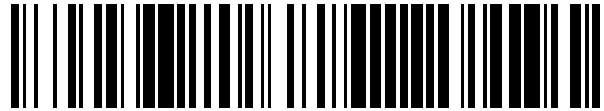


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 087**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013** **E 13703836 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015** **EP 2820416**

54 Título: **Método para medir la actividad de calcineurina**

30 Prioridad:

27.02.2012 EP 12305231

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

17.03.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (50.0%)
12, Rue de l'Ecole de Médecine
75006 Paris 6, FR y
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(50.0%)

72 Inventor/es:

SANQUER, SYLVIA;
BAROUKI, ROBERT y
HERRY, LAURENCE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 564 087 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 medir la actividad de calcineurina

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica.

10 **Estado de la técnica**

10 El patrón para la prevención de rechazo en pacientes de trasplante consiste en regímenes inmunosupresores que incluyen un inhibidor de la calcineurina tal como ciclosporina (CsA) o tacrolimus (TAC). Sin embargo, después del trasplante es difícil conseguir el equilibrio óptimo entre una inmunosupresión demasiado fuerte o una demasiado débil. Una inmunosupresión inadecuada puede provocar un rechazo al trasplante y, por otro lado, una inmunosupresión excesiva facilita el desarrollo de complicaciones graves tales como infecciones o trastornos linfoproliferativos. La práctica habitual consiste, para los médicos, en establecer el tratamiento con dosis fijas, a continuación en el ajuste de las dosis de fármaco de acuerdo con sus niveles en sangre o, incluso de forma más frecuente, de acuerdo con la aparición bien de un rechazo agudo o bien de un suceso de fármaco adverso. Desafortunadamente, esta estrategia se asocia con un fallo frecuente como se ilustra con el hecho de que de un 30 a un 50 % de los pacientes desarrollan rechazo agudo después del trasplante.

25 Un enfoque farmacodinámico, basado en la medida del efecto de los fármacos en sus dianas celulares, se ha desarrollado con el objetivo de reducir la incidencia y gravedad de rechazo agudo. Este enfoque farmacodinámico se basa en la medida de la actividad de la calcineurina (CN), una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina. La CN es parte de la familia de la enzima serina/treonina fosfatasa que incluye PP1, PP2A, PP2B o calcineurina y PP2C (Ingebritsen y Cohen, 1983). Los ensayos actuales sobre calcineurina se realizan generalmente en extractos celulares obtenidos a partir de células mononucleares sanguíneas (PBMC, células mononucleares de sangre periférica) de pacientes de trasplante (Fruman *et al.*, 1996; Sanquer *et al.*, 2004; Fukudo *et al.*, 2005). Estos ensayos se basan en la desfosforilación de un sustrato de calcineurina fosforilado en presencia de calcio y calmodulina que son esenciales para la actividad de la enzima (Pallen y Wang, 1983). La adición de ácido okadaico a una concentración de 500 nM (que inhibe todas las fosfatasas excepto CN) evitar la reactividad cruzada potencial para el sustrato fosforilado.

35 Un sustrato especialmente preferente es el péptido fosforilado RII (P-RII), derivado de la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA, Donella-Deana *et al.*, 1994). Este péptido se caracteriza por la siguiente secuencia: DLDVIPGRFDRRVpSVA AE (SEC ID N°: 1). En los diferentes ensayos descritos hasta ahora, el péptido P-RII se puede etiquetar o no, y el etiquetado se realiza bien con un radioelemento (³²P) o un flúoroforo.

40 La mayoría de los métodos usados para medir la actividad de la CN fosfatasa se basan en la detección del fosfato libre liberado durante la reacción enzimática. Estos métodos usan medidas de radiometría en el caso del péptido P-RII etiquetado con ³²P (Fruman *et al.*, 1996; Koefoed-Nielsen *et al.*, 2004). Ellos usan medidas de espectrofotometría en el caso del péptido R-RII sin etiquetar. Este último requiere la puesta en práctica de una segunda reacción con verde de malaquita para colorear el fosfato inorgánico libre (Sellar *et al.*, 2006).

45 Se han desarrollado muchos métodos específicos basados en la medida directa de la formación del péptido RII desfosforilado (DP-RII) con CN. Estos métodos se basaban originalmente en cromatografía líquida acoplada a detección de UV (Enz *et al.*, 1994; Sanquer *et al.*, 2004). Estos métodos se desarrollaron para el péptido P-RII sin etiquetar. Más recientemente, se describió un método de fluorimetría para medir la actividad de CN mediante el uso del péptido P-RII etiquetado con un flúoroforo y separación del producto de péptido desfosforilado con óxido de titanio (Roberts *et al.*, 2008).

50 El documento WO2011/085176 describe un método basado en FRET para determinar la actividad de fosfatasa actividad de la calcineurina.

55 **Objeto de la invención**

La invención surge de la observación de que algunas muestras biológicas, tales como extractos de células mononucleares de sangre periférica, contienen una actividad de quinasa que puede competir con la actividad de fosfatasa de la calcineurina. Esta actividad de quinasa, que nunca antes se informó en los métodos para medir la actividad de calcineurina de la técnica anterior, se debería inhibir para obtener resultados más específicos.

60 De hecho, los inventores han observado que la especificidad del ensayo de actividad de calcineurina puede aumentar de forma significativa mediante la adición de al menos un inhibidor de quinasa a la mezcla de reacción.

65 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica que comprende las etapas de:

- proporcionar una mezcla de reacción que comprende un sustrato, al menos un inhibidor de fosfatasa y al menos un inhibidor de quinasa;
 - incubar dicha muestra biológica con la mezcla de reacción en condiciones adecuadas para la actividad de calcineurina;
- 5 - medir la cantidad de sustrato desfosforilado.

La presente invención también se refiere a un kit para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica que comprende un sustrato, al menos un inhibidor de fosfatasa y al menos un inhibidor de quinasa.

- 10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de inhibidor de quinasa en un método para medir la actividad de calcineurina.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para predecir el resultado terapéutico de un paciente de trasplante que comprende medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica obtenida de dicho paciente

15 como se ha descrito anteriormente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica que comprende las etapas de:

20

- proporcionar una mezcla de reacción que comprende un sustrato, al menos un inhibidor de fosfatasa y al menos un inhibidor de quinasa;
 - incubar dicha muestra biológica con la mezcla de reacción en condiciones adecuadas para la actividad de calcineurina;
- 25 - medir la cantidad de sustrato desfosforilado.

Como se usa en el presente documento el término "calcineurina", se usa indistintamente con "CaN", "fosfatasa 2B" o "PP-2B", y se refiere a la proteína fosfatasa de Serina /Treonina dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Esta proteína cataliza la retirada de un grupo fosfato de su sustrato por hidrólisis de monoésteres de ácido fosfórico en un ión fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre. De forma más específica, la calcineurina retira un grupo fosfato de un resto de serina fosforilada (fosfo-serina, o "pS") o un resto de treonina fosforilada (fosfo-treonina, o "pT").

30

La calcineurina es un heterodímero que consiste en una subunidad A catalítica (57-61 kDa) y una subunidad B reguladora (19 kDa). La subunidad A catalítica está formada por cuatro dominios funcionales: el núcleo catalítico con homología de secuencias para PP-1 y PP-2A; sitios de unión tanto para calmodulina como para la subunidad reguladora de CaN, y dominio autoinhibidor C-terminal.

