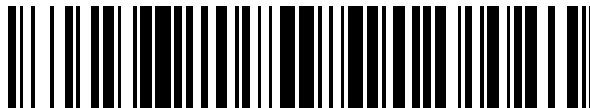


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 861**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011** **E 11811474 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2661621**

54 Título: **Ensayo de sangre completa para medir la activación de AMPK**

30 Prioridad:

06.01.2011 US 201161430472 P

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

15.09.2016

73 Titular/es:

RIGEL PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
1180 Veterans Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

MARKOVSTOV, VADIM y
HITOSHI, YASUMICHI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 582 861 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

Ensayo de sangre completa para medir la activación de AMPK

5 Antecedentes

La AMPK (adenosín monofosfato quinasa) es una quinasa heterotrimérica, multisustrato compuesta de una subunidad catalítica ($\alpha 1$ o $\alpha 2$), un reguladora ($\beta 1$ o $\beta 2$) y una de unión AMP/ATP ($\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 3$). El extremo C terminal de la subunidad β interacciona con las subunidades tanto α como γ , y las pruebas actuales indican que la subunidad β es un componente obligatorio del complejo AMPK activo. El mecanismo exacto por el que AMPK está regulada por el estado de energía de una célula no se entiende completamente. Se cree que cuando los niveles de energía intracelulares descienden (es decir, cuando hay una baja relación de ATP:AMP), AMP desplaza ATP de la subunidad γ , provocando un cambio conformacional que permite que las quinasas corriente arriba (por ejemplo, LKB1 o CaMKK β) fosforilen y activen la subunidad α . Como alternativa, AMPK puede fosforilarse de forma constitutiva, pero se desfosforila rápidamente en condiciones normales. A altos niveles de AMP, sin embargo, la unión con AMP conduce a un cambio conformacional que protege el sitio de activación de dicha acción por fosfatasa.

AMPK actúa como un sensor del estado de energía dentro de las células y puede considerarse un interruptor maestro del metabolismo energético porque, tras su activación, la enzima fosforila varios sustratos proteicos corriente abajo que tienen un efecto en la biosíntesis de lípidos, oxidación de ácidos grasos, captación de glucosa, gluconeogénesis y lipogénesis, por ejemplo. La fosforilación de dianas corriente abajo por AMPK reduce el uso de ATP por la célula que, a su vez, aumenta la relación ATP:AMP en la célula que, a su vez, reduce la actividad AMPK.

Todas estas propiedades se combinan para hacer a la AMPK una diana atractiva en el tratamiento de la diabetes, obesidad y una diversidad de otros trastornos metabólicos.

Rivera *et al*: Biochemical Pharmacology vol. 77, n.º 6, marzo 2009, páginas 1053-1063 indican que la administración de resveratrol a largo plazo reduce perturbaciones metabólicas y disminuye la presión sanguínea en ratas Zucker obesas. Campas *et al*, Blood, vol. 101, n.º 9, mayo 2003, páginas 3674-3680, indican que la acadesina activa AMPK e induce apoptosis en células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B pero no linfocitos T. Towler *et al*, Circulation Research, vol. 100, n.º 3, 1 de febrero de 2007, páginas 328-348, describen proteína quinasa activada por AMP en el control metabólico y señalización de insulina.

35 Sumario

Se proporciona un método de análisis de muestras. La presente invención proporciona un método para evaluar el estado de energía de un sujeto, que comprende: a) marcar células de una muestra sanguínea del sujeto usando un anticuerpo que se une específicamente con fosfo-AMPK, fosfo-acetil-CoA carboxilasa o fosfo-HMG CoA reductasa, para producir una muestra marcada; y b) medir la unión de anticuerpo con células individuales de una población de células sanguíneas de dicha muestra marcada usando citometría de flujo, obteniendo de este modo una evaluación de la activación por AMPK de dicha población de células, en la que la activación de AMPK evaluada en dicha población de células puede usarse para evaluar el estado de energía del sujeto. En realizaciones particulares, el método puede comprender además, antes de la etapa de marcaje: poner en contacto sangre con un agente de ensayo *ex vivo*; y comparar la evaluación con resultados obtenidos de una muestra de referencia de células sanguíneas.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría científica, se cree que: a) el efecto de un compuesto modulador de AMPK o estilo de vida (por ejemplo, dieta o ejercicio) que modula AMPK puede determinarse analizando la sangre de un organismo, y b) la sangre, que es un tejido que no está asociado en general a la producción de energía o su uso, puede actuar como un sustituto de tejidos que están asociados con la producción de energía o su uso (por ejemplo, hígado y músculo, etc.). Por lo tanto, el estado de energía de un organismo puede evaluarse usando la sangre del organismo por citometría de flujo usando un anticuerpo que se une específicamente con fosfo-AMPK o una diana fosforilada de la misma. Estos métodos no requieren un procedimiento invasivo (por ejemplo, una biopsia tisular) y son más rápidos y más económicos en comparación con enfoques anteriores (por ejemplo, transferencia de western).

Breve descripción de los dibujos

Ciertos aspectos de algunas realizaciones de la invención pueden entenderse mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee en conjunto con los dibujos adjuntos. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, los diversos elementos de los dibujos no están a escala. Por el contrario las dimensiones de los diversos elementos están arbitrariamente expandidas o reducidas para mayor claridad. Se incluyen en los dibujos las siguientes figuras:

La Figura 1 ilustra esquemáticamente la ruta de AMPK.

Las Figuras 2A y 2B son gráficas que muestran los resultados de una activación de AMPK basada en FACS realizada en células HepG2.

5 La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo de pAMPK FACS usando sangre completa humana. Los resultados muestran una ventana séptuple para linfocitos.

10 La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo de pAMPK FACS en sangre completa humana y de ratón. El protocolo fue el mismo que se usó para los datos mostrados en la Figura 3. Los resultados muestran una ventana robusta en linfocitos. El pico de control está a la izquierda de cada uno de cada gráfica, y el pico para el compuesto 2 está a la derecha.

La Figura 5 muestra resultados de un ensayo de pAMPK FACS usando sangre completa de ratón. El compuesto 2, un modulador conocido de AMPK, se usa como el compuesto de ensayo.

15 La Figura 6 muestra resultados de un ensayo de FACS que muestra que los datos de CE_{50} obtenidos para pACC se correlacionan con los datos de CE_{50} para pAMPK.

20 La Figura 7 es una serie de gráficas que muestra que el ensayo de FACS de sangre completa humana pAMPK es altamente específico por que diferentes donantes y diferentes anticuerpos proporcionan resultados muy similares.

Figuras 8A-8C. La Figura 8A es una tabla que muestra que hay baja variabilidad entre donantes en la estimulación de pAMPK y pACC usando dos activadores de AMPK. Las Figuras 8B y 8C presentan gráficas que muestran un análisis de los datos presentados en la tabla de la Figura 8A.

25 La Figura 9 es una serie de gráficas que muestran el efecto del tiempo de incubación en la CE_{50} del compuesto 2, un modulador conocido de AMPK.

30 La Figura 10 es una representación de dispersión que muestra la correlación entre ensayos de pAMPK usando glóbulos blancos humanos y células HepG2. Se ensayaron 200 compuestos.

La Figura 11 es una representación de dispersión que muestra la correlación entre pAMPK y pACC usando glóbulos blancos humanos.

35 La Figura 12 es una ilustración esquemática de un único estudio *in vivo*.

La Figura 13 es una serie de gráficas que muestran que la fosforilación de AMPK después del tratamiento por el compuesto 2, un modulador conocido de AMPK, depende de la dosis en ratones *in vivo*.

40 La Figura 14 muestra dos gráficas de barras que muestran que el Compuesto 2, un modulador conocido de AMPK, aumenta la fosforilación de AMPK en linfocitos de sangre de ratón.

La Figura 15 muestra gráficas de barras que muestran los resultados de un ensayo de FACS de pAMPK usando células del bazo y compuesto 2.

45 Las Figuras 16A y 16B son paneles de gráficas que muestran que los niveles de estimulación máximos de pAMPK son significativamente mayores en ratones en ayunas y delgados en comparación con ratones alimentados y obesos, mientras que los niveles sin estimulación permanecen sin cambios.

50 Figuras 17A y 17B. La Figura 17A muestra un plan experimental mientras que la Figura 17B muestra que hay una correlación razonable entre los resultados de OGTT y PK/PD.

DEFINICIONES

55 La expresión "muestra biológica" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier muestra que contenga o esté compuesta de material vivo. Una muestra biológica puede contener células intactas obtenidas de un organismo multicelular. Una muestra biológica puede aislarse de un individuo, por ejemplo, de un tejido blando o de un fluido corporal, o de un cultivo celular que se deja crecer *in vitro*. Una muestra biológica puede componerse de un tejido blando tal como cerebro, glándula adrenal, piel, pulmón, bazo, riñón, hígado, bazo, ganglio linfático, médula ósea, vejiga, estómago, intestino delgado, intestino grueso o músculo, etc. Los fluidos corporales incluyen sangre, plasma, saliva, moco, flema, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, lágrimas, líquido de los conductos galactóforos, linfa, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, líquido amniótico y semen, etc. Las muestras biológicas también incluyen células que han crecido en cultivo *in vitro*.

65 La expresión "células intactas" incluye células que se han fijado y/o permeabilizado. Las células que se han lisado y/o se han seccionado no son células intactas. Las transferencias de western y ensayos en los que las proteínas de un lisado celular o un anticuerpo se fijan a un soporte sólido (por ejemplo, ELISA) no implican células intactas.

La expresión “muestra sanguínea” o equivalentes gramaticales de la misma se refieren a una muestra de sangre completa o una subpoblación de células en sangre completa. Las subpoblaciones de células en sangre completa incluyen plaquetas, glóbulos rojos (eritrocitos), plaquetas y glóbulos blancos (es decir, leucocitos de sangre periférica, que están compuestos de neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos). Estos cinco tipos de glóbulos blancos pueden dividirse además en dos grupos, granulocitos (que también se denominan leucocitos polimorfonucleares e incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y leucocitos mononucleares (que incluyen monocitos y linfocitos). Los linfocitos pueden dividirse adicionalmente en linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK. Se encuentran células sanguíneas periféricas en el grupo de sangre en circulación y no secuestradas dentro del sistema linfático, bazo, hígado o médula ósea. Si la sangre se pone primero en contacto con un agente y después se usa una muestra en la sangre en un ensayo, entonces puede usarse en el ensayo una parte de la sangre, o toda la sangre, que ha entrado en contacto.

La expresión “agente de captura” se refiere a un agente que se une con una molécula diana mediante una interacción que es suficiente para permitir que el agente se una con y concentre la molécula diana de una mezcla homogénea de diferentes moléculas. La interacción de unión está mediada típicamente por una región de afinidad del agente de captura. Los agentes de captura típicos incluyen cualquier resto que pueda unirse específicamente con una molécula diana. En ciertas realizaciones, puede emplearse un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo.

El término “anticuerpo” se usa en el presente documento para hacer referencia a un agente de captura que tiene al menos un dominio de unión a epítipo de un anticuerpo. Los tipos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, Fab, Fv, scFv y Fd, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, etc.) que se conocen y no es necesario describirlos en más detalle.

Los agentes de captura “se unen específicamente” con una molécula diana. En consecuencia, la expresión “agente de captura” se refiere a una molécula o un complejo multimolecular que puede unirse específicamente con una molécula diana, por ejemplo un polipéptido fosforilado, con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-6} M (por ejemplo, menos de aproximadamente 10^{-7} M, menos de aproximadamente 10^{-8} M, menos de aproximadamente 10^{-9} M, menos de aproximadamente 10^{-10} M, menos de aproximadamente 10^{-11} M, menos de aproximadamente 10^{-12} M, hasta tan poco como 10^{-16} M) sin unirse significativamente con otras moléculas. La expresión “unión específica” se refiere a la capacidad de un agente de captura para unirse preferentemente con una molécula diana particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes moléculas diana. Una interacción de unión específica diferenciará entre moléculas diana deseables (por ejemplo, fosforiladas) e indeseables (por ejemplo, no fosforiladas) en una muestra, típicamente más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1.000 o 10.000 veces).

Como se usa en el presente documento, la expresión “citometría de flujo” se refiere a un método por el que las células individuales de una muestra se analizan por sus propiedades ópticas (por ejemplo, absorbancia lumínica, dispersión lumínica y propiedades fluorescentes, etc.) a medida que pasan en una corriente estrecha en fila de a uno a través de un haz de láser. Los métodos de citometría de flujo incluyen métodos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) por los que una población de células que tienen propiedades ópticas particulares se separan de otras células.

Como se usa en el presente documento, el término “marcaje” incluye marcaje directo e indirecto. Un anticuerpo puede marcarse con fluorescencia con un fluoróforo o un punto cuántico, muchos de los cuales se conocen.

El término “predeterminado” se refiere a un elemento cuya identidad se conoce antes de su uso. Un elemento puede conocerse por su nombre, secuencia, peso molecular, su función, una cantidad, propiedades ópticas o cualquier otro atributo o identificador.

El término “mezcla”, como se usa en el presente documento, se refiere a una combinación de elementos, por ejemplo, células, que están intercalados y no en ningún orden particular. Una mezcla es homogénea y no está separada espacialmente en sus diferentes constituyentes. Los ejemplos de mezclas de elementos incluyen varias células diferentes que están presentes en la misma solución acuosa de una manera espacialmente desnuda.

