07-2010
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 271
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 548 902 T3

Met Pro Glu Ala Pro Pro Leu Leu Leu Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Arg His Trp Gly Trp Gly
20 25 30

Leu Cys Leu Ile Gly Trp Asn Glu Phe Ile Leu Gln Pro Ile His Asn
35 40 45

Leu Leu Met Gly Asp Thr Lys Glu Gln Arg Ile Leu Asn His Val Leu
50 55 60

Gln His Ala Glu Pro Gly Asn Ala Gln Ser Val Leu Glu Ala Ile Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Cys Glu Gln Lys Glu Trp Ala Met Asn Val Gly Asp Lys Lys
85 90 95

Gly Lys Ile Val Asp Ala Val Ile Gln Glu His Gln Pro Ser Val Leu
100 105 110

Leu Glu Leu Gly Ala Tyr Cys Gly Tyr Ser Ala Val Arg Met Ala Arg
115 120 125

Leu Leu Ser Pro Gly Ala Arg Leu Ile Thr Ile Glu Ile Asn Pro Asp
130 135 140

Cys Ala Ala Ile Thr Gln Arg Met Val Asp Phe Ala Gly Val Lys Asp
145 150 155 160

ES 2 548 902 T3

Lys Val Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gln Asp Ile Ile Pro Gln Leu
 165 170 175

Lys Lys Lys Tyr Asp Val Asp Thr Leu Asp Met Val Phe Leu Asp His
 180 185 190

Trp Lys Asp Arg Tyr Leu Pro Asp Thr Leu Leu Leu Glu Glu Cys Gly
 195 200 205

Leu Leu Arg Lys Gly Thr Val Leu Leu Ala Asp Asn Val Ile Cys Pro
 210 215 220

Gly Ala Pro Asp Phe Leu Ala His Val Arg Gly Ser Ser Cys Phe Glu
 225 230 235 240

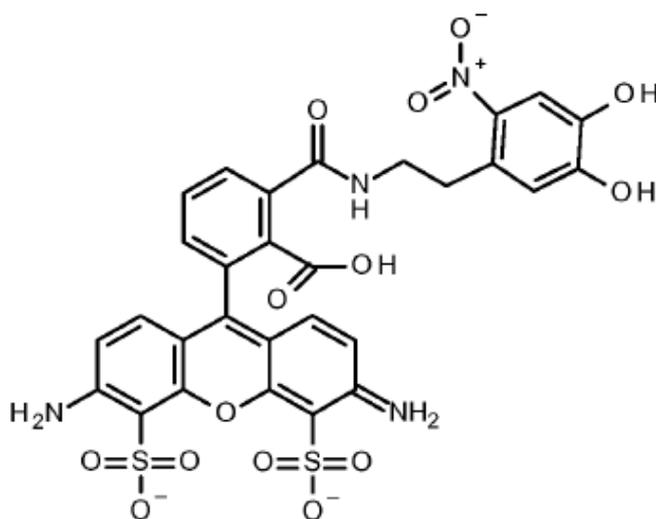
Cys Thr His Tyr Gln Ser Phe Leu Glu Tyr Arg Glu Val Val Asp Gly
 245 250 255

Leu Glu Lys Ala Ile Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro
 260 265 270

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la identificación de un modulador de la actividad de la enzima catecol O-metiltransferasa (COMT) que comprende las etapas de:

- a) proporcionar 4-nitrocatecol ligado covalentemente con Alexa Fluor 488 que tiene la fórmula I,
- b) poner en contacto la molécula de la etapa a) con una enzima catecol O-metiltransferasa (COMT), S-adenosilmetionina (SAM) y un compuesto candidato y
- c) medir la lectura de fluorescencia de la mezcla de la etapa b), en el que una lectura de fluorescencia alterada en presencia del compuesto candidato en comparación con un blanco es indicativa de un modulador de enzima catecol O-metiltransferasa (COMT).



(I).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento es un procedimiento para la identificación de un inhibidor de COMT y una lectura de fluorescencia reducida en la etapa c) en comparación con un blanco es indicativa de un inhibidor de COMT.