35

Como se usa en el presente documento, el término "sustrato" o "sustrato de calcineurina" se refiere a una fosfoproteína o fosfopéptido que se puede hidrolizar por calcineurina. Por lo tanto, se refiere a una fosfoproteína o fosfopéptido que tiene al menos un resto de fosfoserina y/o fosfotreonina.

40

Se prefiere que los restos de aminoácido que se describen en el presente documento estén en la forma isomérica "L". Sin embargo, algunos restos en la forma isomérica "D" se pueden sustituir para cualquier resto de L-aminoácido, siempre y cuando se mantenga la capacidad del sustrato para ser hidrolizado por la calcineurina. NH_3 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. $COOH$ se refiere al grupo carboxi libre presente en extremo carboxi de un polipéptido.

45

De acuerdo con la nomenclatura convencional de polipéptidos, J. Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969), en la siguiente Tabla de Correspondencias se muestran algunas abreviaturas para restos de aminoácido:

50

Código de una letra	Código de tres letras	Aminoácido
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina

Código de una letra	Código de tres letras	Aminoácido
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

En el presente documento, todas las secuencias de restos de aminoácido ase representan con fórmulas cuya orientación a la izquierda y la derecha está en la dirección convencional del extremo amino-terminal con respecto al extremo carboxi-terminal.

5 El término "pX", o "fosfoX", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto de aminoácido X fosforilado. Por lo general, el sustrato de acuerdo con la invención comprende al menos un resto de fosfoserina o fosfotreonina.

10 Algunos estratos preferentes de acuerdo con la invención son sustratos específicos de calcineurina. En otros términos, el sustrato de acuerdo con la invención por lo general se reconoce y se hidroliza con calcineurina de forma más eficaz que con otros tipos de fosfatasas.

15 Por lo general, el sustrato de acuerdo con la invención se puede seleccionar entre el grupo que consiste en los fosfopéptidos que se describen en la Tabla I de Donella-Deana *et al.* (Donella-Deana *et al.*, 1994, Eur J Biochem 219, 109-117).

20 Por lo general, un sustrato preferente es un fragmento de la subunidad reguladora de la proteína quinasa de tipo II dependiente de cAMP (RII). En una realización más preferente, el sustrato es DLDVPIGRFDRRVpSVAE (SEC ID N°:1).

El sustrato de la invención se puede obtener con cualquier método adecuado en la técnica: puede ser una fosfoproteína recombinante o fragmento de la misma, una fosfoproteína purificada o fragmento de la misma, o un fosfopéptido sintético.

25 En una realización de la intervención, el sustrato es un fosfopéptido sintético.

El sustrato de acuerdo con la invención puede estar etiquetado, o sin etiquetar.

30 La detección del producto de reacción de desfosforilación se realizará a continuación con diferentes medios, de acuerdo con el tipo de sustrato que se use (véase a continuación).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones adecuadas para la actividad de calcineurina" tiene un significado general en la técnica y se refiere a las condiciones fisicoquímicas globales en que se produce la reacción de desfosforilación catalizada por calcineurina.

De acuerdo con una realización, la reacción se realiza a una temperatura comprendida entre 20 °C y 40 °C, preferentemente entre 25 °C y 38 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C o 37 °C.

40 De acuerdo con una realización, la reacción se realiza durante un periodo de tiempo comprendido entre 5 minutos y 60 minutos, preferentemente entre 10 y 45 minutos, entre 15 y 40 minutos, incluso más preferentemente aproximadamente 30 minutos.

45 En una realización de la invención, la reacción se realiza por incubación de la muestra biológica y la mezcla de reacción a 37 °C durante 30 minutos.

Por lo general, la reacción se puede detener después de un periodo tiempo determinado previamente mediante colocación del tubo de reacción a +4 °C y adición de ácido tricloroacético (TCA).

De acuerdo con la invención, la desfosforilación del sustrato con calcineurina se realiza en una mezcla de reacción. Como se usa en el presente documento, la expresión "mezcla de reacción" o "mezcla de reacción de ensayo" tiene su significado general en la técnica. Y se refiere a la solución en que se realiza la reacción enzimática a cuantificar.

5 Por lo general, la mezcla de reacción de ensayo de acuerdo con la invención es una solución acuosa que comprende todos los reactivos necesarios para que se produzca la reacción enzimática. Por lo general, la mezcla de reacción comprende agua, un tampón de pH y sales.

Algunos tampones de pH adecuados de acuerdo con la invención son tampones sin fosfato, tales como Tris-HCl.

10 Por lo general, el pH de la mezcla de reacción está comprendido entre 6,0 y 8,0, preferentemente alrededor de 7,0.

En una realización, el tampón de reacción comprende Ca^{2+} y calmodulina. De hecho, la actividad de fosfatasa de la calcineurina nativa depende de la presencia de Ca^{2+} y calmodulina.

15 Por lo general, la mezcla de reacción de ensayo puede comprender una concentración final de calmodulina comprendida entre 0,01 y 0,06 unidades, de forma preferente aproximadamente 0,03 unidades.

20 Por lo general, la mezcla de reacción de ensayo comprende una concentración final de Ca^{2+} comprendida entre 30 μM y 90 μM , de forma preferente aproximadamente 50 μM .

En una realización de la invención, se añaden inhibidores de proteasa a la muestra biológica y/o a la mezcla de reacción. De hecho, la presencia de tales inhibidores evita la degradación de la calcineurina presente en la muestra biológica mediante proteasas endógenas. Algunos inhibidores de proteasa adecuados incluyen, pero no se limitan a

25 PMSF, EDTA, EGTA, aprotinina, leupeptina, pepstatina y mezclas de los mismos.

La reacción de acuerdo con la invención se realiza en presencia de al menos un inhibidor de fosfatasa. Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de fosfatasa" tiene su significado general en la técnica. Se refiere a un compuesto que inhibe al menos una fosfatasa. Por lo general, el inhibidor de fosfatasa de acuerdo con la invención no es un inhibidor de calcineurina a la concentración seleccionada.

30

Algunos inhibidores de fosfatasa adecuados de acuerdo con la invención incluyen inhibidores específicos de fosfatasa e inhibidores de amplio espectro.

35 Por lo general, el inhibidor de fosfatasa de acuerdo con la invención es ácido okadaico. El ácido okadaico (9,10-Desepitio-9,10-dideshidroacantifolicina) es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP-1; Cl_{50} = 20-100 nM), proteína fosfatasa 2A (PP-2A; Cl_{50} = 0,1-1 nM) y proteína fosfatasa 2B (PP-2B; Cl_{50} > 5000 nM).

40 Por lo general, el ácido okadaico se usa a una concentración final quedaría de 100 a 1000 nM, de forma preferente aproximadamente 500 nM.

Otro inhibidor de fosfatasa adecuado es la microcistina-LR.

45 La reacción de acuerdo con la presente invención se realiza en presencia de al menos un inhibidor de quinasa. De hecho, los inventores han demostrado, por primera vez, que algunas muestras biológicas contenían una actividad de quinasa que compite con la actividad de la calcineurina fosfatasa, lo que conducía pérdida de especificidad de los ensayos descritos anteriormente.

50 Por lo tanto, la realización del ensayo de actividad de calcineurina en presencia de al menos un inhibidor de quinasa conduce a un aumento de la especificidad del método.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibidor de quinasa" se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de al menos una quinasa.