“Aislado” o “purificado” se refiere al aislamiento de una sustancia (compuesto, polinucleótido, proteína, polipéptido, composición polipeptídica) de modo que la sustancia comprenda un porcentaje significativo (por ejemplo, más de 2 %, más de 5 %, más de 10 %, más de 20 %, más de 50 %, o más, habitualmente hasta aproximadamente 90 %-100 %) de la muestra en la que reside. Un componente sustancialmente purificado comprende al menos 50 %, 80 %-85 % o 90-95 % de la muestra.

El término “evaluar” incluye cualquier forma de medición, e incluye determinar si un elemento está presente o no. Los términos “determinar”, “medir”, “evaluar”, “valorar” y “ensayar” se usan indistintamente y pueden incluir determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. “Evaluar la presencia de” incluye determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está presente o ausente.

El término “usar” tiene su significado convencional y, como tal, significa emplear, por ejemplo, poner en servicio, un método o composición para obtener un fin. Por ejemplo, si se usa un programa para crear un archivo, se ejecuta un programa para realizar un archivo, siendo el archivo habitualmente el resultado del programa. En otro ejemplo, si se usa un archivo informático, habitualmente se accede a él, se lee y la información almacenada en el archivo se emplea para obtener un fin. De forma similar, si se usa un identificador único, por ejemplo, un código de barras, el identificador único habitualmente se lee para identificar, por ejemplo, un objeto o archivo asociado con el identificador único.

Como se usa en el presente documento, la expresión “media geométrica” se refiere a la media de n números expresada como la raíz n -ésima de su producto.

Como se usa en el presente documento, la expresión “*in vivo*” se refiere al cuerpo de un organismo vivo completo, por ejemplo, un mamífero vivo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “*ex vivo*” se refiere a tejido vivo que se ha retirado del cuerpo de un organismo vivo completo, por ejemplo, un mamífero vivo. Una muestra de sangre que se ha extraído de un mamífero y contiene células vivas es un ejemplo de una muestra *ex vivo*.

Como se usa en el presente documento, la expresión “*in vitro*” se refiere a células que se han dejado crecer en cultivo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “AMPK” o “proteína quinasa activada por AMP” se refiere a una quinasa heterotrimérica compuesta de una subunidad catalítica alfa y subunidades no catalíticas beta y gamma. AMPK es una enzima sensora de energía importante que supervisa el estado de energía celular. En respuesta a tensiones metabólicas celulares, AMPK se activa y fosforila e inactiva acetil-CoA carboxilasa (ACC) y beta-hidroxibeta-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR), enzimas claves implicadas en la regulación de biosíntesis de novo de ácido graso y colesterol, así como otras proteínas implicadas en el metabolismo. AMPK y su papel como sensor de energía se ha revisado en diversas publicaciones, incluyendo: Kemp *et al* (Trends Biochem. Sci. 1999 24: 22-5), Hardie *et al* (Bioessays. 2001 23: 1112-9), Musi *et al* (Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord. 2002 2: 119-27), Musi *et al* (Biochem. Soc. Trans. 2003 31: 191-5) y Hardie (Endocrinology. 2003 144: 5179-83) y Aschenbach (Sports Med. 2004 34: 91-103).

Como se usa en el presente documento, la expresión “fosfo-AMPK” o “p-AMPK” se refiere a una forma de AMPK en la que la subunidad α tiene una treonina fosforilada en la posición 172. La fosforilación en esta posición se realiza por una AMPK quinasa (AMPKK) corriente arriba. La fosforilación en esta posición provoca que la quinasa fosforile dianas corriente abajo. Una diana corriente abajo de fosfo-AMPK es ACC (acetil-CoA carboxilasa), aunque hay muchas otras.

Como se usa en el presente documento, la expresión “activación de AMPK” se refiere al estado de fosforilación de AMPK o una diana directa de la misma. AMPK puede activarse por modulación de una proteína corriente arriba de AMPK (por ejemplo, el receptor de aponectina, el receptor de leptina, el receptor α -adrenérgico, o el receptor de insulina, etc.) o por AMPK en sí misma. La activación de AMPK puede determinarse ensayando AMPK en sí misma o una diana corriente abajo de AMPK.

Un anticuerpo que es específico para fosfo-AMPK o una diana fosforilada de la misma se une específicamente con las formas fosforiladas de esas proteínas pero no las formas no fosforiladas de esas proteínas.

Otras definiciones de términos aparecen a lo largo de la memoria descriptiva.

Descripción detallada

Antes de describir en más detalle la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que estas pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta un décimo de la unidad del límite inferior a no ser que el contexto claramente indique otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado está abarcado dentro de la invención.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y patentes citadas en la presente memoria descriptiva son para desvelar y describir los métodos y/o materiales en relación con los que se citan las publicaciones. La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar independientemente.

Debe observarse que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "el" incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta declaración actúe como base antecedente para su uso en terminología exclusiva tal como "solamente", "únicamente" y similares en relación con la enumeración de elementos de las reivindicaciones, o uso de una limitación "negativa".

Puede llevarse a cabo cualquier método enumerado en el orden de acontecimientos enumerado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

Método de análisis de muestras

El método descrito posteriormente emplea una muestra de sangre. También se describen en el presente documento otras muestras biológicas que pueden emplearse en el método. Dichas muestras incluyen células intactas de otros tejidos (por ejemplo, otros tejidos blandos tales como hígado o bazo, etc.) o pueden emplearse células cultivadas en cultivo celular. Se conocen métodos para tratar dichos tejidos para proporcionar una suspensión celular adecuada para citometría de flujo. Una vez producida, puede emplearse una suspensión celular de una manera similar a la descrita posteriormente.

En términos generales, el método objeto implica: a) marcar células de una muestra sanguínea del sujeto usando un anticuerpo que se une específicamente con fosfo-AMPK, fosfo-acetil-CoA carboxilasa o fosfo-HMG-CoA reductasa, para producir una muestra marcada; y b) medir la unión de anticuerpos con células individuales de una población de células sanguíneas de dicha muestra marcada usando citometría de flujo, obteniendo de este modo una evaluación de la activación de AMPK de dicha población de células, en el que la activación de AMPK evaluada en dicha población de células puede usarse para evaluar el estado de energía del sujeto. Ya que los resultados obtenidos de la sangre se correlacionaron bien con resultados obtenidos de tejidos asociados con consumo de energía (por ejemplo, músculo o hígado), la evaluación de la activación de AMPK en sangre puede extenderse para proporcionar una evaluación de la activación de AMPK en el sujeto del que se obtuvo la sangre.

Aunque el método puede realizarse en sangre completa, en realizaciones particulares, la población de células sanguíneas analizadas puede ser glóbulos blancos o una subpoblación de los mismos (por ejemplo, una población de linfocitos o una población de granulocitos). En realizaciones particulares, la sangre puede ponerse en contacto con un agente de ensayo *ex vivo* (es decir, usando sangre extraída de un sujeto) y los resultados del ensayo pueden compararse con resultados obtenidos de una muestra de referencia de células sanguíneas (por ejemplo, células sanguíneas que no han estado en contacto con el agente de ensayo o con una cantidad diferente del agente de ensayo) para determinar el efecto del compuesto en la activación de AMPK en el sujeto del que se obtuvo la muestra sanguínea.

El efecto puede medirse en ciertos casos calculando la diferencia en la media geométrica de fluorescencia de la población de células sanguíneas y la media geométrica de fluorescencia de la muestra de referencia de células sanguíneas. Como resultaría evidente, en ciertas realizaciones, la puesta en contacto puede implicar administrar el agente de ensayo a un sujeto y después extraer sangre del sujeto después de un periodo de tiempo especificado. En otras realizaciones, la puesta en contacto puede implicar extraer sangre de un sujeto y después poner en contacto el agente con la sangre extraída durante un periodo especificado. El agente de ensayo puede ser o no un modulador conocido de la ruta de AMPK. En realizaciones particulares, la muestra de referencia puede contener células sanguíneas obtenidas del mismo individuo que la muestra de sangre de ensayo. La muestra de referencia puede haberse puesto en contacto o no con el agente de ensayo. En casos particulares, los datos obtenidos del método pueden expresarse como una gráfica de las medias geométricas de fluorescencia de varias muestras, como se ilustra en la Figura 2. Dicha gráfica puede mostrar un ciclo temporal, o la diferencia entre diferentes dosis de un agente de ensayo, por ejemplo.

Como se ilustra en la Figura 1, AMPK actúa como un interruptor maestro metabólico que regula varios sistemas intracelulares incluyendo la captación celular de glucosa, la β oxidación de ácidos grasos y la biogénesis de transportador de glucosa 4 (GLUT4) y mitocondria. La capacidad sensora de energía de AMPK puede atribuirse a su capacidad para detectar y reaccionar a fluctuaciones en la relación AMP:ATP que tienen lugar durante el descanso y el ejercicio (estimulación muscular). Durante la estimulación muscular, AMP aumenta mientras que ATP se reduce, lo que cambia AMPK a un buen sustrato para activación mediante un complejo de quinasa corriente arriba, AMPKK, o como alternativa, cuando la unión de AMP activa AMPK que se fosforila en Thr-172, un sustrato peor para proteína fosfatasa 2C α . AMPKK es un complejo de tres proteínas, adaptador relacionado con STE (STRAD), proteína de

ratón 25 (MO25) y LKB1 (una serina/treonina quinasa). Durante una ronda de ejercicio, la actividad AMPK aumenta mientras que las células musculares experimentan tensión metabólica provocada por una demanda celular extrema de ATP. Tras la activación, AMPK aumenta los niveles de energía celulares inhibiendo las rutas de consumo de energía anabólicas (síntesis de ácidos grasos, síntesis de proteínas, etc.) y estimulando rutas catabólicas, de producción de energía, (oxidación de ácidos grasos, transporte de glucosa, etc.).

Puede llevarse a cabo desencadenamiento de activación de AMPK siempre que se cumplan dos condiciones. En primer lugar, la subunidad γ de AMPK debe experimentar un cambio conformacional para exponer el sitio activo (Thr-172) en la subunidad α . El cambio conformacional de la subunidad γ de AMPK y puede conseguirse en concentraciones aumentadas de AMP. Las concentraciones aumentadas de AMP darán lugar al cambio conformacional en la subunidad γ de AMPK ya que dos AMP se unen a los dos dominios de Bateman localizados en esa subunidad. Es este cambio conformacional proporcionado por concentraciones aumentadas de AMP lo que expone el sitio activo (Thr-172) en la subunidad α . Este papel de AMP se confirma adicionalmente en experimentos que demuestran activación de AMPK mediante un análogo de AMP 5-amino-4-imidazolcarboxamida ribotida (ZMP) que deriva de la conocida 5-amino-4-imidazolcarboxamida ribosida (AICAR). La segunda condición que debe cumplirse es la fosforilación y posterior activación de AMPK en su bucle de activación en Thr-172 de la subunidad α proporcionada por una quinasa corriente arriba (AMPKK). El complejo formado entre LKB1 (STK 11), proteína de ratón 25 (MO25) y la proteína adaptadora relacionada con pseudoquinasa STE (STRAD) se ha identificado recientemente como la principal quinasa corriente arriba responsable de fosforilación de AMPK en su bucle de activación en Thr-172. Aunque AMPK debe fosforilarse por el complejo LKB1/MO25/STRAD, también puede regularse por moduladores alostéricos que aumentan directamente la actividad AMPK general y modifican AMPK para convertirla en un mejor sustrato para AMPKK y un peor sustrato para fosfatasa. Se ha descubierto recientemente que 3-fosfoglicerato (intermedio de glucólisis) actúa para pronunciar adicionalmente la activación de AMPK mediante AMPKK.

También se ha identificado CaMKK como una AMPKK corriente arriba. CaMKK fosforila y activa AMPK de una manera independiente de AMP, que se desencadena en su lugar por un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. El descubrimiento de que CaMKK actúa como una AMPKK indica que además de un aumento de la relación de AMP con respecto a ATP, AMPK también puede activarse por un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en respuesta a nutrientes, fármacos o estimulación fisiológica.

Algunas dianas corriente abajo de AMPK se ilustran en la Figura 1. Como se ilustra, las dianas corriente abajo de AMPK incluyen proteínas que regulan el metabolismo de carbohidratos (por ejemplo, GEF, MEF, glucógeno sintasa, PFK2 y TORC2), metabolismo de lípidos (por ejemplo, HMGCoAR, ACC, HNF-4, SREBP-1 y HSL), crecimiento celular y apoptosis (eNOS, p53, HRR y eEF2K) y metabolismo de proteínas. Una diana corriente abajo ejemplar de AMPK es acetil-CoA carboxilasa (ACC). Acetil-CoA carboxilasa es una enzima dependiente de biotina que cataliza la carboxilación irreversible de acetil-CoA para producir malonil-CoA mediante sus dos actividades catalíticas, biotina carboxilasa (BC) y carboxiltransferasa (CT). ACC es una enzima multisubunitaria en el retículo endoplásmico en el retículo endoplásmico de la mayoría de eucariotas. La función más importante de ACC es proporcionar el sustrato de malonil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos. La actividad de ACC puede controlarse en el nivel transcripcional así como por moléculas pequeñas moduladoras y modificación covalente. El genoma humano contiene los genes para dos ACC diferentes: ACACA y ACACB.