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la lectura de fluorescencia en la etapa c) es una lectura cinética.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la COMT es COMT humana.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento es un procedimiento de cribado de alto rendimiento.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el procedimiento se efectúa en una placa de microvaloración.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración final de COMT es de aproximadamente 25 nM.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración final del sustrato de COMT es de aproximadamente 200 nM.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración final de SAM es de aproximadamente 500 nM.

10. Un procedimiento para la identificación de un sustrato de una enzima catecol O-metiltransferasa (COMT) que comprende las etapas de:

- a) proporcionar 4-nitrocatecol ligado covalentemente con Alexa Fluor 488 que tiene la fórmula I y S-adenosilmetionina (SAM),
- b) poner en contacto la mezcla de la etapa a) con diferentes concentraciones de un compuesto candidato,
- c) poner en contacto las mezclas de la etapa b) con una enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) y

- d) medir la lectura de fluorescencia cinética de las mezclas de la etapa c), en el que una meseta de lectura de fluorescencia descendente en función de una concentración creciente del compuesto candidato es indicativa de un sustrato de la enzima catecol O-metiltransferasa (COMT).

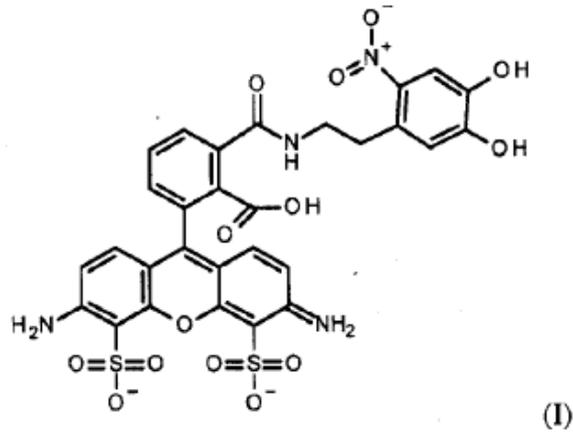


Fig. 1

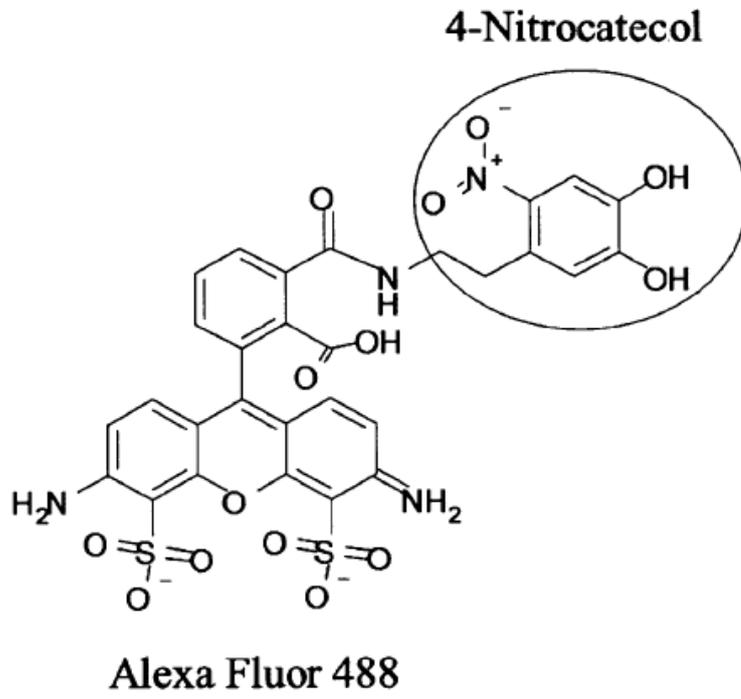


Fig. 2

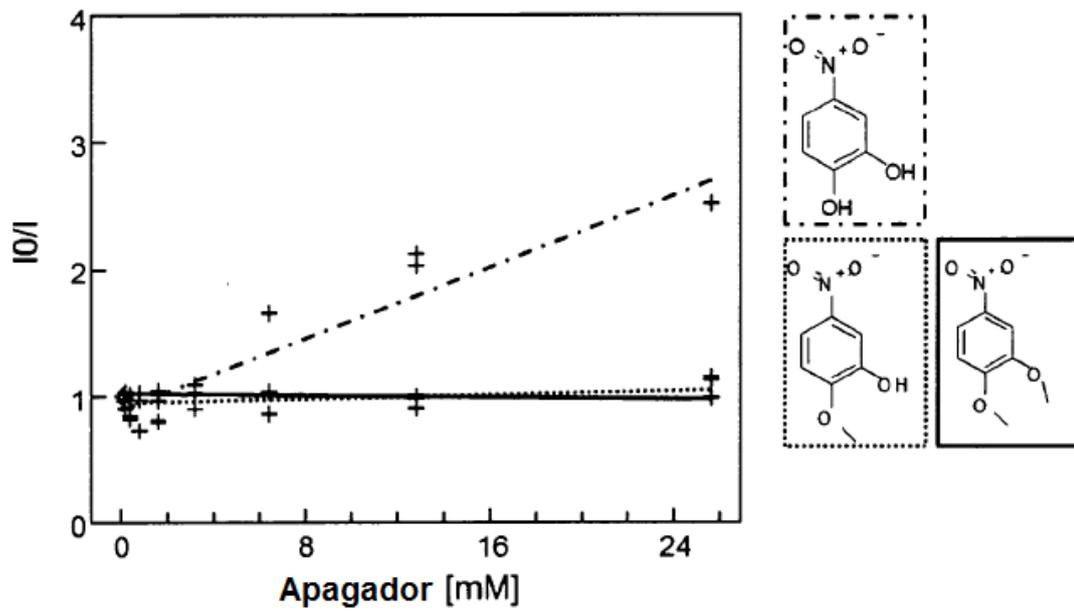


Fig. 3

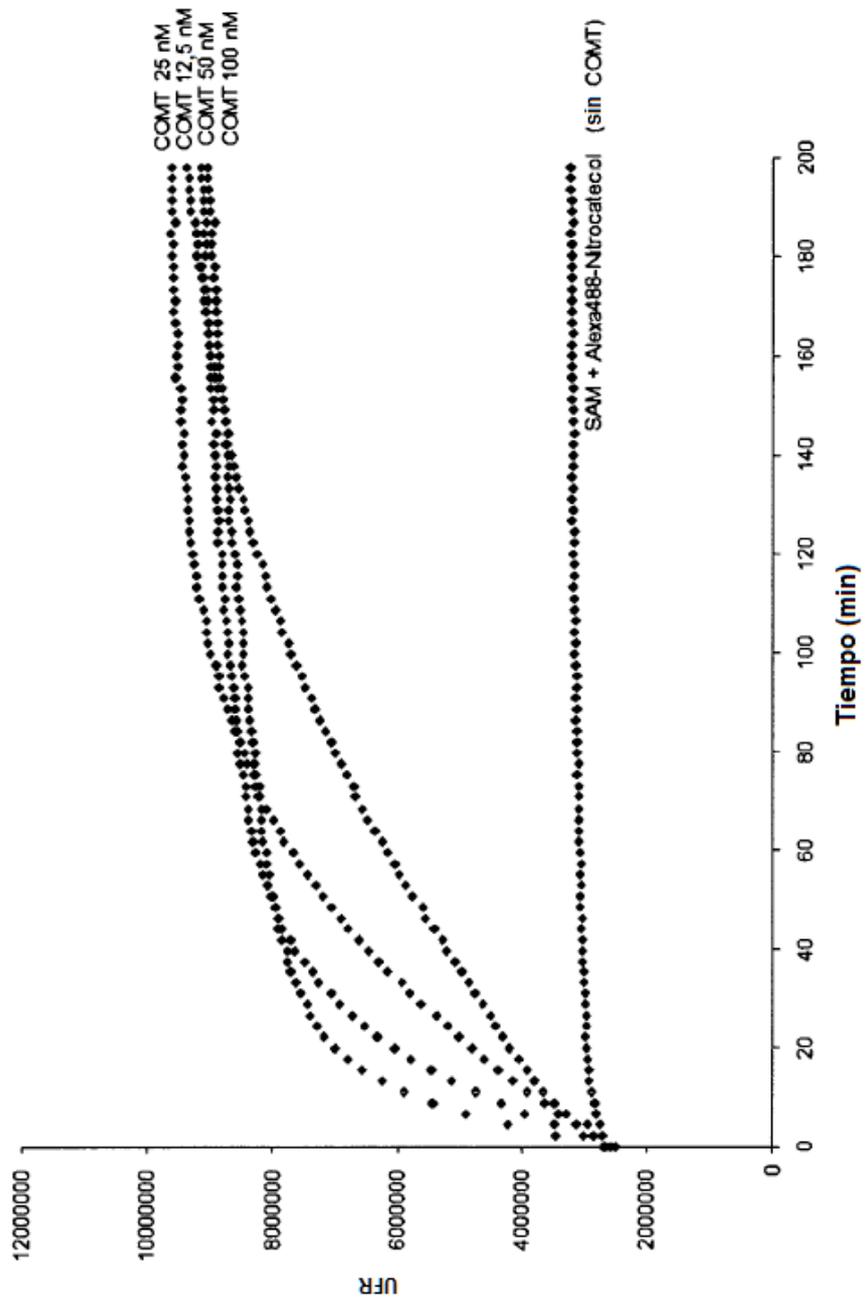


Fig. 4a

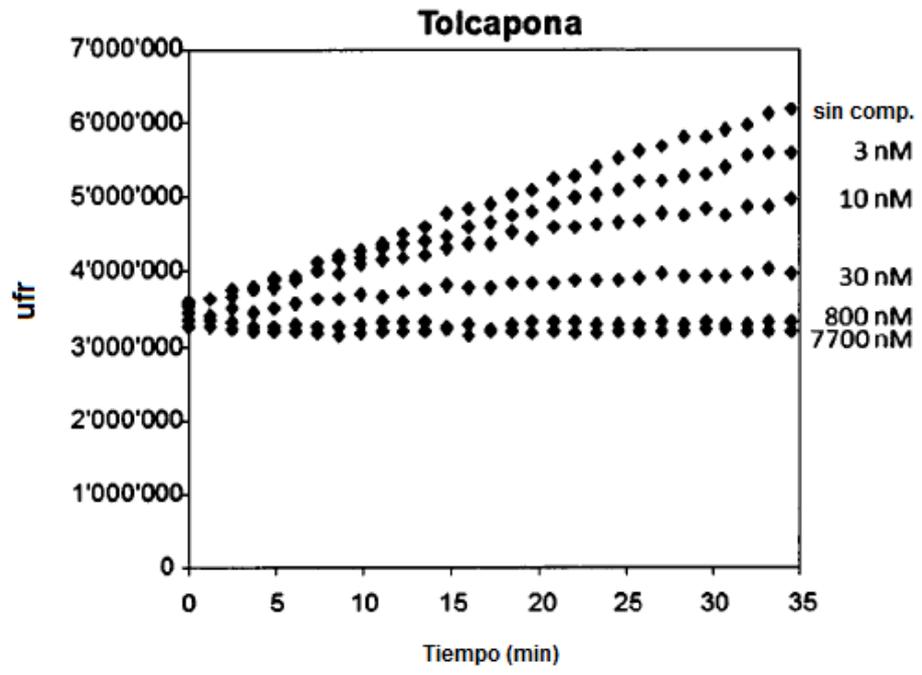


Fig. 4b

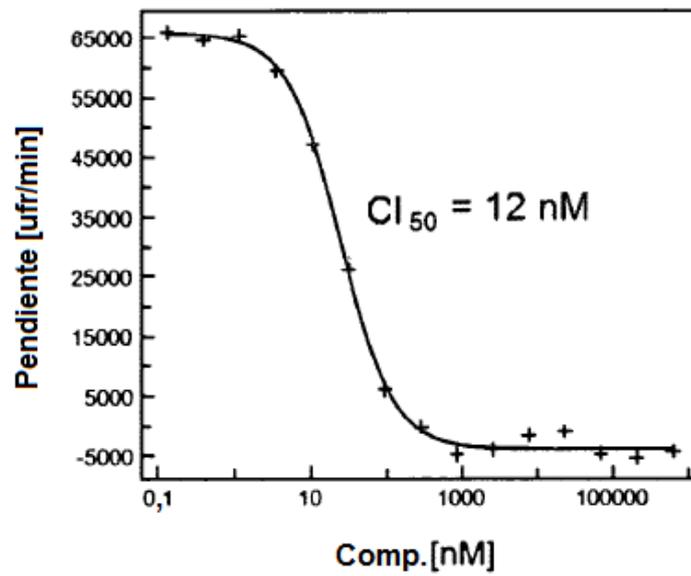


Fig. 5

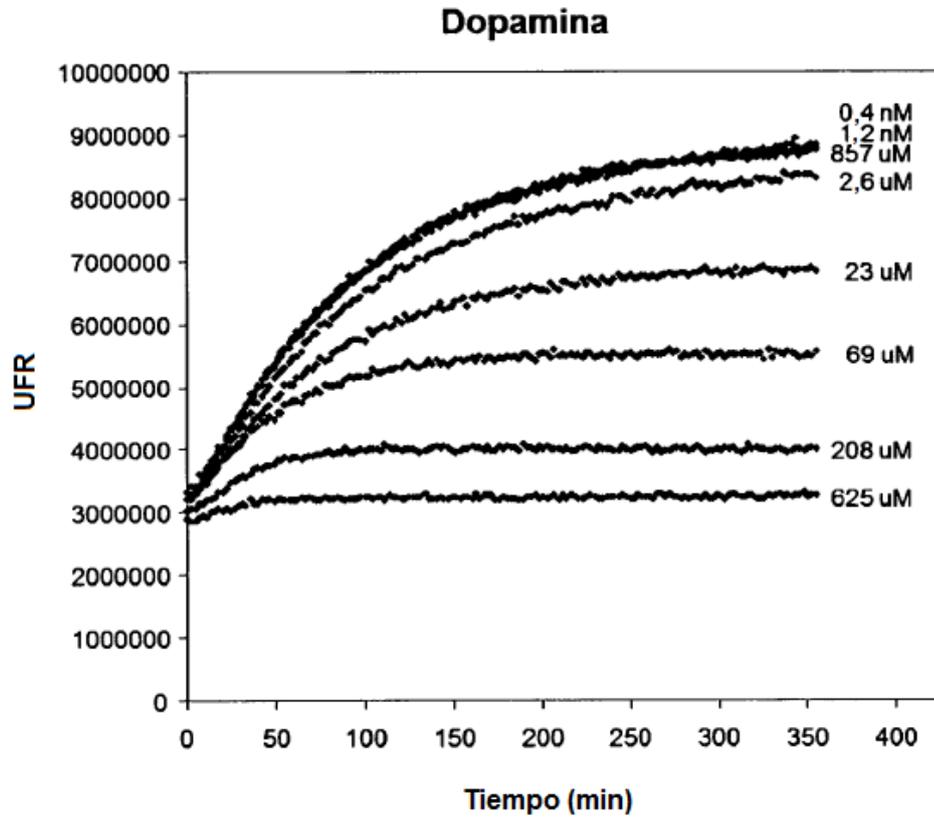


Fig. 6

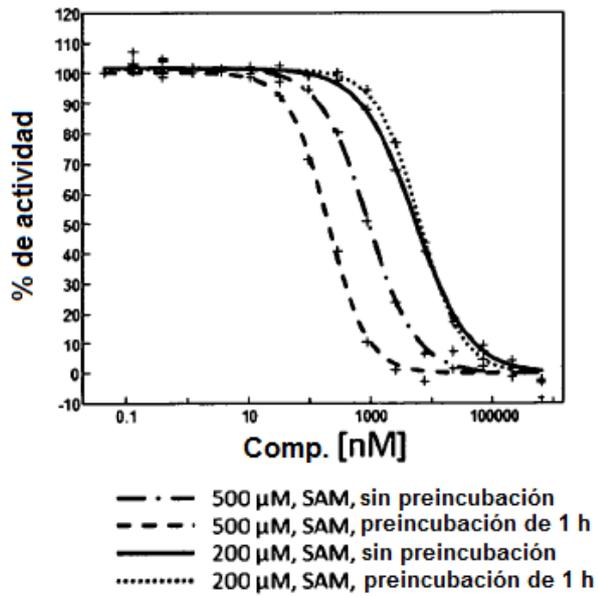


Fig. 7