55 De acuerdo con una realización de la invención, el inhibidor de quinasa es un inhibidor selectivo de la Proteína Quinasa A (PKA).

La selección de inhibidores de PKA apropiados entra dentro de la capacidad de la persona experta en la materia.

60 Algunos inhibidores de PKA selectivos adecuados de acuerdo con la invención pueden ser 1) análogos estructurales de cAMP, la familia de los Rp-cAMP, que son inhibidores competitivos del sitio de unión a cAMP, 2) inhibidores endógenos de la actividad de PKA: el péptido inhibidor de la proteína quinasa (Murray, 2008) y 3) ARN de silenciamiento dirigido a al menos las dos isoformas (α y β) de la subunidad catalítica de PKA (Murray, 2008; Dumaz *et al.*, 2003; Rudolph *et al.*, 2007; Monaghan *et al.*, 2008). Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a Rp-adenosin 3',5'-monofosforotioato cíclico (Wang *et al.*, 1991); Rp-8-Bromoadenosin 3',5'-Monofosforotioato cíclico (Gjertsen *et al.*, 1995); Rp-8-bromo-2'-O-monobutiriladenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico (Ruiz-Velasco *et al.*,

65

1998); Rp-8-cloroadenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico (Yokozaki *et al.*, 1992); Rp-8-(4-clorofeniltio)adenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico (Weisskupf *et al.*, 1994); Rp-8-hexilaminoadenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico (Gjertsen *et al.*, 1995); Rp-8-hidroxiadenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico (Gjertsen *et al.*, 1995); los Rp-8-PIP-cAMP (Ogreid *et al.*, 1994); fragmento 14-22 miristoilado inhibidor de PKA (Zhang *et al.*, 2004); fragmento 6-22 de amida inhibidor de PKA (Glass *et al.*, 1989); fragmento de amida 5-22 inhibidor de PKA (Cheng *et al.*, 1986); fragmento 5-24 inhibidor de proteína quinasa dependiente de cAMP (Cheng *et al.*, 1986).

Dentro de la capacidad de la persona experta entra la determinación de la concentración óptima del inhibidor de PKA en la mezcla de reacción final.

En una realización con el inhibidor de PKA es el Rp-adenosin 3'-5' monofosforotioato cíclico, que se puede adquirir en Sigma-Aldrich con la referencia A165.

Por lo general, el Rp-adenosin 3'-5' monofosforotioato cíclico se puede usar a una concentración final de 10 μ M.

De acuerdo con otra realización de la invención, el inhibidor de quinasa es un inhibidor de quinasa no selectivo. Algunos inhibidores de quinasa no selectivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, H89 (Murray, 2008); KT5720 (Murray, 2008); queleritrina (Freemerman *et al.*, 1996); H7 (Qiu *et al.*, 2010); H8 (Hidaka *et al.*, 1984); inhibidor de proteína quinasa de corazón porcino.

Por lo general, el inhibidor de quinasa no selectivo puede ser H89, que se puede adquirir en Sigma-Aldrich con la referencia B1427.

H89 se puede usar a una concentración final de 20 μ M.

Además, en otra realización, la mezcla de reacción de ensayo comprende varios inhibidores de quinasa.

Después de realizar la desfosforilación del sustrato por la calcineurina presente en la muestra biológica, la cantidad de sustrato desfosforilado se cuantifica, ya sea de forma directa o indirecta. Los resultados se pueden expresar como una medida absoluta (tal como pmol/mg de proteína/min), o en unidades arbitrarias.

Esta etapa de "medir la cantidad de sustrato desfosforilado" se puede realizar ya sea de forma indirecta (por medida de la cantidad de fosfato libre liberado por la reacción) o de forma directa (por medida del sustrato desfosforilado en sí mismo).

Se puede usar cualquier método para medir la cantidad de sustrato desfosforilado.

Algunos métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a:

- medidas de radiometría en el caso de un sustrato etiquetado con 32 P (Fruman *et al.*, 1996; Koefoed-Nielsen *et al.*, 2004);
- medidas de fluorescencia en el caso de un sustrato etiquetado con un fluoróforo (Roberts *et al.*, 2008);
- medidas de espectrofotometría en el caso de sustrato sin etiquetar (Sellar *et al.*, 2006).

En una realización, la cantidad de fosfato libre se mide usando un ensayo de colorimetría y espectrofotometría (Sellar *et al.*, 2006). Por ejemplo, el kit de ensayo de actividad celular de calcineurina comercializado por Calbiochem con el número de catálogo 207007 depende de la detección de fosfato libre basándose en el ensayo de verde de malaquita.

En las técnicas de detección descritas anteriormente, es necesario separar de forma física:

- el fosfato libre del sustrato fosforilado sin metabolizar, por ejemplo, con columnas de cromatografía con resina de intercambio catiónico Dowex (véase Fruman *et al.*, 1996);
- o el péptido desfosforilado del sustrato fosforilado sin metabolizar, por ejemplo usando resinas de óxido de titanio (véase Roberts *et al.*, 2008) o usando cromatografía líquida (véase Enz *et al.*, 1994) antes de la etapa de medida en sí misma.

En otra realización, la cantidad de sustrato desfosforilado se mide mediante cromatografía líquida. Algunos métodos de cromatografía adecuados se describen por ejemplo en Enz *et al.* (1994).

El presente documento describe un método para cuantificar de forma simultánea péptidos fosforilados y no fosforilados mediante HPLC acoplada a detección de UV. Los experimentos desvelados en el presente documento se realizaron usando calcineurina purificada. Sanquer *et al.*, (2004) también describen un método de detección basado en HPLC acoplada a detección de UV para medir la actividad de calcineurina en muestras de PBMC obtenidas de pacientes de trasplante.

Además, en otra realización, la cantidad de sustrato desfosforilado se mide mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). De forma ventajosa, este método de detección aumenta adicionalmente la sensibilidad y la especificidad del ensayo.

5 En una realización preferente, la etapa de medir la cantidad de sustrato desfosforilado se realiza mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) como se describe en los Ejemplos que siguen a continuación.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra biológica de la que se sospecha que contiene actividad de calcineurina.

Por lo general, la muestra biológica puede ser una muestra de sangre, una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), una muestra de fluido cerebroespinal o extractos celulares preparados a partir de cultivos celulares.

15 En una realización preferente, la muestra biológica es una muestra de PBMC.

La muestra biológica de acuerdo con la invención se puede obtener en el momento o se puede mantener a +4 °C o +20 °C antes del análisis.

20 En una realización preferente, la muestra biológica se usa en un máximo de 7 días desde su recogida, preferentemente en 4, 3, 2 o 1 días desde la recogida cuando se mantiene a +4 °C o en el día de la recogida cuando se mantiene a +20 °C.

25 Por lo general, un "paciente" se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, y un primate. Preferentemente, un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

Por lo general, un paciente de acuerdo con la invención es un paciente inmunosuprimido, tal como un paciente que ha recibido un trasplante de órganos o células madre.

30 La presente invención también se refiere a un kit para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica que comprende un sustrato, al menos un inhibidor de fosfatasa y al menos un inhibidor de quinasa.

35 En el kit de acuerdo con la invención, el sustrato, el inhibidor de fosfatasa y el inhibidor de quinasa son como se han descrito anteriormente.