Puede resultar fosforilación de AMPK cuando las hormonas glucagón o epinefrina se unen con los receptores de superficie celular, pero la causa principal de fosforilación se debe a un aumento en los niveles de AMP cuando el estado de energía de la célula es bajo, lo que conduce a la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). AMPK es la principal quinasa reguladora de ACC, capaz de fosforilar varios restos de serina en ambas isoformas de ACC. En ACC1, AMPK fosforila Ser79, Ser1200 y Ser1215. En ACC2, AMPK fosforila Ser218. La proteína quinasa A también tiene la capacidad de fosforilar ACC, con una capacidad mucho mayor de fosforilar ACC2 que ACC1. Sin embargo, la significación fisiológica de proteína quinasa A en la regulación de ACC se desconoce en la actualidad. Cuando la insulina se une con sus receptores en la membrana celular, activa una fosfatasa para desfosforilar la enzima; retirando de este modo el efecto inhibitor.

AMPK y sus dianas son generalmente intracelulares. Como tal, el método implica en general permeabilizar las células sanguíneas y después marcar las células permeabilizadas usando un anticuerpo que se une específicamente con fosfo-AMPK o una diana fosforilada de la misma. Aunque las etapas exactas de dichos métodos de marcaje intracelular puede variar en gran medida, generalmente implican permeabilizar las células, marcar las células usando un anticuerpo marcado y después fijar las células teñidas de manera que los contenidos de las células permanezcan intactos durante manipulaciones posteriores. Se describen en diversas publicaciones métodos ejemplares por los que pueden marcarse células usando anticuerpos fluorescentes que son específicos para proteínas intracelulares, incluyendo: (Cytometry. 1998 32: 206-13), Sartor *et al* (Cytometry. 1994 18: 119-22), Gadol *et al* (Cytometry 1994 15: 359-70) y Far *et al* (Cytometry. 1994 15: 327-34), a los que se hace referencia para divulgación de estos métodos. Los kits para marcaje intracelular de células para análisis de FACS incluyen el kit de FACS intracelular INTRACYTE™ de Orion BioSolutions, Inc (Vista CA), los kits INTRASURE™ o FASTIMMUNE™ de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ) y los kits Cytotfix™ o Cytoperm™ Plus de PharMingen (San Diego, CA). Dependiendo del método empleado, el glóbulo rojo de la muestra puede lisarse antes permeabilizar y marcar los

glóbulos blancos. Dichas técnicas de lisis pueden adaptarse a partir de las empleadas habitualmente en un análisis de sangre.

Se mide la unión del anticuerpo con células individuales de la población de células sanguíneas usando citometría de flujo. Dichos métodos se conocen y se revisan en diversas publicaciones, incluyendo Brown *et al* (Clin Chem. 2000 46: 1221-9), McCoy *et al* (Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2002 16: 229-43) y Scheffold J. Clin. Immunol. 2000 20: 400-7) y libros tales como Carey *et al* (Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, 4ª Edición ASCP Press, 2007), Ormerod (Flow Cytometry -A practical approach 3ª Edición. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido 2000), Ormerod (Flow Cytometry 2ª Edición. BIOS Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido 1999) y Ormerod (Flow Cytometry -A basic introduction 2009 Cytometry Part A 75A, 2009), a las que se hace referencia en el presente documento para divulgación de esos métodos.

En casos particulares, los datos para una única muestra pueden procesarse para proporcionar para cada uno de varios acontecimientos una medición de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 3, los datos pueden expresarse en ciertos casos como un histograma de un único parámetro que muestra las unidades de fluorescencia en el eje x y el recuento celular en el eje y. La fluorescencia puede ser un valor logarítmico y en ciertos casos puede ser el logaritmo de un valor absoluto (por ejemplo, sin procesar) o normalizado. El pico del histograma proporciona una evaluación de la activación de AMPK en el sujeto del que se obtuvo la muestra sanguínea. El pico de histograma puede ser la media geométrica de los valores de fluorescencia, sin embargo pueden emplearse otros análisis estadísticos para proporcionar un resultado similar. Ya que las diversas subpoblaciones de células sanguíneas (es decir, glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos que están compuestos de neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos) se pueden distinguir fácilmente usando citometría de flujo, los datos pueden analizarse para proporcionar una evaluación de la activación de AMPK en cualquier subpoblación de células sanguíneas. En una realización, los datos pueden analizarse para proporcionar una evaluación de la activación de AMPK en linfocitos. En realizaciones adicionales, las células sanguíneas pueden marcarse con un segundo anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo en superficie celular, y los datos pueden analizarse para proporcionar una evaluación de la activación de AMPK en células que están marcadas con el segundo anticuerpo.

La metodología descrita en el presente documento puede emplearse en general en cualquier citómetro de flujo adecuado, cuyos ejemplos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.378.633, 5.631.165, 6.524.858, 5.266.269, 5.017.497 y 6.549.876, publicación de PCT WO99/54494 así como las Solicitudes de Patente de Estados Unidos publicadas US20080153170, 20010006787, US20080158561, US20100151472, US20100099074, US2010009364, US20090269800, US20080241820, US20080182262, US20070196870 y US20080268494.

El anticuerpo usado para marcar las células debería ser capaz de unirse específicamente con fosfo-AMPK nativa (es decir, plegada) o una diana fosforilada de la misma. En casos particulares, el anticuerpo puede unirse con afinidad muy reducida (es decir, en un factor de al menos 2, 5, 10, 50 o 100) con la forma lineal (es decir, desplegada, desnaturalizada) de la proteína. La estructura con la que se une dicho anticuerpo contiene muchos aminoácidos que no son contiguos en la proteína. En otras palabras, en ciertos casos la unión de dicho anticuerpo con un polipéptido puede depender de que el polipéptido esté plegado en una conformación tridimensional particular.

Dichos anticuerpos pueden prepararse, por ejemplo, inmunizando un animal adecuado, por ejemplo, un animal de sangre caliente, en particular un mamífero tal como un conejo, ratón, rata, camello, oveja, vaca o cerdo o un ave tal como un pollo o pavo, con una fosfo-AMPK plegada o diana corriente abajo de la misma usando cualquiera de las técnicas bien conocidas en este campo adecuadas para generar una respuesta inmunitaria. Se conocen bien en la técnica procedimientos para inmunizar animales, y se describen en Harlow (Antibodies: A Laboratory Manual, Primera Edición (1988) Cold Spring Harbor, N. Y.) y Weir (Handbook of Experimental Immunology Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Como se apreciará por un experto habitual en la materia, el inmunógeno puede mezclarse con un adyuvante o hapteno para aumentar la respuesta inmunitaria (por ejemplo, adyuvante completo o incompleto de Freund o lípido A), o con un vehículo tal como hemocianina de lapa californiana (KLH).

Una vez que se ha inmunizado un animal adecuado y se ha establecido una respuesta inmunitaria contra el antígeno por el animal, se exploran células productoras de anticuerpos del animal para identificar células que produzcan anticuerpos que tengan una actividad deseada. En algunas realizaciones, estos métodos pueden emplear tecnología de hibridoma en la que se fusionan células del bazo del animal inmunizado con una célula inmortal adecuada para producir células de hibridoma. Pueden explorarse sobrenadantes de estas células de hibridoma, y se expanden clones positivos de acuerdo con procedimientos convencionales (Harlow *et al*. Antibodies: A Laboratory Manual, Primera Edición (1988) Cold spring Harbor, N. Y.; y Spieker-Polet *et al.*, mencionado anteriormente).

Los anticuerpos pueden explorarse con respecto a unión con AMPK fosforilada o diana fosforilada de la misma plegada una conformación nativa, por ejemplo, mediante tinción celular para identificar los anticuerpos que son específicos para formas fosforiladas de estas proteínas. En realizaciones particulares, pueden explorarse anticuerpos disponibles en el mercado para identificar un anticuerpo adecuado.

En realizaciones alternativas, puede emplearse un anticuerpo de presentación en fago, cuyos métodos de producción se conocen bien (véase, por ejemplo, Scott *et al.* Science 1990 249: 386; Devlin *et al.*, Science 1990 249: 404; Patentes de Estados Unidos n.º 5.223.409, 5.733.731, 5.498.530, 5.432.018, 5.338.665 y 5.922.545, por ejemplo).

En casos particulares, en lugar de un anticuerpo que sea específico para AMPK o una diana corriente abajo de la misma, el método descrito anteriormente y posteriormente puede realizarse usando un anticuerpo que es específico para una quinasa relacionada con AMPK fosforilada (por ejemplo, BRSK1, BRSK2, NUA1, NUA2, QIK, QSK, SIK, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4, MELK o SNARK; Manning *et al.*, Science 2002 298: 1912-1934) que están estrechamente relacionadas con AMPK α 1 y AMPK α 2, algunas de las cuales también están implicadas en la homeostasis de energía (Koh *et al.* PNAS 2010 107: 15541-15546).

En realizaciones alternativas, puede emplearse un método de transferencia de western cuantitativo, por ejemplo, usando un sistema basado en capilares tal como una máquina Biosciences CB1000. Como alternativa, puede emplearse espectrometría de masas o citometría de masas. En ciertos casos, los ensayos pueden realizarse en un formato de alto rendimiento, por ejemplo, usando placas de 96 o 384 pocillos.

Utilidad

El método descrito anteriormente puede emplearse para identificar compuestos que modulan la activación de AMPK, para determinar si un compuesto administrado tiene un efecto deseado, o para determinar una dosis óptima de un compuesto que se sabe que modula la activación de AMPK, por ejemplo. En estas realizaciones, la medición obtenida usando el método anterior puede compararse con resultados obtenidos de una muestra de sangre de referencia. Como se ha observado anteriormente, la muestra de ensayo de sangre puede ponerse en contacto con un agente de ensayo *ex vivo*. La muestra de sangre de referencia puede no haber estado en contacto con el agente de ensayo o puede haber estado en contacto con una cantidad diferente del agente de ensayo, por ejemplo. En una realización, las muestras tanto de ensayo como de referencia pueden haber estado en contacto con la misma cantidad del compuesto de ensayo, pero en momentos diferentes y durante tiempos diferentes. Las muestras de ensayo y referencia pueden obtenerse de mismo sujeto o de diferentes sujetos. El sujeto puede haber ayunado durante al menos 8-12 horas o, en ciertos casos, el método puede realizarse antes, durante o después del ejercicio. El método puede acoplarse con otros ensayos médicos, tales como un ensayo de colesterol (es decir, un panel de lípidos) o un ensayo de glucosa en sangre para proporcionar una evaluación de la salud del sujeto. La diana del agente de ensayo puede ser corriente arriba de AMPK, puede ser AMPK en sí misma, o corriente abajo de AMPK. En algunos casos, el mecanismo de acción de un agente de ensayo puede ser desconocido.

En una realización ejemplar, se ponen en contacto alícuotas separadas de sangre del mismo individuo con dos o más cantidades de un agente de ensayo que se sabe que modulan la activación de AMPK. La sangre que ha entrado en contacto puede ensayarse usando el método descrito anteriormente, y puede determinarse una dosis eficaz del agente de ensayo.

En otra realización ejemplar, se ponen en contacto alícuotas separadas de sangre del mismo individuo con: a) un agente de ensayo que no se sabe que module la activación de AMPK y b) una solución de control que no contiene el agente de ensayo. La sangre que se ha puesto en contacto puede ensayarse usando el método descrito anteriormente, y puede determinarse el efecto del compuesto en la activación de AMPK.

En estas realizaciones, el grado en que la muestra de ensayo y la muestra de control difieren puede determinarse comparando, por ejemplo, la media geométrica de los resultados obtenidos de una muestra de ensayo con la media geométrica de los resultados obtenidos de una muestra de referencia. Una mayor diferencia entre las medias geométricas indica que el agente tiene un mayor efecto en la activación de AMPK. Por ejemplo, como se ilustra en la Figura 3, el compuesto 1 tiene un mayor efecto en la activación de AMPK en linfocitos que en granulocitos. En relación con la media geométrica de fluorescencia de una muestra que no se ha puesto en contacto con el compuesto, un compuesto que modula la activación de AMPK puede alterar la media geométrica de fluorescencia en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 % o al menos 50 %. En realizaciones particulares, el compuesto puede conducir a una reducción de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 70 % o al menos 80 % en la media geométrica de fluorescencia. En otras realizaciones, el compuesto puede conducir a un aumento de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 100 % o al menos 200 % o al menos 500 % o más en la media geométrica de fluorescencia.

Como se ha observado anteriormente, también se describe en el presente documento que el agente de ensayo pueda administrarse *in vivo*, en cuyo caso el contacto puede comprender administrar el agente de ensayo a un sujeto y después extraer sangre del sujeto después de un periodo de tiempo específico (por ejemplo, de 5 minutos a 1 hora, de 1 h a 12 h, de 12 h a 24 h o de 24 h a 1 semana o más) antes del análisis por citometría de flujo. En aplicaciones *ex vivo*, el contacto puede comprender extraer sangre de un sujeto y después poner en contacto el agente de ensayo con la sangre extraída durante un periodo de tiempo específico (por ejemplo, de 5 minutos a 1 h, de 1 h a 12 h, de 12 h a 24 h o de 24 h a 1 semana o más) antes del análisis por citometría de flujo.

- En un método *in vivo* descrito en el presente documento, puede administrarse una cantidad de un modulador de AMPK a un sujeto y, después de un periodo de tiempo específico, puede extraerse sangre del sujeto y ensayarse usando el método descrito anteriormente. Basándose en los resultados del ensayo, puede administrarse una segunda cantidad del modulador de AMPK al sujeto y, después de un periodo de tiempo específico, puede extraerse sangre del sujeto y ensayarse usando el método descrito anteriormente. Estas etapas pueden repetirse hasta que se consigue un efecto deseado (por ejemplo, una dosis del modulador de AMPK que da como resultado un nivel de activación de AMPK deseado, estable). Este método puede usarse para optimizar la dosificación de un modulador de AMPK para un sujeto particular.
- En términos generales la sangre usada en el ensayo puede obtenerse de cualquier sujeto mamífero incluyendo las órdenes carnívoro (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede estar sano o en algunos casos puede tener cáncer, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad metabólica tal como obesidad o diabetes. En realizaciones particulares, el sujeto puede tener uno o más factores de riesgo para síndrome metabólico, tales como, tensión, sobrepeso, estilo de vida sedentario, envejecimiento, enfermedad cardíaca coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, lipodistrofia, esquizofrenia, enfermedad de las arterias periféricas, enfermedades neurodegenerativas, atrofia muscular/debilidad/miopatía, enfermedades renales, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, degeneración macular relacionada con la edad o enfermedad reumática. Por ejemplo, un sujeto puede tener hiperglucemia en ayunas (provocada, por ejemplo, por diabetes mellitus de tipo 2 o resistencia a insulina), alta presión sanguínea, obesidad central, colesterol HDL reducido y/o triglicéridos elevados.
- En algunas realizaciones, puede saberse que el agente de ensayo afecta a la activación de AMPK. Dichos agentes se conocen e incluyen: metformina, cilostazol, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido (AICAR), 2-desoxiglucosa, tiazolidinedionas tales como troglitazona rosiglitazona, resveratrol y pioglitazona, así como una diversidad de compuestos adicionales descritos en las publicaciones de PCT WO08/083124, WO09/065131, WO09/076631, WO09/132136 y WO10/088392, solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas US20100009992, US20090253764, US20090105293, US20090094709, US20080221088, US20070244202, US20070054965, US20070015665, US20060287356, US20060134240, US20050038068 y patente de Estados Unidos 7.119.205, a cuyas divulgaciones se hace referencia para divulgación genérica y específica de esos compuestos.
- En otras realizaciones, el efecto del agente de ensayo en la activación de AMPK puede ser desconocido. Dichos agentes pueden ser de cualquier clase química y en ciertos casos pueden ser moléculas sintéticas, semisintéticas o inorgánicas u orgánicas de origen natural. Los agentes de ensayo incluyen los hallados en bibliotecas grandes de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles en el mercado bibliotecas de compuestos sintéticos de Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, Reino Unido), ComGenex (South San Francisco, CA) y MicroSource (New Milford, CT). Como alternativa, están disponibles bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales de Pan Labs (Bothell, WA) o se pueden producir fácilmente.
- Los agentes de ensayo pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 Da. Los agentes de ensayo pueden comprender grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno y pueden incluir al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y pueden contener al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran agentes candidatos entre biomoléculas incluyendo péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.
- Pueden obtenerse agentes de ensayo de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo expresión de oligopéptidos aleatorios. Como alternativa, están disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos naturales o producidos de forma sintética se modifican fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales. También pueden crearse nuevos agentes terapéuticos potenciales usando métodos tales como diseño de fármacos racional o modelización por ordenador.
- La exploración puede dirigirse a compuestos farmacológicamente activos conocidos y análogos químicos de los mismos, o a nuevos agentes con propiedades desconocidas tales como los creados mediante diseño de fármacos racional.
- El sujeto puede ponerse en contacto con el agente candidato, por ejemplo, el agente se administra al animal por cualquier vía de administración aceptable, incluyendo, pero son limitación, vía oral (por ejemplo, sonda oral),

intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, intragástrica, etc., por ejemplo, cualquiera entérica o parenteral. Se administra una única dosis, o se administran múltiples dosis durante un periodo de tiempo.

5 Se proporcionan formulaciones, incluyendo formulaciones farmacéuticas, que comprenden un agente identificado por un método de exploración presentado en el presente documento. Una formulación comprende una cantidad eficaz de un agente. Una "cantidad eficaz" significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado.

10 Aunque la dosificación usada variará dependiendo de los objetivos clínicos para conseguir, un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona hasta aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1.000 µg o pueden administrarse aproximadamente 10.000 µg de un agente que produce un resultado deseado en una única dosis. Como alternativa, puede considerarse que una dosificación diana de un agente que produce un resultado deseado está aproximadamente en el intervalo de aproximadamente 0,1-1.000 µM, aproximadamente 0,5-500 µM, aproximadamente 1-100 µM o aproximadamente 5-50 µm en una muestra de sangre del hospedador extraída en las primeras 24-48 horas después de la administración del agente.

15 Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para un compuesto dado se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia por diversos medios.

20 En realizaciones particulares, el método objeto puede emplearse para proporcionar una lectura de la salud metabólica de un sujeto de una manera similar a un ensayo de glucosa o colesterol. El método objeto puede realizarse solo o en combinación con otras técnicas clínicas (por ejemplo, un examen físico u otro ensayo de sangre). Por ejemplo, los resultados obtenidos del ensayo objeto pueden combinarse con otra información, por ejemplo, información con respecto a los niveles de glucosa en sangre, el peso u otros marcadores sanguíneos proteicos que indican la salud metabólica de un individuo.

25 En una realización ejemplar, antes del marcaje de las células, el método puede comprender someter un mamífero a un cambio de estilo de vida (por ejemplo, un cambio de la dieta o en la cantidad de ejercicio), y obtener una muestra sanguínea del mamífero que se analiza posteriormente. La evaluación puede compararse después con resultados obtenidos de una muestra de referencia de células sanguíneas, determinando de este modo el efecto del cambio de estilo de vida en la activación de AMPK del mamífero.

30 En una realización, puede recogerse una muestra de un paciente en una primera localización, por ejemplo, en una situación clínica tal como en un hospital o en la consulta de un médico, y la muestra puede enviarse a una segunda localización, por ejemplo, un laboratorio en el que se procesa y se realiza el método descrito anteriormente para generar un informe. Un "informe" como se describe en el presente documento es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que proporcionan resultados de ensayo que pueden incluir la media geométrica obtenida del ensayo así como, por ejemplo, un intervalo de medias geométricas que se consideran "normales". Una vez generado, el informe puede enviarse a otra localización (que puede ser la misma localización que la primera localización), donde puede interpretarse por un profesional de la salud (por ejemplo, un especialista clínico, un técnico de laboratorio o un médico tal como un oncólogo, cirujano, patólogo), como parte de un diagnóstico clínico.

45 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y descripción de cómo preparar y usar la presente invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.), pero deberían considerarse algunos errores experimentales y desviaciones, A no ser que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

50 Se emplean tres activadores de AMPK diferentes en los ejemplos descritos posteriormente. El Compuesto 1 se describe en la publicación de PCT WO10/088392, el Compuesto 2 se describe en la publicación de PCT WO09/065131.

Ejemplo 1

60 Se trataron células MEF o C2C12 con DMSO o Compuesto 2 y se exploraron por transferencia de western con un anticuerpo anti pAMPK de señalización celular. El anticuerpo reconocía exclusivamente pAMPK y no se observó ninguna otra banda. El mismo anticuerpo se usó para FACS en experimentos posteriores.

65 Se tripsinizaron células de cáncer de hígado humano HepG2, se resuspendieron en un medio completo a 2×10^6 células por ml y se sembraron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo de pocillos profundos, 100 µl por pocillo. Se añadió compuesto en 1 µl de DMSO a la suspensión celular, se mezcló y se incubó 1 h a 37 °C. Después

de la incubación, se añadieron 900 μ l de solución de lisado-fijación (BD) y la placa se incubó a 37 °C durante otros 10 min, se centrifugó durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió sedimento celular en 250 μ l de metanol helado y se incubó durante 30 min a 4 °C. Después de una transferencia a una placa de fondo redondo de 96 pocillos regular, las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos, se lavaron en 250 μ l de PBS que contenía 2 % de FCS (PBS2) y se resuspendieron en 100 μ l de PBS2 que contenía dilución 1:100 de anticuerpo pACC (Millipore). La suspensión se incubó durante una noche a temperatura ambiente en un agitador. A la mañana siguiente, las células se lavaron una vez con PBS2 y se incubaron con anticuerpo de cabra secundario anti conejo conjugado con Alexa 488 a una dilución 1:200 durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un único lavado las células se clasificaron en un clasificador FACS BD. Se realizó cuantificación usando software FlowJo. Se usó la media geométrica de una señal de Alexa 488 para clasificación de células vivas para representar los resultados y se determinó CE₅₀ en matlab.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Las CE₅₀ obtenidas por FACS se correlacionan fuertemente con las de transferencia de western en células para el mismo epítipo, validando el enfoque basado en FACS.

Ejemplo 2

Se separaron alícuotas de sangre humana completa a 100 μ l por pocillo en placa de fondo redondo, se añadió 1 μ l de solución de Compuesto 1/DMSO 1 μ M o DMSO solo, se mezcló y se incubó durante 1 h a 37 °C, después se añadieron 900 μ l de solución de lisado-fijación (BD). El resto del procedimiento se realizó como se ha descrito para células HepG2 anteriormente, excepto que se usó anticuerpo de conejo pAMPK (Cell Signaling) a dilución 1:100 en lugar de pACC como primario. Los linfocitos y granulocitos se seleccionaron como se indica.

Los resultados se muestran en la Figura 3. La ventana de señal 4-7 veces mayor permite crear un ensayo basado en sangre robusto.

Ejemplo 3

Se separó en alícuotas sangre humana y de ratón completa a 100 μ l por pocillo en placa de fondo redondo, se añadió 1 μ l de solución de DMSO de Compuesto 1 1 μ M o DMSO solamente, se mezcló y se incubó durante 1 h a 37 °C, después se añadieron 900 μ l de solución de lisado-fijación (BD). El resto del procedimiento se realizó como se ha descrito para células HepG2 anteriormente, excepto que se usó anticuerpo de conejo pAMPK (Cell Signaling) a dilución 1:100 en lugar de pACC como primario. Los resultados se muestran en la Figura 4. El anticuerpo actúa usando sangre tanto humana como de roedor.

Ejemplo 4

Se compararon histogramas de canal FL-1 para linfocitos humanos o de ratón seleccionados y granulocitos teñidos para pAMPK. En ambas especies los linfocitos demostraron uniformemente mejor ventana que los granulocitos. Los linfocitos T purificados propagados en presencia de IL-2 demostraron ser un mal reemplazo para la sangre completa debido a una ventana de estimulación muy estrecha. Como resultado, todos los experimentos de seguimiento usaron linfocitos WB para generar CE50.

Ejemplo 5

Determinación de CE50 para estimulación de fosforilación de AMPK por Compuesto 2 en linfocitos T humanos *in vitro* propagados y en células sanguíneas humanas y de ratón. Los resultados se muestran en la Figura 5. La ventana para linfocitos T purificados es muy estrecha debido al alto nivel de fondo de fosforilación de AMPK, supuestamente inducida por tensión celular. La CE50 para sangre de ratón es significativamente (aproximadamente 10 veces en promedio) mayor que la de un ser humano. Las CE50 tanto del ser humano como de ratón son significativamente mayores que la CE50 correspondiente para HepG2 (hasta varios cientos de veces).

Ejemplo 6

Efectos de la privación en la fosforilación de AMPK en sangre del ratón. Los ratones macho C57B1/6J se sometieron a ayunas durante 14 horas o se les alimentó de forma normal antes de la recogida de sangre. Se realizó estimulación de AMPK por el Compuesto 2 y el Compuesto 1 *ex vivo* durante 1 h en 50 μ l. El procedimiento de tinción fue el mismo que para las HepG2, excepto que se usó una dilución 1:500 para los anticuerpos tanto primarios como secundarios. El nivel máximo de fosforilación de AMPK en animales en ayunas fue uniformemente mayor en casi el doble en comparación con los alimentados, mientras que el nivel de fondo permaneció intacto.

Ejemplo 7

Efectos de la privación en la fosforilación de ACC por AMPK en sangre de ratón. Todas las observaciones para fosforilación de AMPK son relevantes también para la tinción de pACC. Los resultados se muestran en la Figura 6. Las CE50 para ambas proteínas son idénticas cuando se usa el mismo compuesto, como se esperaba.

Ejemplo 8

La tinción usando anticuerpo monoclonal y policlonal de conejo anti pAMPK es altamente específica e independiente del donante. Se usaron muestras de sangre completa de dos donantes humanos para teñir con respecto a pAMPK en ausencia (perfil azul) y en presencia (perfil rojo) de Compuesto 2 10 μ M que induce fosforilación de AMPK. Ambos anticuerpos detectaron de forma robusta un aumento similar de fosforilación de AMPK tras el tratamiento con el Compuesto 2, lo que confirma la selectividad de tinción.

Ejemplo 9

Las CE50 para el Compuesto 2 en sangre completa humana de dos donantes diferentes fueron idénticas cuando se usaron dos anticuerpos diferentes para tinción de linfocitos. Los resultados se muestran en la Figura 7. La ventana fue significativamente mejor cuando se usó anticuerpo de conejo monoclonal.

Ejemplo 10

Las curvas obtenidas tiñendo las células sanguíneas con respecto a pAMPK después de valorar el compuesto en sangre completa *ex vivo* son más reproducibles cuando se usa clasificación de linfocitos en lugar de la de granulocitos, pero las CE50 obtenidas por ambos métodos son esencialmente iguales independientemente del anticuerpo, el tipo celular o el donante.

Ejemplo 11

Uniformidad y estabilidad del ensayo de pAMPK. Curvas de valoración y CE50 para el Compuesto 1 y el Compuesto 2 obtenidas en semanas diferentes usando la sangre del mismo donante. Las CE50 finales son estrechamente coincidentes entre sí. Las Figuras 8A-8C muestran que hay una baja variabilidad entre donantes en la estimulación de pAMPK y PACC usado dos activadores de AMPK.