El kit de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente:

- 40
- calcineurina recombinante, a usar como control positivo;
 - controles de calidad
 - calibradores
 - tampón de ensayo
 - un folleto que explica que la reacción se debería realizar en presencia de al menos un inhibidor de quinasa para resultados óptimos;

45

 - y/o medios para detectar la cantidad de fosfato libre liberado por la reacción, tal como verde de malaquita (para detección mediante espectrofotometría).
 - y/o un patrón interno (para detección mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).

50 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de inhibidor de quinasa en un método para medir la actividad de calcineurina.

El método para cuantificar la actividad de calcineurina en una muestra biológica tiene muchas aplicaciones.

55 Por ejemplo, el método se puede usar para controlar la actividad de calcineurina en una muestra biológica obtenida de un paciente al que se le ha administrado un tratamiento inmunosupresor.

Por lo general, a los pacientes que reciben un trasplante de órganos se les proporcionan tratamientos inmunosupresores tales como tacrolimus o ciclosporina.

60 Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para predecir el resultado terapéutico de un paciente de trasplante que comprende medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica obtenida de dicho paciente como se ha descrito anteriormente.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "predecir el resultado terapéutico" incluye tanto controlar el nivel de actividad de calcineurina en una muestra biológica de un paciente dado en el tiempo (en una primera y segunda muestras biológicas obtenidas en dos puntos temporales distintos) como comparar el nivel de actividad de

calcineurina en una muestra biológica obtenida de dicho paciente con un valor de referencia. En una realización, el valor de referencia puede ser un valor obtenido a partir de una población que presenta una enfermedad similar para dicho paciente. Como alternativa, el valor de referencia puede ser un valor obtenido a partir de una población sana.

5 Descripción de las figuras

Figura 1: Se realizaron experimentos cinéticos de calcineurina en presencia o ausencia de dos inhibidores de quinasa diferentes. La producción del péptido DP-R11 se cuantificó usando análisis de LC-MS/MS.

10 **Figura 2:** Seguimiento longitudinal de actividades de calcineurina y quinasa en 2 pacientes de trasplante. A, B: Paciente 1; C, D: Paciente 2; A, C: Influencia de H89 en la actividad de calcineurina; B, D: la actividad de quinasa se cuantificó por medio de LC-MS/MS.

15 **Figura 3:** Perfiles cromatográficos de péptido P-R11, péptido DP-R11 y péptido R11 de isótopo estable en extracto de proteína de PBMC. A, B, C: 1 mg/l de péptido R11 en extractos de proteína de PBMC; D, E, F: 1 mg/l de P-R11 en extractos de proteína de PBMC; G, H, I: 1 mg/l de péptido R11 de isótopo estable en extractos de proteína de PBMC; J, K, L: blanco de extractos de proteína de PBMC; A, D, G, J: transición 732,4 > 70,1 (péptido P-R11); B, E, H, K: transición 705,8 > 70,1 (péptido DP-R11); C, F, I, L: transición 708,3 > 70,1 (péptido R11 de isótopo estable).

20 **Figura 4:** Perfiles de supresión de iones para fusión postcolumna de extractos de proteína de PBMC.

Figura 5: Reproducibilidad para calibraciones durante un periodo de 12 días.

25 Ejemplos

Materiales y métodos

Preparación de extractos celulares

30 Las PBMC obtenidas de voluntarios sanos o de pacientes de trasplante se resuspendieron en un tampón que contenía Tris 50 mM, pH = 7,0, EGTA 0,1 mM, ditiotreitól 0,05 mM, Tween 20 al 0,1 %, 0,3 mg/ml de albúmina, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM e inhibidores de proteasa. Estos extractos celulares se sonicaron en hielo, y se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 g a 4 °C. Los sobrenadantes que corresponden principalmente a las fracciones citosólicas se recuperaron y su contenido de proteína se determinó. Estos extractos celulares se pueden almacenar a -80 °C para medida posterior de actividad de CN.

Preparación de péptidos

40 Se prepararon soluciones de reserva del péptido R11, su forma fosforilada y patrón interno (péptido R11 de isótopo estable) a una concentración de 0,5 g/l en tampón Hepes y se almacenaron a -40 °C. Se prepararon calibradores por dilución de las soluciones de reserva en Tris-HCl para proporcionar un intervalo de calibración final de 0,16, 0,32, 0,63, 0,95, 1,58, 4,74 y 7,9 µM.

Ensayo enzimático

50 De uno a 5 µg de proteínas obtenidas a partir de PBMC, preparadas como se ha descrito anteriormente, se usaron para medir la actividad de calcineurina en una mezcla de reacción que contenía ácido okadaico 500 nM, 1 mg/l de patrón interno, H89 20 µM, 8 mg/l de péptido R11 fosforilado y 0,03 unidades de calmodulina en 15 µl de Tris-HCl 50 mM, pH = 7,0. La reacción enzimática se realizó a 37 °C durante 30 min y a continuación, los tubos de reacción se enfriaron en hielo y la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 15 µl de una solución de ácido tricloroacético al 5 %. Después de centrifugación durante 5 minutos a 12.000 g a 4 °C, los sobrenadantes se transfirieron a insertos de vidrio de 200 µl en viales para autoinyector de vidrio de 1,5 ml y se mantuvieron a 4 °C en automuestreador antes de inyección.

Condiciones cromatográficas

60 La LC-MS/MS se realizó usando un sistema de HPLC de la serie 1100 de Agilent conectado a un espectrómetro de masas cuadrupolo en tándem API3000 de Applied Biosystems, manejado en el modo de ión positivo con electronebulización con control de reacción seleccionado (SRM). De forma rutinaria se usó una inyección de 24 µl, y la cromatografía se consiguió con una columna Zorbax 300 Extend-C18 de 4,6 x 100 mm y un tamaño de partícula de 3,5 µm, columna analítica protectora de 4,6 x 12,5 mm de Agilent. El caudal era de 0,2 ml/min. La fase móvil A era acetato amónico 5 mM y ácido fórmico al 0,1 % en agua y la fase móvil B, acetato amónico 5 mM y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. Un gradiente de fase móvil programado se usó durante la realización de 20 min: 0 min, 2 % de B; 10 min, 100 % de B, 15 min, 100 % de B; 15,5 min 2 % de B, 20 min, 2 % de B. Se seleccionaron péptidos iónicos di-cargados tanto para P-R11, DP-R11 como patrón interno como los péptidos ionizados de forma más intensa

después de modo de ionización positiva con electronebulización. El instrumento de MS/MS y los parámetros de recogida de datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1a: Parámetros del instrumento de MS/MS

Tensión de pulverización de iones (V)	5500
Potencial de entrada	10
Temperatura (°C)	50
Cortina de gas	10
Gas nebulizador	8
Gas de colisión	4
Resolución de Q1	unidad
Resolución de Q3	unidad
Tiempo de residencia (ms)	300
Tipo de barrido	SRM
Tensión de pulverización de iones (V)	5500
Potencial de entrada	10
Temperatura (°C)	50
Cortina de gas	10
Gas nebulizador	8
Gas de colisión	4
Resolución de Q1	unidad
Resolución de Q3	unidad
Tiempo de residencia (ms)	300
Tipo de barrido	SRM

5

Tabla 1.b: Parámetros de transiciones

compuesto	m/z Q1	m/z Q3	CE	CXP	DP	FP	tiempo de retención
péptido P-RII (sustrato)	732,4	201,2	70	10	100	400	14,5
	732,4	70,1	90	10	46	320	
péptido DP-RII (producto)	705,8	70,1	95	8	51	370	14,6
	705,8	201,2	59	20	51	370	
patrón interno	708,5	70,1	89	8	96	370	14,6
	708,5	201,2	55	18	96	370	

CE: energía de colisión (eV) CXP: potencial de salida de colisión celular (eV); DP: potencial de desagregación (eV) FP: potencial de enfoque (eV).

Ensayo de validación

10

Los perfiles cromatográficos para blanco de extractos de proteína de PBMC y extractos de proteína de PBMC que contenían cualquiera de péptido P-RII, péptido DP-RII o patrón interno se muestran en la Figura 3. Como se puede observar en la Figura 3, las transiciones seleccionadas para cada péptido de interés son específicas de un péptido dado, y ninguna de ellas se encuentra en el blanco de extractos de proteína de PBMC. El péptido RII fosforilado presentaba un tiempo de retención de 14,5 min y tanto el péptido DP-RII como el patrón interno presentaban tiempos de retención similares de 14,6 min.

15

20

En la Figura 4 se muestran algunos perfiles representativos de supresión de iones para un extracto de proteína de PBMC analizado por LC-MS/MS 4. Los efectos de supresión se produjeron principalmente entre 6 y 11 minutos de la cromatografía, a continuación la señal se estabilizó de forma gradual. El pequeño efecto de supresión de iones observado en los tiempos de elución de los péptidos de interés se puede ignorar debido a la coelución del patrón interno.

25

La reproducibilidad del ensayo se verificó en 7 calibraciones separadas realizadas durante un periodo de 12 días como se muestra en la Figura 5. Cada calibración individual presentada un R² de 0,9966 o superior. La ecuación de regresión media para las 7 calibraciones, en las que el coeficiente de regresión se expresa como media (DT), era

como sigue a continuación: $y = [0,1863 (0,055)]x - [0,0007 (0,00421)]$.

La precisión del ensayo se examinó en extractos de proteína de PBMC con actividades de calcineurina conocidas que variaban de 90 a 500 pmol/mg/min. La variabilidad máxima intraensayo e interensayo era de un 11,5 % y un 16 %, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Datos de imprecisión para actividad de calcineurina medidos en extractos de proteína de PBMC

Intraensayo			Interensayo		
nombre de la muestra	media medida pmol/mg/min	CV, %	nombre de la muestra	media medida pmol/mg/min	CV, %
1	92	6,6	7	337	10,5
2	232	4,6	8	91	8,7
3	333	10,6	9	160	11,5
4	132	8,6	10	375	8,0
5	221	11,5	11	362	5,6
6	116	4,3	12	454	13,5
			13	452	11,7
			14	356	12,8
			15	140	12,3
			16	179	16,0

10 Resultados

Ninguno de los métodos descritos anteriormente analizaba la posibilidad de refosforilación del péptido DP-R11 durante el proceso de reacción enzimática de CN con quinasas presentes en los extractos celulares.

15 Los inventores evaluaron la cinética de la calcineurina en presencia o no de 2 inhibidores de quinasa diferentes: H89, un inhibidor inespecífico y Rp-adenosin 3',5'-monofosforotioato cíclico, un inhibidor específico de PKA.

20 Un primer conjunto de experimentos se realizó usando 5 µg de proteínas citosólicas de PBMC obtenidas a partir de voluntarios sanos. Las células se resuspendieron en un tampón que contenía Tris 50 mM, pH = 7,0, EGTA 0,1 mM, ditioneitol 0,05 mM, Tween 20 al 0,1 %, 0,3 mg/ml de albúmina, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM e inhibidores de proteasa. Las reacciones enzimáticas se procesaron a 37 °C en el tampón Tris 50 mM, pH = 7,0, complementado con 8 mg/l detective R11-P, 0,03 unidades de calmodulina, ácido okadaico 500 nM y 1 mg/l péptido R11 de isótopo estable como un patrón interno. Las reacciones enzimáticas se detuvieron en los puntos temporales indicados (hasta 120 min) y las cantidades de péptido se cuantificaron por LC-MS/MS.

25 Como se muestra en la Figura 1, la producción de péptido DP-R11 era significativamente más elevada en presencia de los inhibidores de quinasa (inhibidor específico de PKA con respecto a control, $p = 0,0008$; H89 con respecto a control, $p = 0,0007$, ensayo de ANOVA). Además, la inhibición obtenida con H89 era significativamente más elevada que la obtenida con el inhibidor específico de PKA ($p = 0,0163$).

30 Para examinar la importancia de tal influencia en la estrategia farmacodinámica para controlar el alcance de la inmunosupresión después del trasplante, los inventores evaluaron las PBMC de pacientes de trasplante en presencia o ausencia del inhibidor de quinasa H89, en un segundo conjunto de experimentos. Como se muestra en la Figura 2, una fuerte variación en la actividad de quinasa se observó entre pacientes y en el tiempo. Además, la actividad de quinasa era capaz de alterar la medida de la actividad de CN, lo que refleja la importancia del enfoque de los inventores.

35 Este hallazgo demuestra que la medida de la actividad de CN se puede realizar en presencia de un inhibidor de quinasa, para obtener una medida más específica.

40 Referencias

Donella-Deana A, Krinks MH, Ruzzene M, Klee C, Pinna LA. Dephosphorylation of phosphopeptides by calcineurin (protein phosphatase 2B). Eur J Biochem 1994, 219: 109-17.