Ejemplo 12

Efectos del tiempo de incubación con el compuesto en CE50 resultante en un ensayo de WB. Se trató sangre completa humana del único donante con diversas cantidades de Compuesto 1 durante periodos de tiempo dados a 37 °C. La sangre se procesó de acuerdo con el método convencional para detectar fosforilación de AMPK por FACS. Se determinaron las CE₅₀ matlab. Los resultados se muestran en la Figura 9. Se observó muy poco efecto en linfocitos (2 paneles de la derecha). Los granulocitos son extremadamente sensibles al tiempo de incubación debido a una deriva hacia arriba significativa y continua en un nivel de línea basal de pAMPK detectada, incluso aunque no dé como resultado un cambio significativo en la CE50 (2 paneles izquierdos). Por lo tanto, el tiempo de incubación más largo reduce inesperadamente la ventana y robustez general del ensayo. En ambos tipos celulares, el Compuesto 2 demuestra una cinética extremadamente rápida de activación de AMPK, en el intervalo de 5 min se puede ver una estimulación completa de la quinasa a concentraciones de saturación del compuesto. El nivel de activación máximo permanece igual, los niveles no estimulados aumentan marginalmente.

Ejemplo 13

La Figura 10 muestra una fuerte correlación lineal entre CE50 obtenidas por in-cell-western (ICW) de pACC en células HepG2 (eje X) y las obtenidas por pAMPK FACS en sangre completa humana (eje Y). Se usó la escala logarítmica para ambos ejes. La mayoría de los compuestos demostró una pérdida significativa de potencia (hasta 100 veces) en la sangre en comparación con células HepG2, supuestamente debido a combinación de alta unión de proteínas y alto nivel de distribución a glóbulos rojos (alto VSS) para los compuestos ensayados.

Ejemplo 14

La Figura 11 muestra una excelente correlación lineal entre CE50 de PACC y pAMPK FACS en sangre completa humana (eje Y) para los compuestos ensayados. ACC es una diana corriente abajo de AMPK y AMPK es la única quinasa que se dirige al sitio de fosforilación inhibitor en ACC.

pAMPK como un biomarcador sanguíneo *in vivo*. La Figura 12 muestra un perfil del efecto del Compuesto 2 en el estudio *in vivo* de activación de AMPK. La Figura 13 muestra una representación de FACS unidimensional de tinción con pAMPK en sangre de ratón después de una única dosis oral del Compuesto 2. Se observa un claro aumento en población de células positiva para pAMPK a la mayor dosis de Compuesto 2.

Ejemplo 15

pAMPK como biomarcador sanguíneo *in vivo*. Los resultados se muestran en la Figura 14. Parte superior, media geométrica para señal de pAMPK en linfocitos derivados de sangre de ratones tratados con una única dosis de Compuesto 2 a 5 y 20 mg/kg o con un control de vehículo, como se indica. Las mediciones de los niveles de pAMPK de muestras de sangre tomadas antes de tratamiento se muestran en azul y las medidas correspondientes tomadas

1 h después del tratamiento están en rojo. Parte inferior, relación de la media geométrica de señal de pAMPK a 1 h con respecto a la de 0,5 h antes del tratamiento para el mismo grupo de animales. Se observó un claro aumento dependiente de dosis en la señal para muestras sanguíneas de animales tratados con Compuesto 2.

5 Ejemplo 16

La Figura 15 muestra que un ensayo de pAMPK basado en FACS puede usarse para detectar efectos de los compuestos en tejidos distintos en sangre. Se homogeneizaron bazo de los animales tratados con Compuesto 2 (parte superior) o R043 (parte inferior) en suspensión celular individual y las muestras resultantes se procesaron de la misma manera que la sangre y se tiñeron con respecto a pAMPK. Parte superior, media geométrica para muestras de animales tratados con vehículo (derecha) o Compuesto 2 (izquierda), factor con respecto al control de vehículo. No estim, muestras procesadas sin ningún tratamiento adicional. Estim, muestras tratadas con Compuesto 1 3,2 μM durante 5 min a 37 °C antes del procesamiento para determinar el nivel de estimulación de AMPK máxima para células en suspensión.

15 Parte inferior, media geométrica de pAMPK para muestras de bazo de animales tratados con vehículo o Compuesto 3 a dosis indicadas y en puntos temporales después de dosis oral, factores por encima del control de vehículo en el punto temporal de 0,5 h.

20 Conclusión: puede usarse el mismo método para evaluar los niveles de pAMPK en tejidos sólidos susceptibles de procesamiento por suspensión celular individual, tal como bazo e hígado.

Ejemplo 17

25 Las Figuras 16A y 16B muestran que los niveles de estimulación máxima de pAMPK son significativamente mayores en ratones en ayunas y delgados en comparación con ratones alimentados y obesos, mientras que los niveles no estimulados permanecieron sin cambios. La Figura 15A muestra que la CE50 para cualquiera de los compuestos ensayados no dependía de la saciedad. Los niveles de línea basal de fosforilación tanto de AMPK como de ACC permanecieron sin cambios en ambos grupos, mientras que los niveles de estimulación máxima para ambos fueron significativamente mayores en el grupo en ayunas. La Figura 15B panel superior muestra los niveles de pAMPK en la sangre de ratones obesos y delgados antes y después de la estimulación *ex vivo* con el Compuesto 1. El panel inferior de la Figura 15B muestra niveles de pAMPK en los esplenocitos de ratones obesos y delgados antes y después de la estimulación *ex vivo* con R283.

35 La Figura 17A muestra un plan experimental y la Figura 17B muestra que hay una correlación razonable entre los resultados de OGTT y PK/PD.

La enumeración de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención previa.

40

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el estado de energía de un sujeto que comprende:
 - 5 a) marcar células de una muestra sanguínea del sujeto usando un anticuerpo que se une específicamente con fosfo-AMPK, fosfo-acetil-CoA carboxilasa o fosfo-HMG-CoA reductasa, para producir una muestra marcada; y
 - b) medir la unión de anticuerpo con células individuales de una población de células sanguíneas de dicha muestra marcada usando citometría de flujo, obteniendo de este modo una evaluación de la activación de AMPK de dicha población de células, en la que la activación de AMPK evaluada en dicha población de células puede usarse para
 - 10 evaluar el estado de energía del sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha evaluación es la fluorescencia media geométrica de dicha población de células sanguíneas.
- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha población de células sanguíneas son glóbulos blancos o una subpoblación de los mismos.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha subpoblación está compuesta de linfocitos o granulocitos.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo se une específicamente con fosfo-AMPK.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho anticuerpo se une específicamente con fosfo-ACC
 - 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho método comprende además: antes de dicha etapa de marcaje: a) poner en contacto sangre con un agente de ensayo *ex vivo*; y comparar dicha evaluación con resultados obtenidos de una muestra de referencia de células sanguíneas, determinando de este modo el efecto de dicho compuesto en la activación de AMPK en dicha población de células
 - 30 sanguíneas.
 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho efecto se mide calculando la diferencia en la fluorescencia de media geométrica de dicha población de células sanguíneas y la fluorescencia de media geométrica de dicha muestra de referencia de células sanguíneas.
 - 35 9. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que dicha muestra sanguínea se ha extraído de un sujeto al que se ha administrado dicho agente de ensayo.
 - 40 10. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que dicha muestra se pone en contacto con dicho agente de ensayo durante un periodo de tiempo específico después de la provisión de una muestra de sangre.
 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que se sabe que dicho agente de ensayo afecta a la activación de AMPK.
 - 45 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que el efecto de dicho agente de ensayo en la activación de AMPK no se conoce.
 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en el que dicha muestra de referencia comprende células sanguíneas obtenidas del mismo individuo que dicha muestra de sangre.
 - 50 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en el que dicha muestra de referencia no se ha puesto en contacto con dicho agente de ensayo.
 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicha muestra de sangre se pone en contacto con una primera cantidad de dicho agente de ensayo y la muestra de referencia se pone en contacto con una segunda cantidad de dicho agente de ensayo.
 - 55 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho método comprende evaluar los resultados obtenidos de una muestra de sangre de un mamífero que se ha sometido a un cambio en su estilo de vida y comparar dicha evaluación con resultados obtenidos de una muestra de referencia de células sanguíneas, determinando de este modo el efecto de dicho cambio en el estilo de vida en la activación de AMPK de dicho mamífero.
 - 60 17. El método de la reivindicación 16, en el que dicho cambio en el estilo de vida es una dieta.
 - 65 18. El método de la reivindicación 16, en el que dicho cambio en el estilo de vida es aumentar el ejercicio.

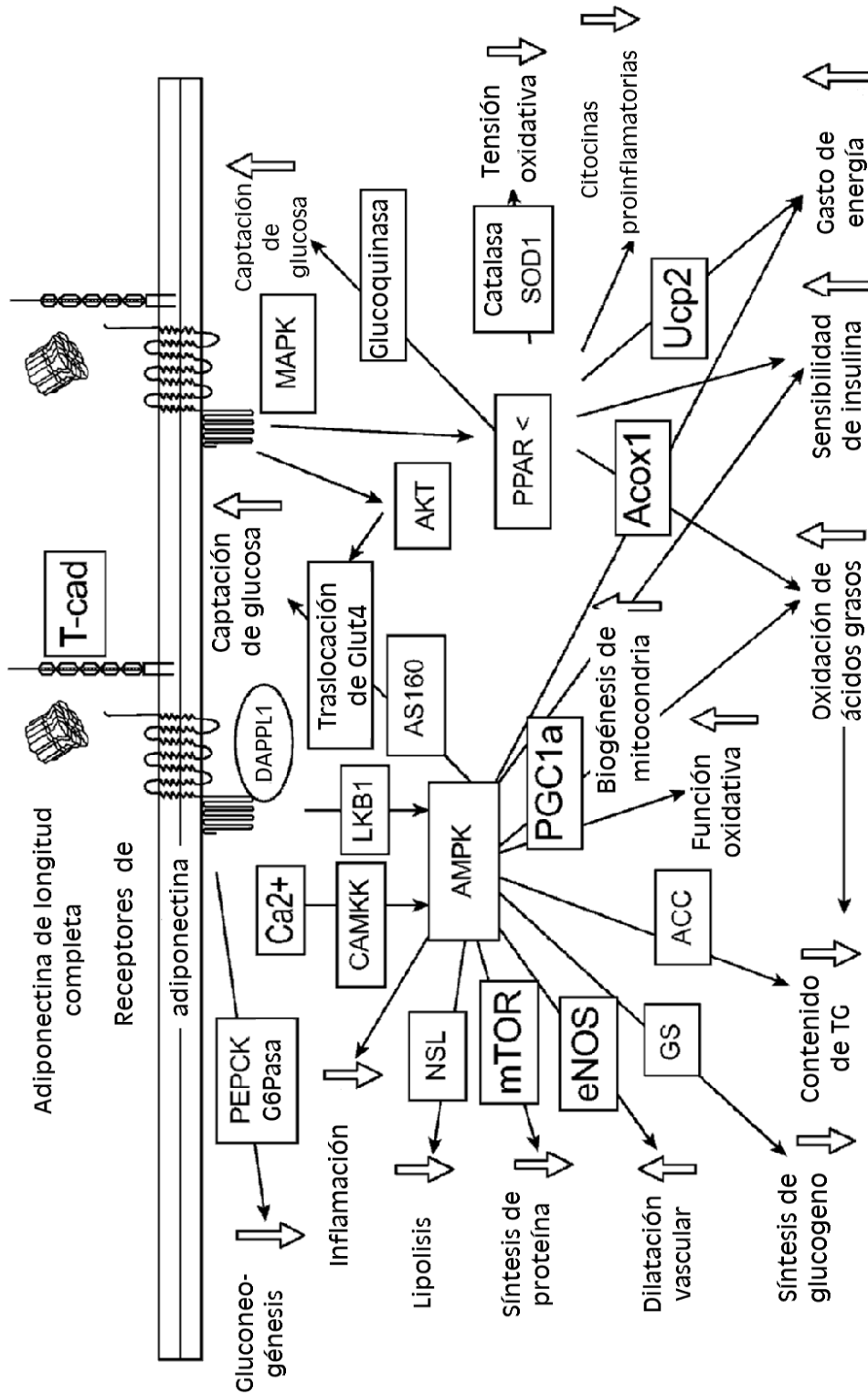


FIG. 1

pACC FACS

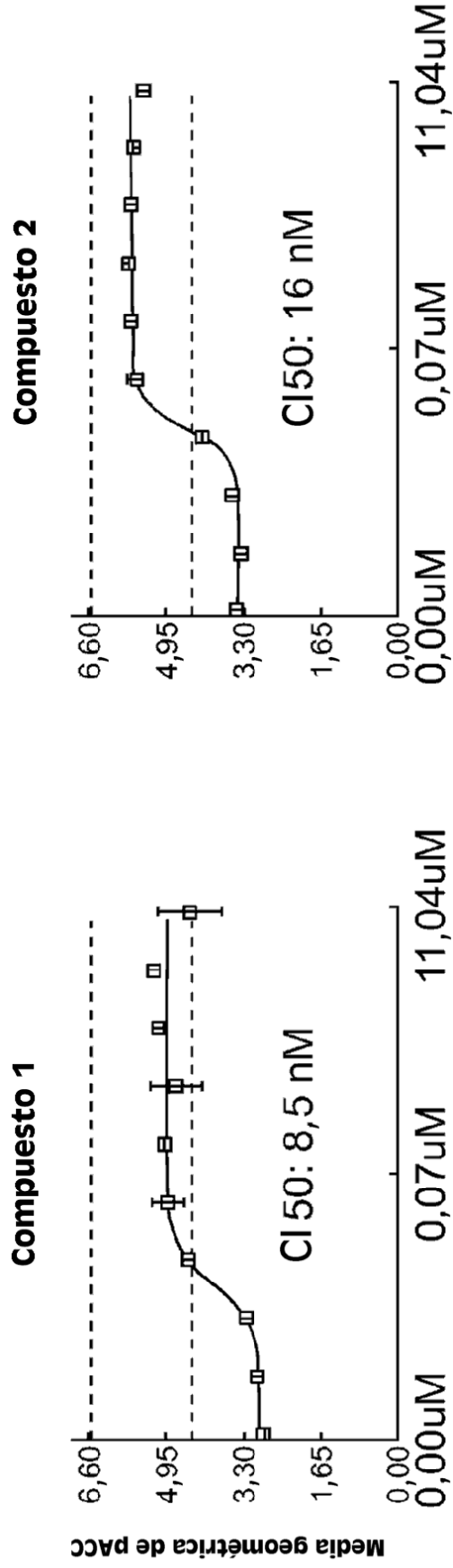


FIG. 2A

FIG. 2B

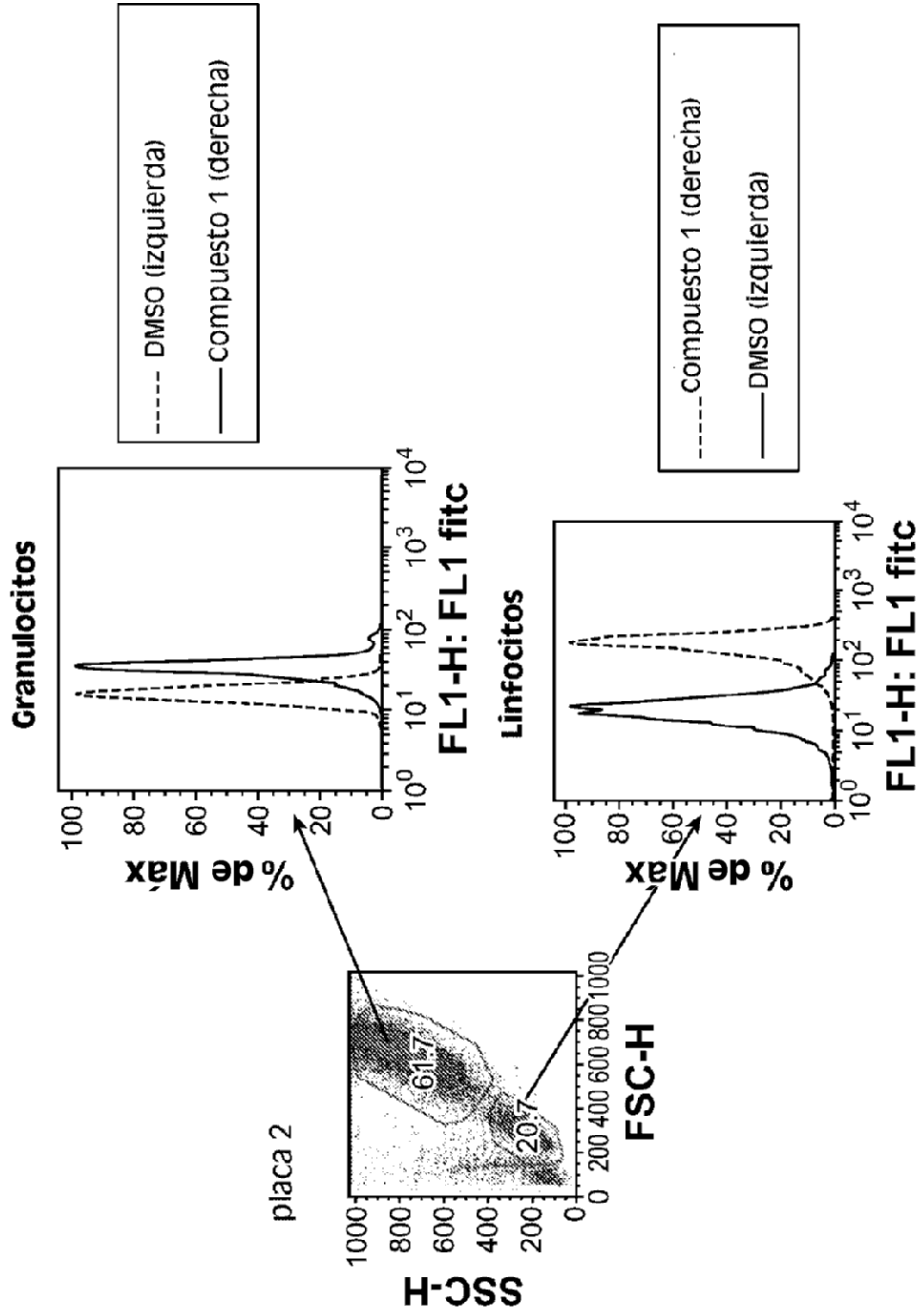


FIG. 3

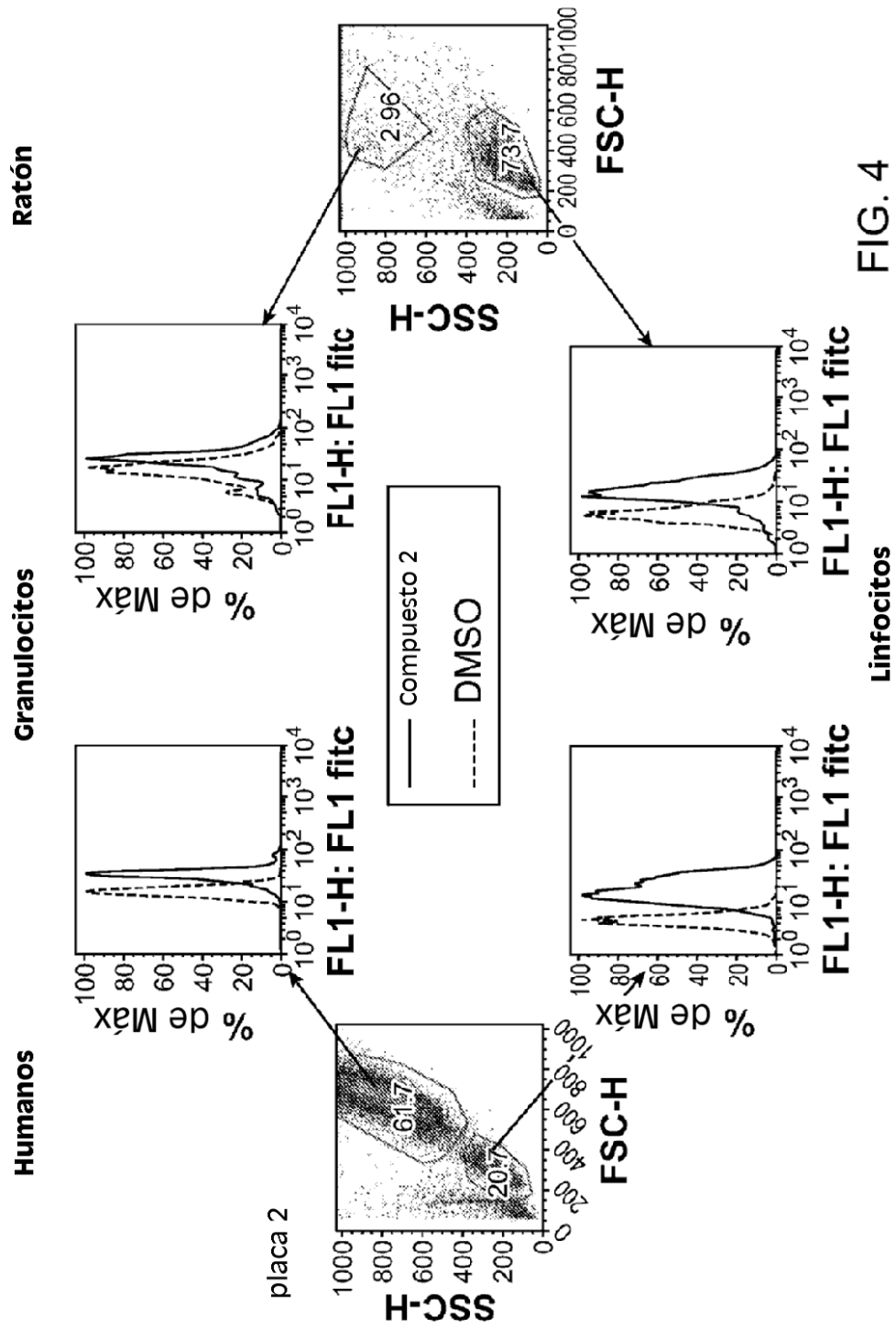


FIG. 4

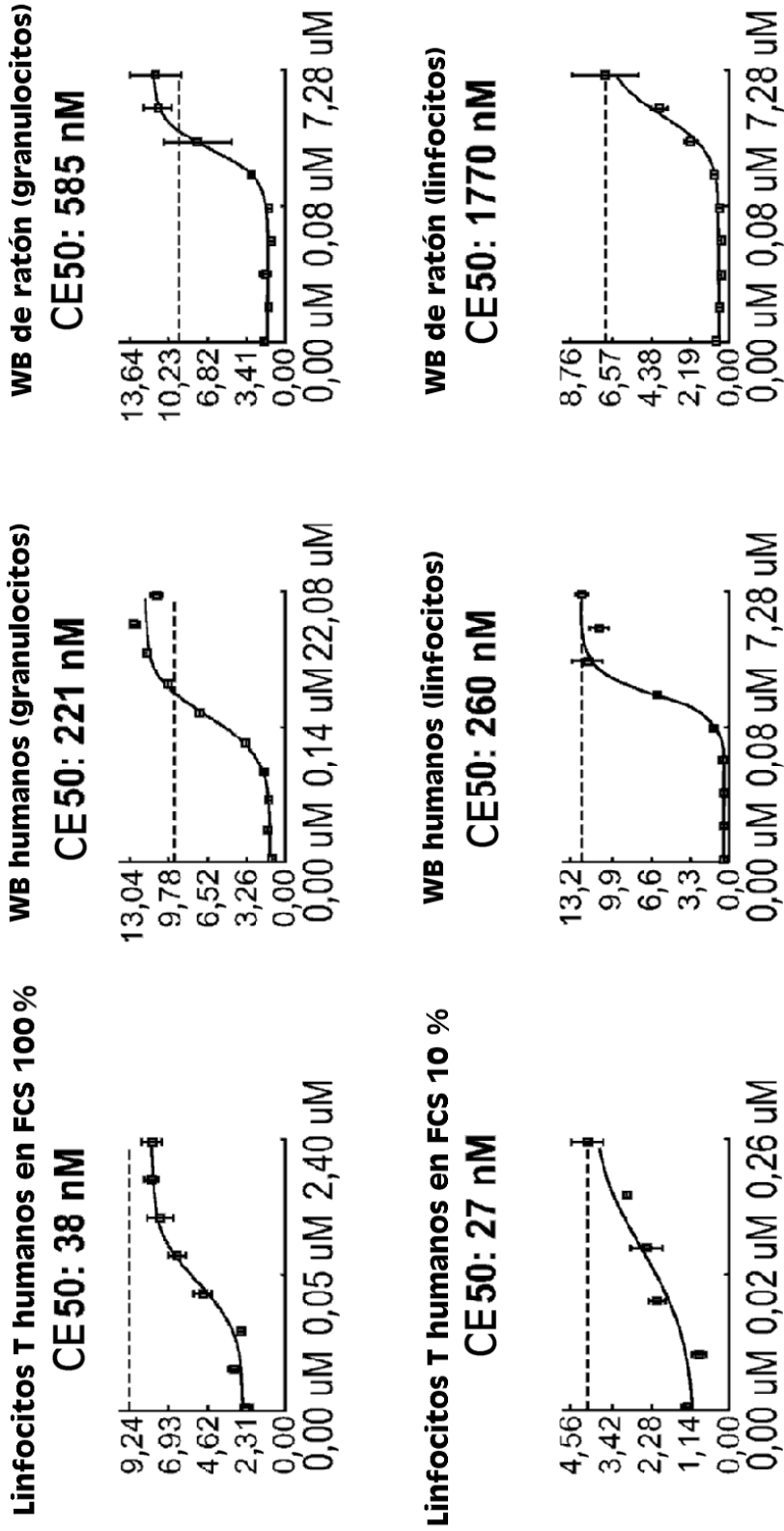


FIG. 5

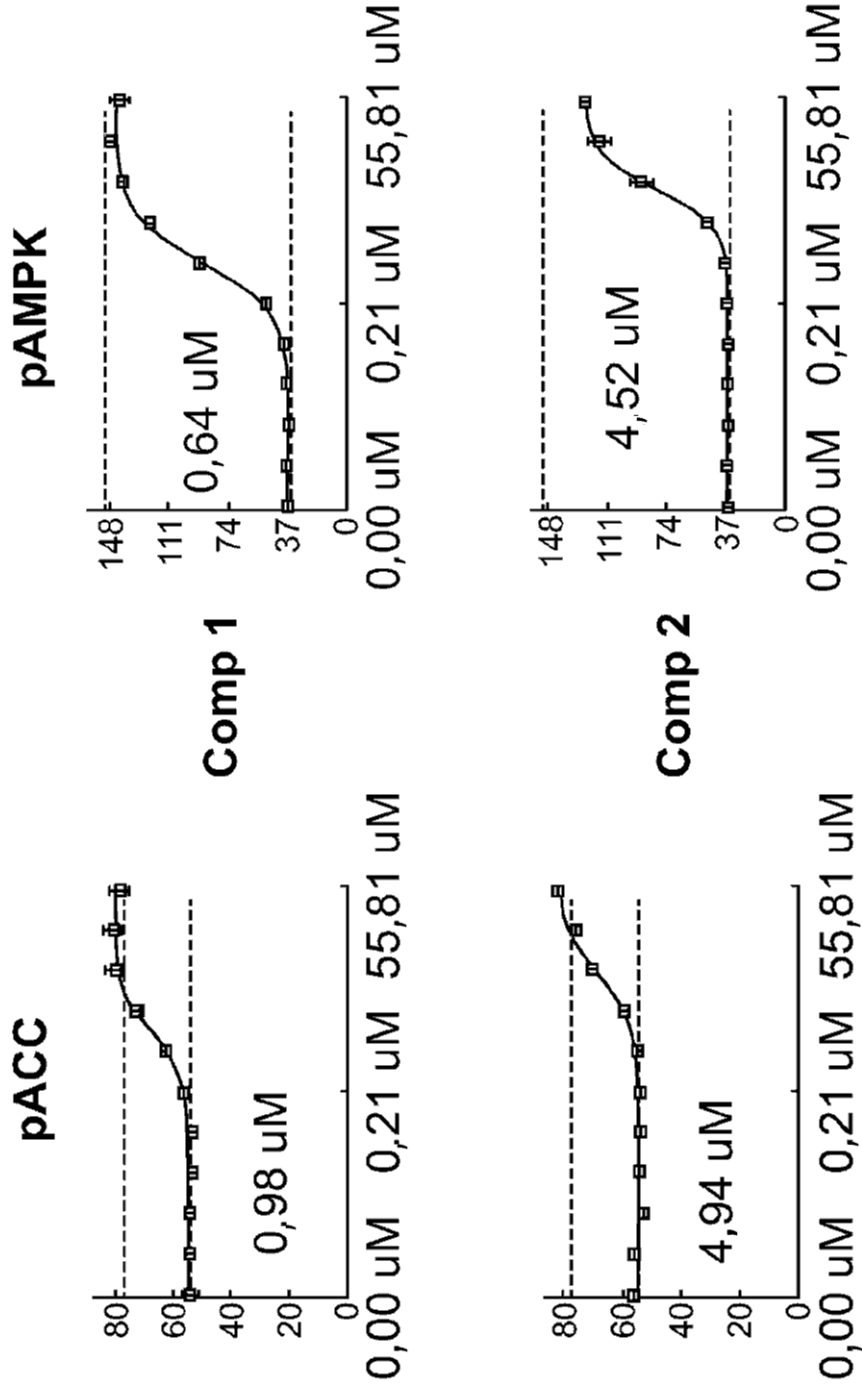


FIG. 6

Linfocitos

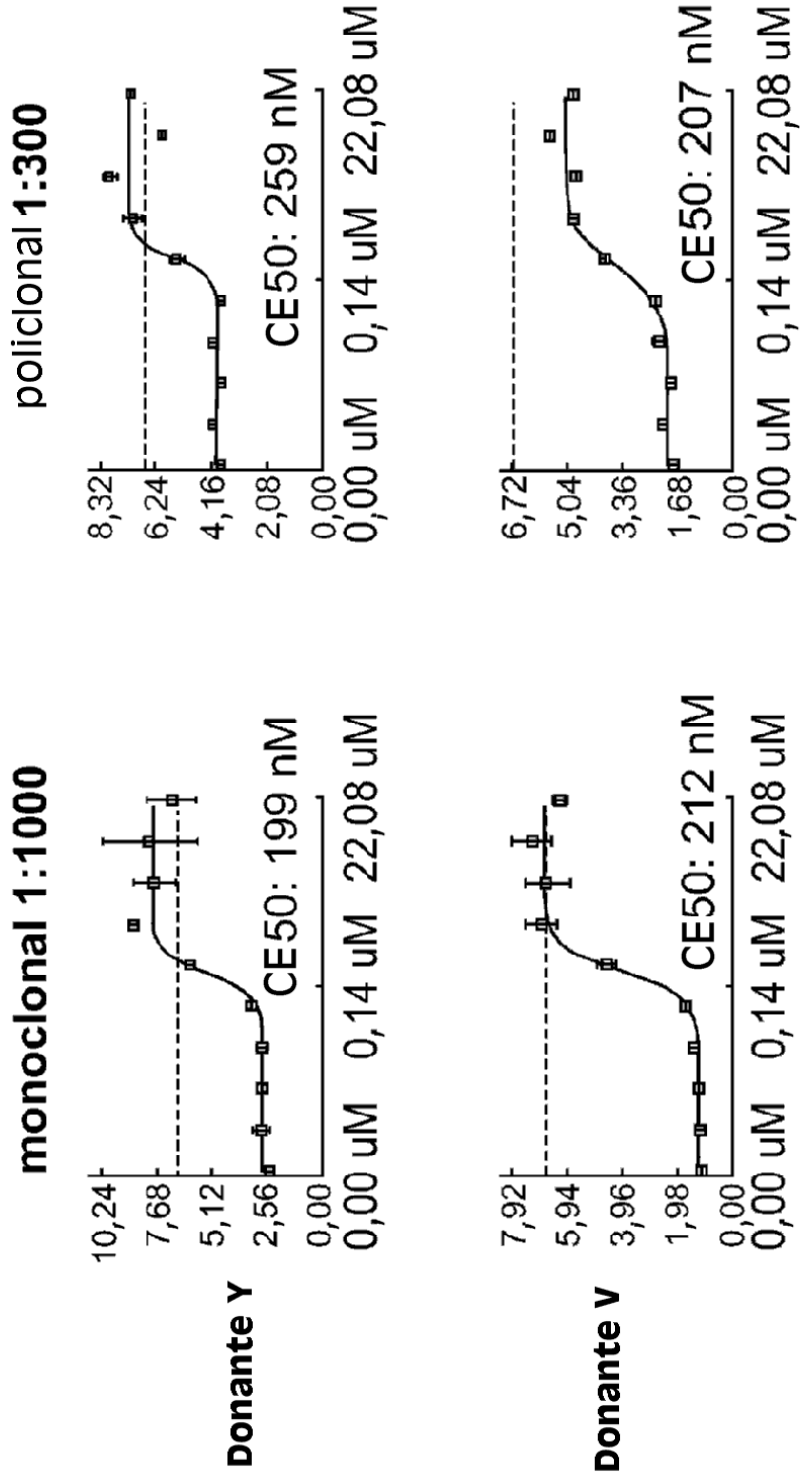
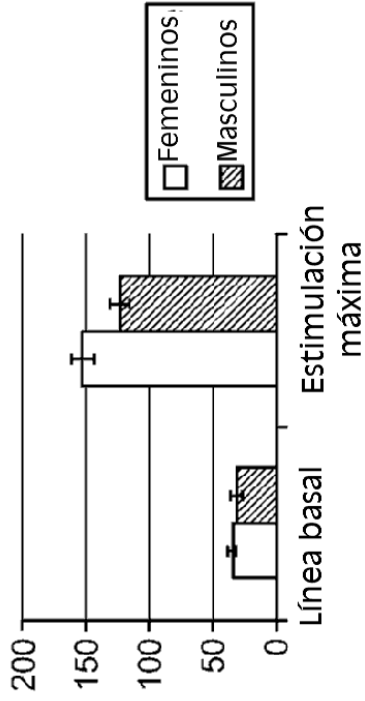


FIG. 7

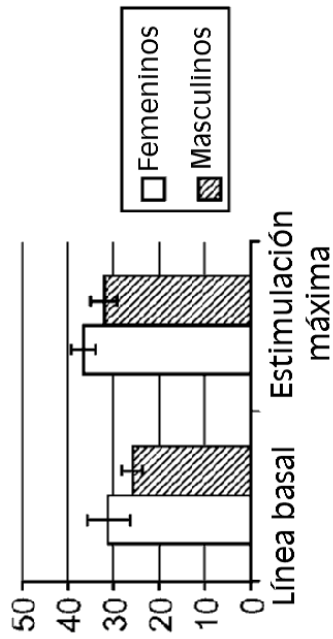
Sexo	Donante	CE50 pAMPK, μM						CE50 pACC, μM					
		Linfocitos		Granulocitos				Linfocitos		Granulocitos			
		Comp I	Comp 2	Comp I	Comp 2	Comp I	Comp 2	Comp I	Comp 2	Comp I	Comp 2	Comp I	Comp 2
Femenino	Donante 1	0,01	0,348	0,003	0,19	0,015	0,244	0,015	0,244	0,015	0,244	ND	ND
Femenino	Donante 2	0,042	0,346	0,026	0,202	0,049	0,245	0,049	0,245	0,049	0,245	ND	ND