- Dumaz N, Marais R: Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 2003; 278: 29819-23.
- 5 Enz A, Shapiro G, Chappuis A, Dattler A. Non radioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurina) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Anal Biochem* 1994, 216: 147-53.
- 10 Freerman AJ, Turner AJ, Birrer MJ, Szabo E, Valerie K, Grant S: Role of c-jun in human myeloid leukaemia cell apoptosis induced by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 788-95.
- 15 Fruman DA, Pai SY, Klee CB, Burakoff SJ, Bierer BE. Measurement of calcineurin phosphatase activity in cell extracts. *Methods* 1996, 9: 146-54.
- Fukudo M, Yano I, Masuda S, Fukatsu S, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Tanaka K, Inui KI. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver trasplant patients. *Clin Pharmacol Therap* 2005, 78: 168-81.
- 20 Gjertsen BT, Mellgren G, Otten A, Maronde E, Genieser HG, Jastorff B, Vintermyr OK, McKnight GS, Doskeland SO: Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of camp-kinase in cell culture. *J Biol Chem* 1995; 270: 20599-607.
- Glass DB, Lundquist LJ, Katz BM, Walsh DA: Protein kinase inhibitor-(6-22)-amide peptide analogs with standard and non-standard amino acid substitutions for phenylalanine 10. *J Biol Chem* 1989; 264: 14579-84.
- 25 Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Saaki Y: Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 1984; 23: 5036-41.
- Ingebritsen TS, Cohen P. Protein phosphatases: Properties and role in cellular regulation. *Science* 1983, 221: 331-8.
- 30 Monaghan TK, MacKenzie CJ, Plevin R, Ltz EM: PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via camp-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J Neurochem* 2008; 104: 74-88.
- 35 Murray AJ: Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 2008; 1 (22): re4.
- Ogreid D, Dostmann W, Genieser HG, Niemann P, Doskeland SO, Jastorff B: (Rp)- and (Sp)-8-piperidino-adenosine 3',5'-(cyclic)thiophosphates discriminate completely between site A and B of the regulatory subunits of camp-dependent protein kinase type I and II. *Eur J Biochem* 1994; 221: 1089-94.
- 40 Pallen CJ, Wang JH. Calmodulin-stimulated dephosphorylation of p-nitrophenyl phosphate and free phosphotyrosine by calcineurin. *J Biol Chem* 1983, 258: 8550-3.
- 45 Qiu LB, Ding GR, Li KC, Wang XW, Zhou Y, Zhou YC, Li YR, Guo GZ: The role of protein kinase C in the opening of blood-brain barrier induced by electromagnetic pulse. *Toxicology* 2010; 273: 29-34.
- 50 Roberts B, Pohl J, Gooch JL. A fluorimetric method for determination of calcineurin activity. *Cell Calcium* 2008, 43: 515-9.
- Rudolph JA, Pratt J, Mourya R, Steinbrecher KA, Cohen MB: Novel mechanism of cyclic AMP mediated extracellular signal regulated kinase activation in an intestinal cell line. *Cell Signal* 2007; 19: 1221-8.
- 55 Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume JR, Keef KD: Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res* 1998; 82: 557-65.
- Sanquer S, Schwarzingler M, Maury S, Yakouben K, Rafi H, Pautas C, Kuentz M, Barouki R, Cordonnier C. Calcineurin activity as a functional index of immunosuppression after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2004, 77: 854-8.
- 60 Sellar KJ, van Rossum HH, Romijn FP, Smit NP, de Fijter JW, van Pelt J. Spectrophotometric assay for calcineurin activity in leukocytes isolated from human blood. *Anal Biochem* 2006, 358: 104-10.
- 65 Wang LY, Salter MW, MacDonald JF: Regulation of kainite receptors by cAMPD-dependent protein kinase and phosphatases. *Science* 1991; 253: 1132-35. Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA: Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science* 1994; 265: 1878-82.
- Yokozaki H, Tortora G, Pepe S, Maronde E, Genieser HG, Jastorff B, Cho-Chung YS: Unhydrolyzable alalogues

of adenosine 3':5'-monophosphate demonstrating growth inhibition and differentiation in human cancer cells. Cancer Res 1992; 52: 2504-8.

5 Zhang B, Zhang Y, Shacter E: Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. Mol C.

Listado de secuencias

10 <110> Université Paris Descartes

<120> METODO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE CALCINEURINA
<130> BEP110993

15 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <220>

<221> FOSFORILACIÓN

<222> (15)..(15)

30 <400> 1

Asp Leu Asp Val Pro Ile Pro Gly Arg Phe Asp Arg Arg Val Ser Val
1 5 10 15

Ala Ala Glu

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica que comprende las etapas de:
- 5 - proporcionar una mezcla de reacción que comprende un sustrato, al menos un inhibidor de fosfatasa y al menos un inhibidor de quinasa;
- incubar dicha muestra biológica con la mezcla de reacción en condiciones adecuadas para la actividad de calcineurina;
- medir la cantidad de sustrato desfosforilado.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sustrato es el péptido fosforilado DLDVPIPGRRVpSVAE (SEC ID N°: 1).
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de fosfatasa es ácido okadaico.
- 15 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de quinasa es H89.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es una muestra de células sanguíneas mononucleares de sangre periférica (PBMC).
- 20 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de medir la cantidad de sustrato desfosforilado se realiza mediante cromatografía.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa de medir la cantidad de sustrato desfosforilado se realiza mediante cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).
- 25 8. Un kit para medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica que comprende un sustrato de calcineurina, al menos un inhibidor de fosfatasa y al menos un inhibidor de quinasa.
- 30 9. Uso de inhibidor de quinasa en un método para medir la actividad de calcineurina.
10. Un método para predecir el resultado terapéutico de un paciente de trasplante que comprende medir la actividad de calcineurina en una muestra biológica obtenida de dicho paciente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35