Femenino	Donante 5	0,033	0,422	0,03	0,314	0,029	0,459	0,029	0,459	0,029	0,459	ND	ND
Masculino	Donante 3	0,038	0,466	0,032	0,337	0,023	0,777	0,023	0,777	0,023	0,777	ND	ND
Masculino	Donante 4	0,022	0,411	0,017	0,3	0,045	0,462	0,045	0,462	0,045	0,462	ND	ND
Masculino	Donante 6	0,034	0,396	0,034	0,315	0,038	0,437	0,038	0,437	0,038	0,437	ND	ND
	Promedio	0,030	0,398	0,024	0,276	0,033	0,437	0,033	0,437	0,033	0,437	ND	ND
	Error típico	0,005	0,021	0,005	0,028	0,006	0,087	0,006	0,087	0,006	0,087	ND	ND
	Promedio femenino	0,028	0,372	0,020	0,235	0,031	0,316	0,031	0,316	0,031	0,316	ND	ND
	Promedio masculino	0,031	0,424	0,028	0,317	0,035	0,559	0,035	0,559	0,035	0,559	ND	ND

FIG. 8A

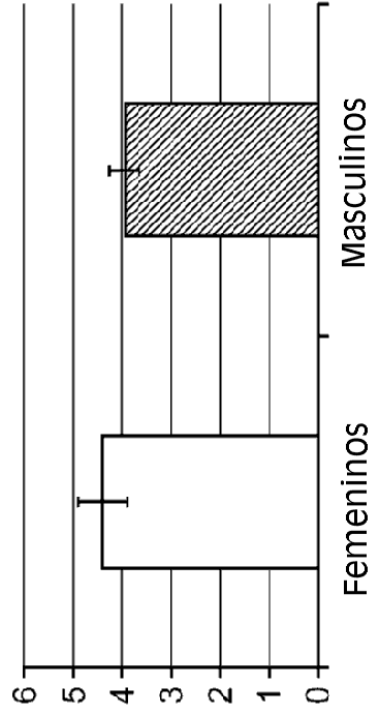
Niveles promedios absolutos de pAMPK a.u.



Niveles promedios absolutos de pACC, a.u.