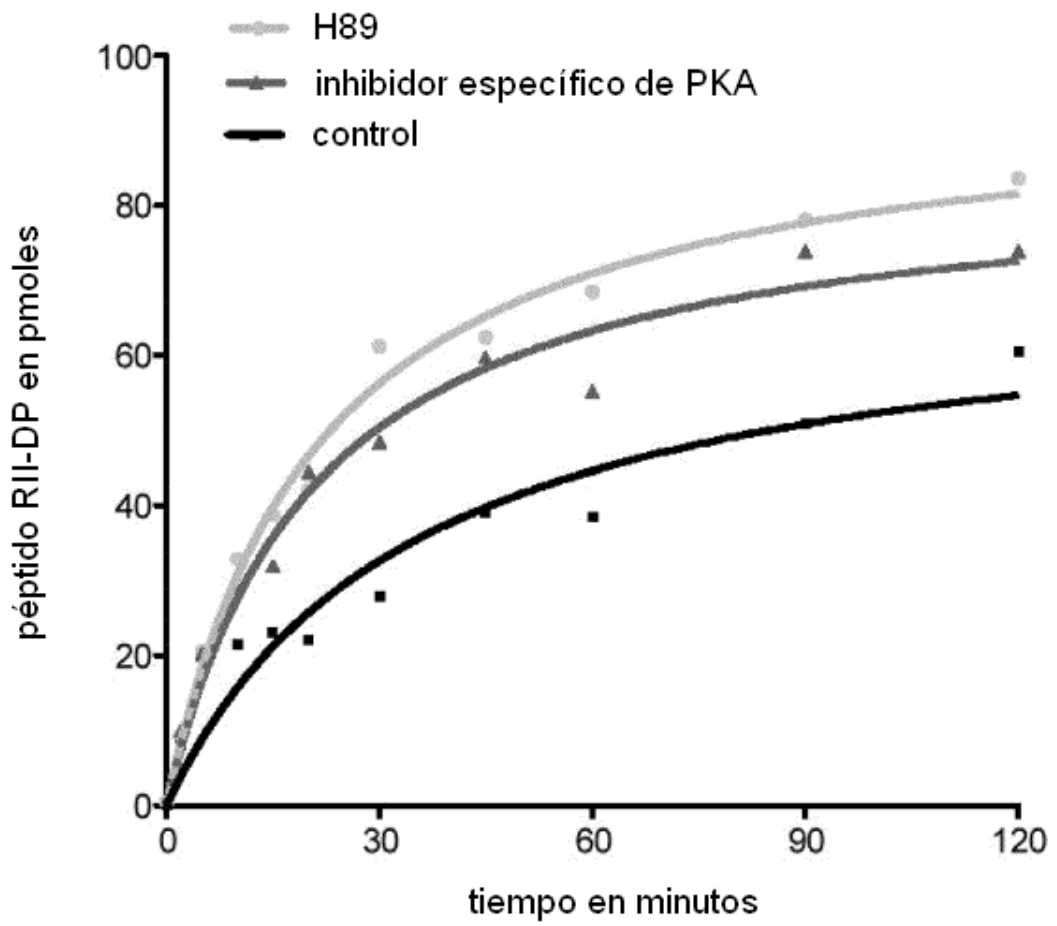


Figura 1

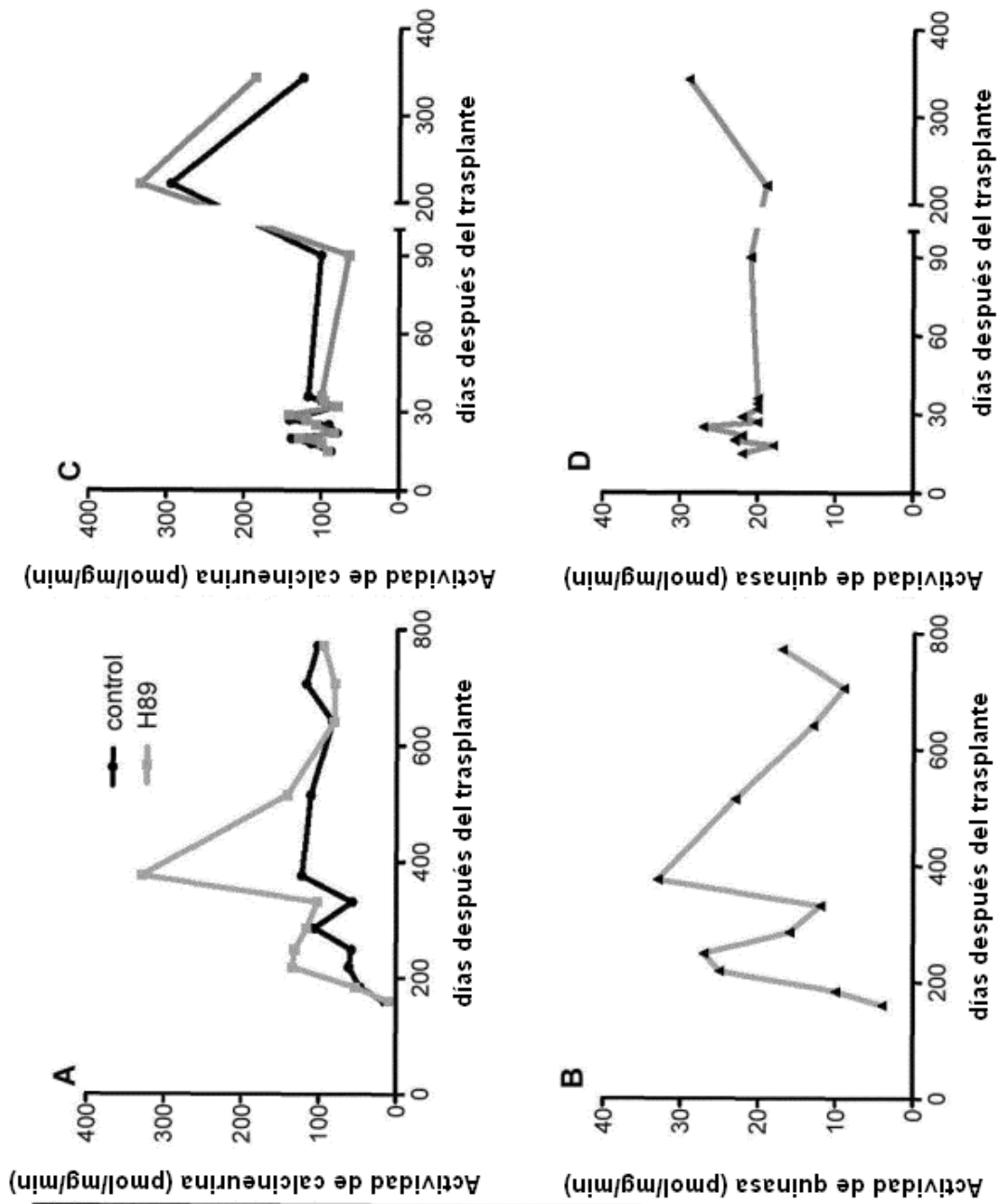


Figura 2

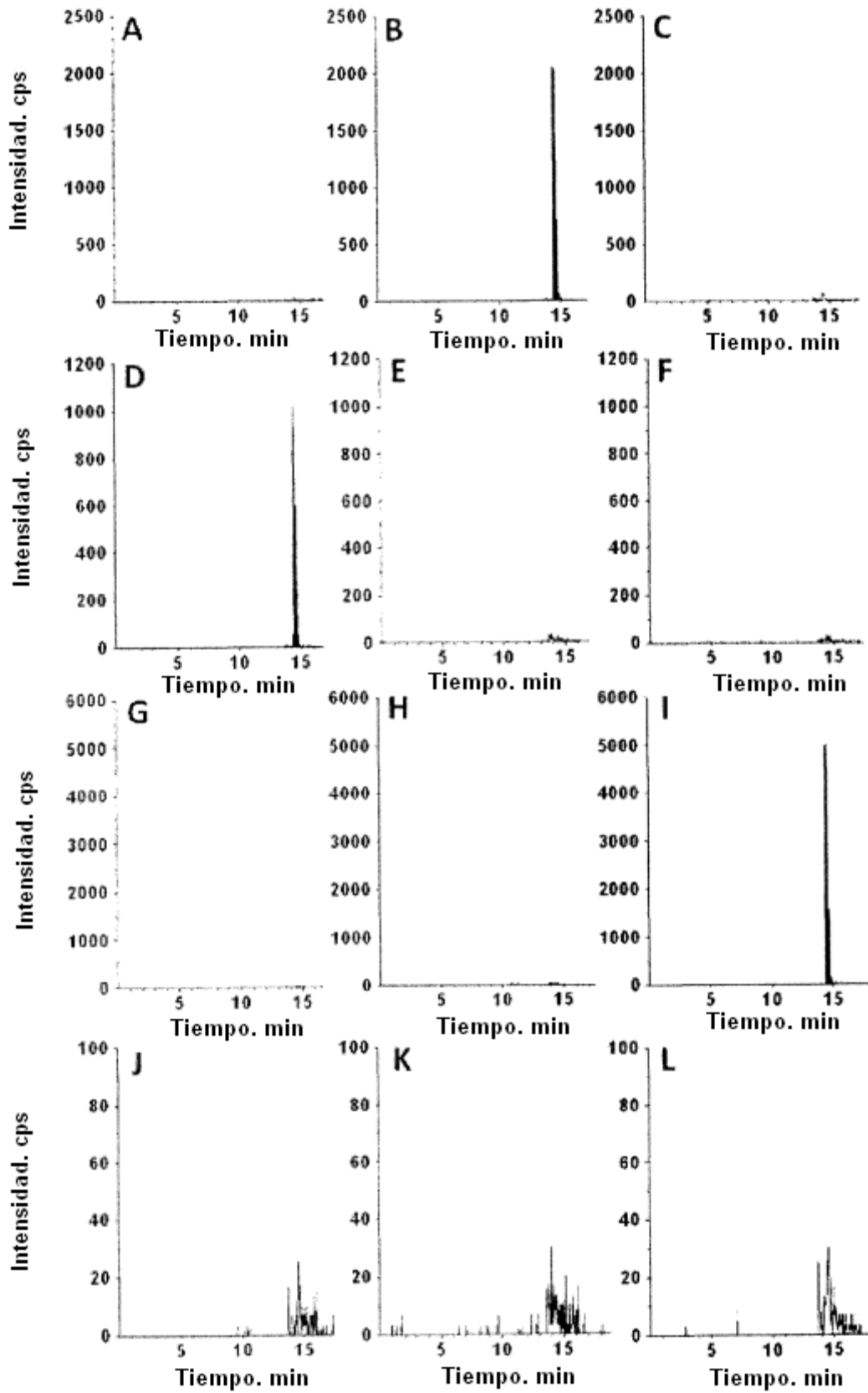


Figura 3

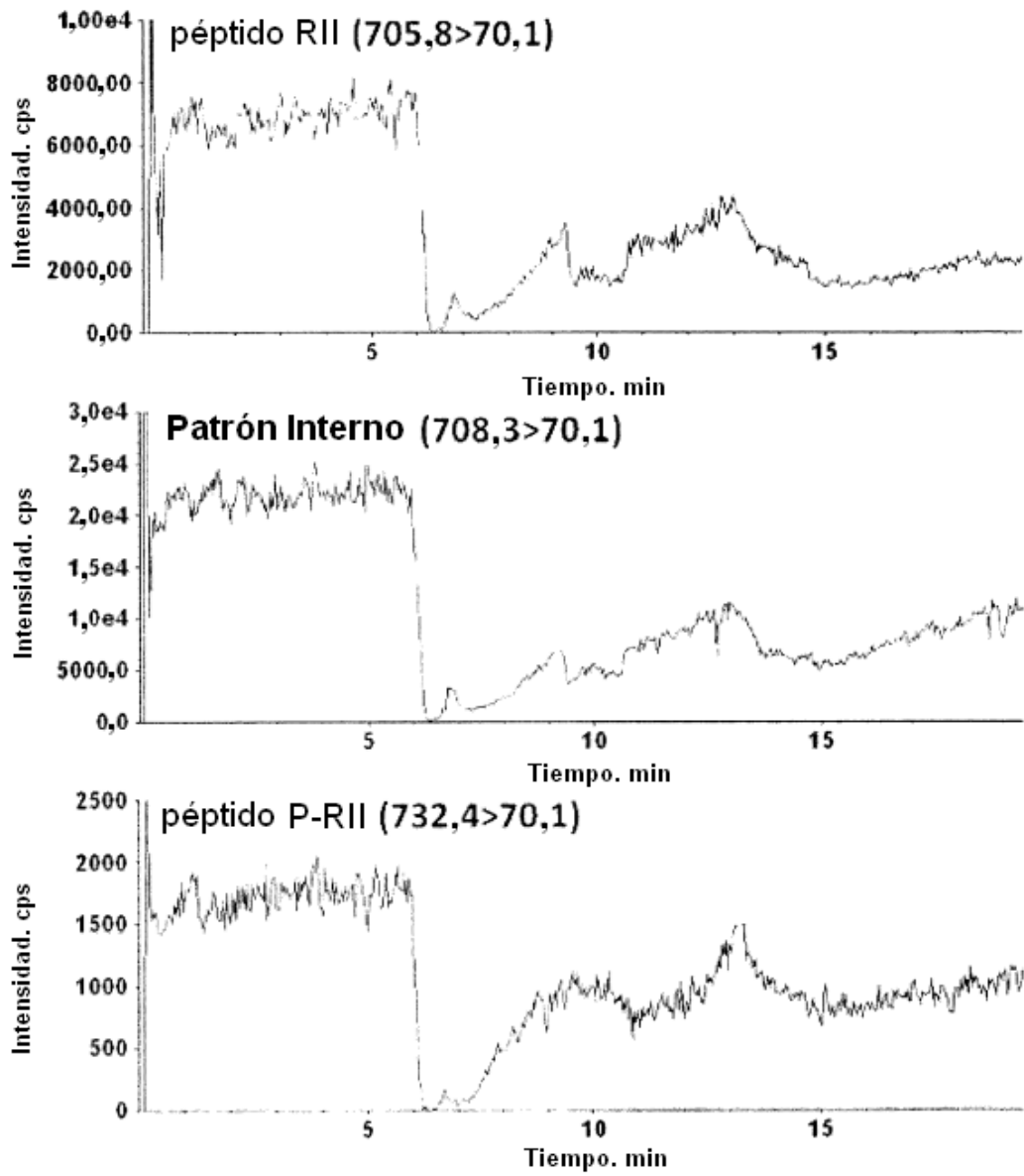


Figura 4

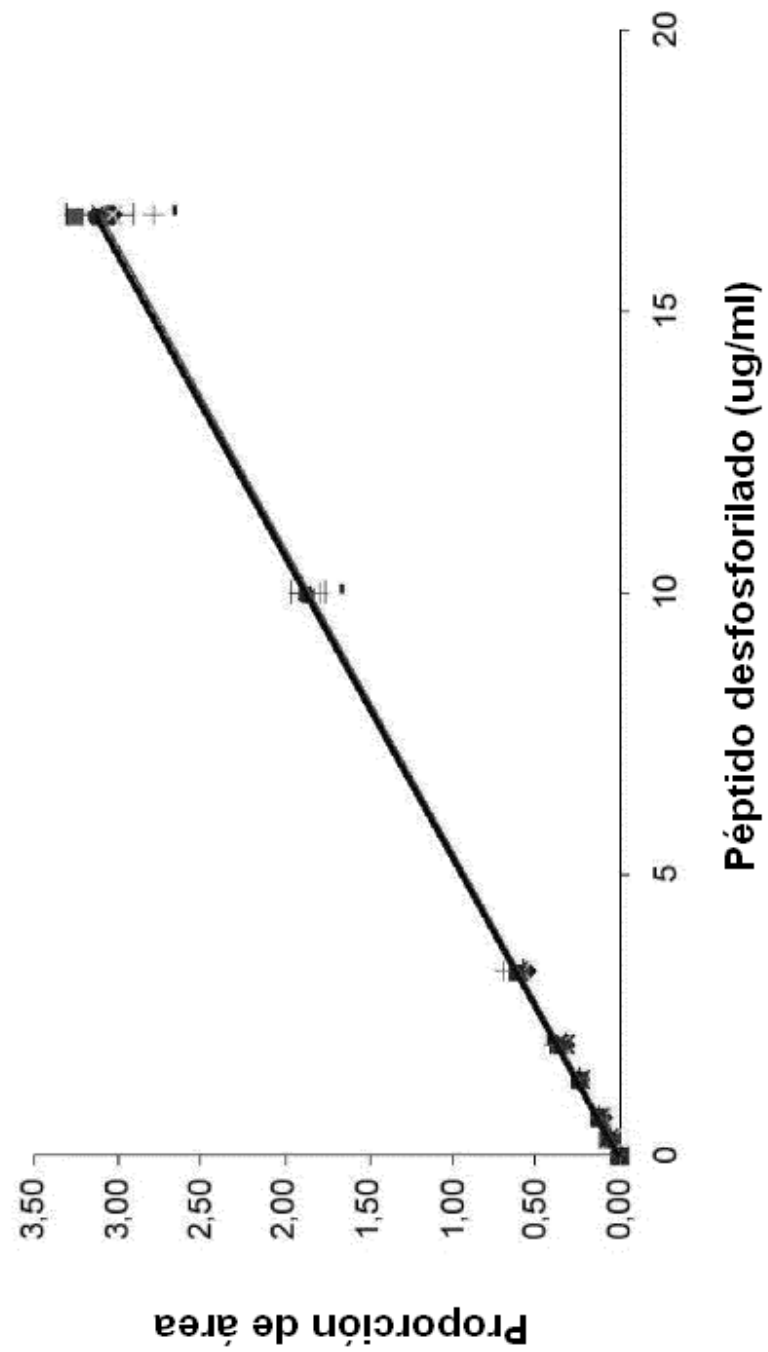


Figura 5