ventana de pAMPK, factor



ventana de pACC, factor

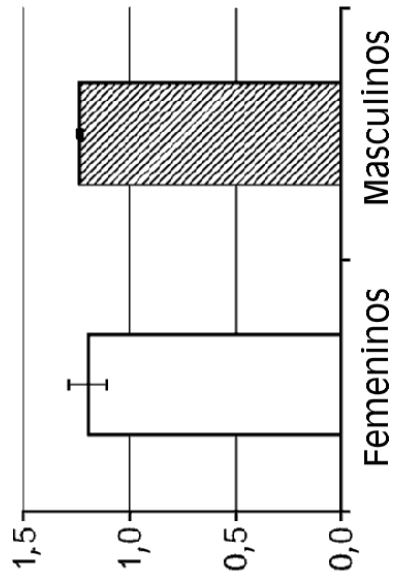


FIG. 8B

Niveles de pAMPK absolutos individuales

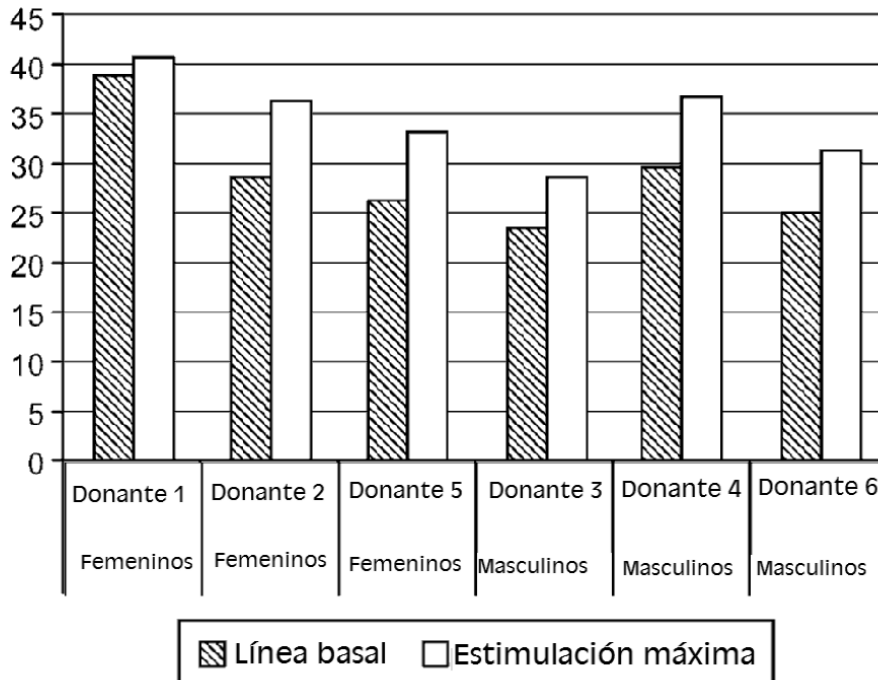
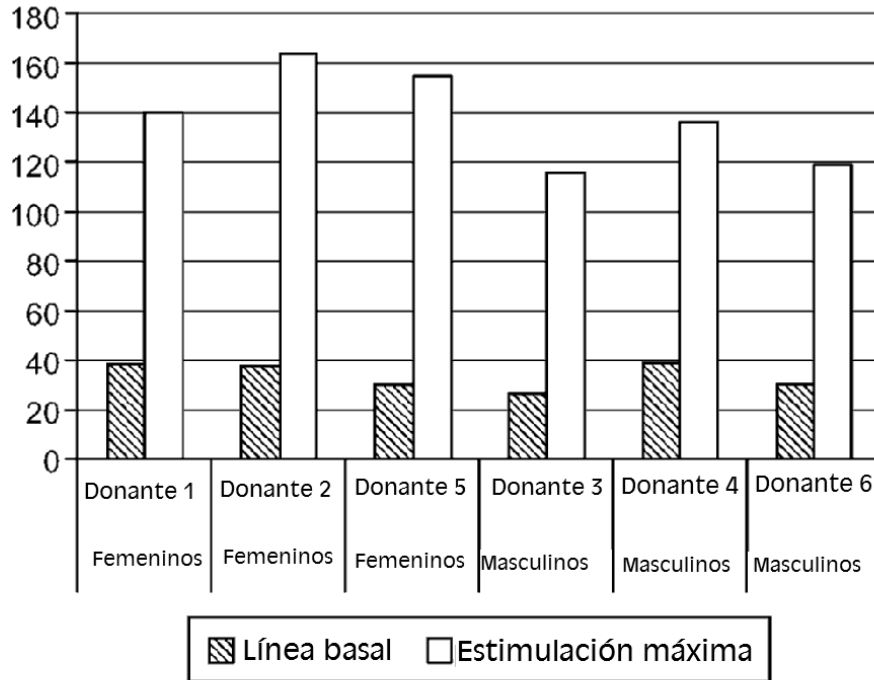


FIG. 8C

Granulocitos

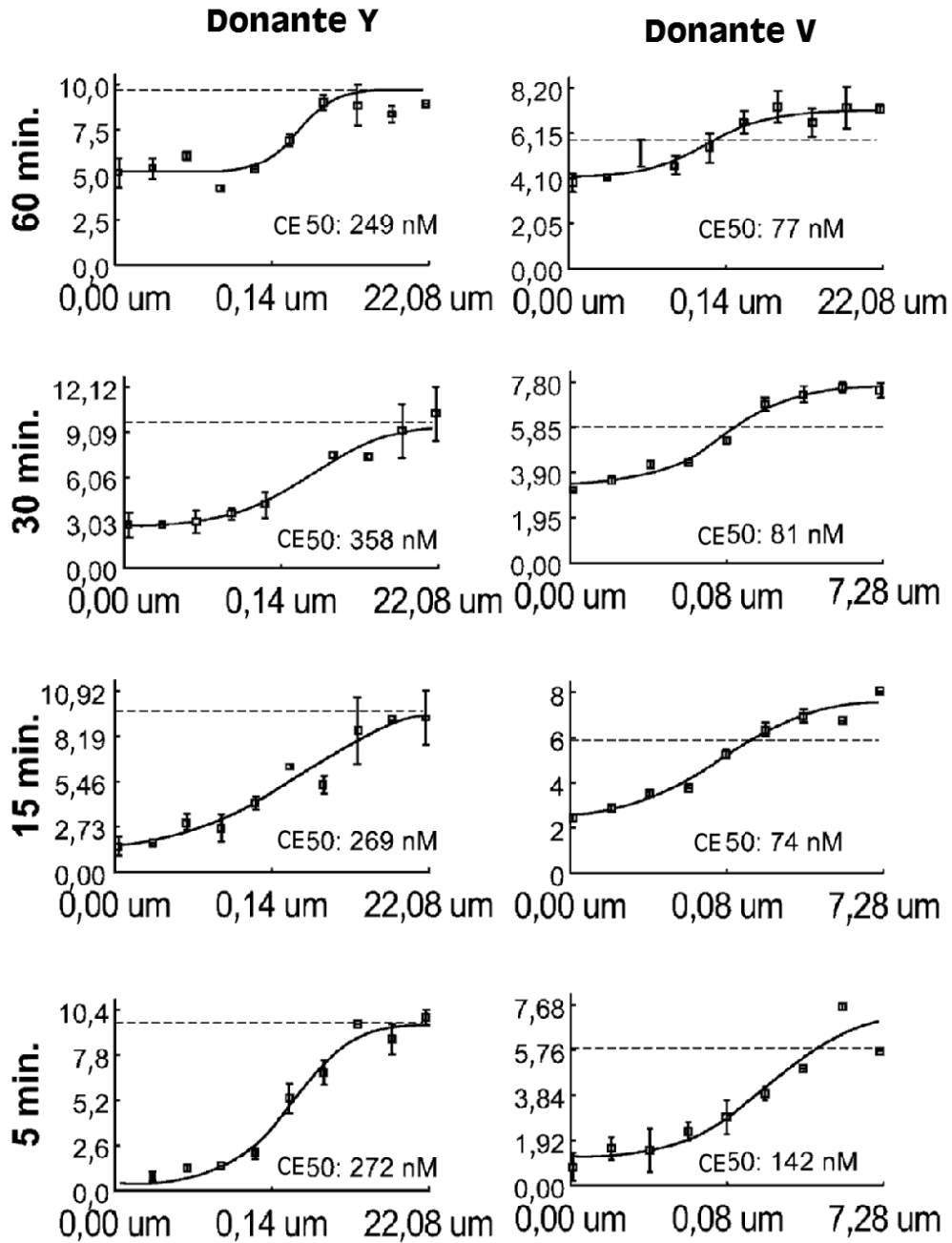


FIG. 9

Linfocitos

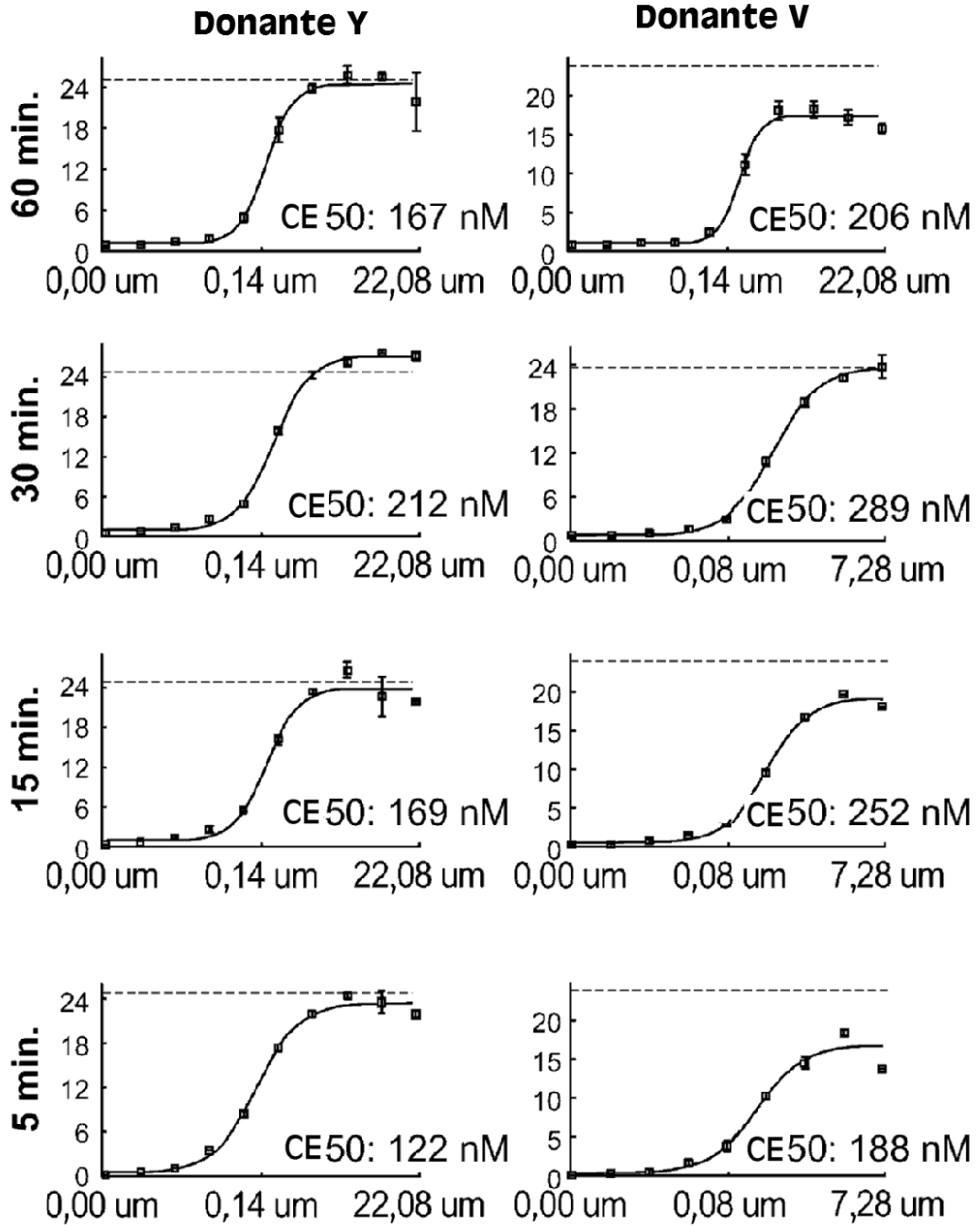


FIG. 9 (Cont.)

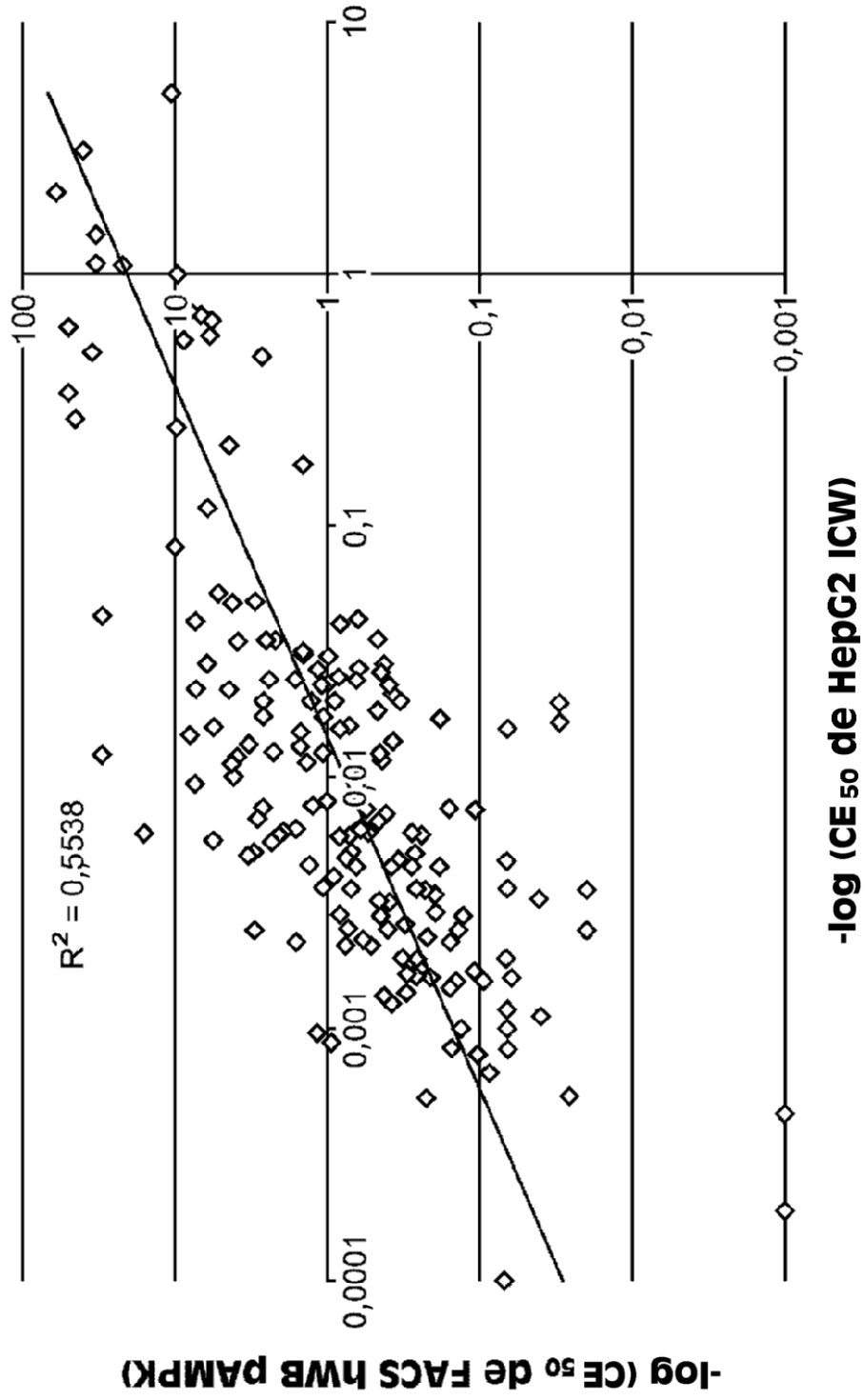
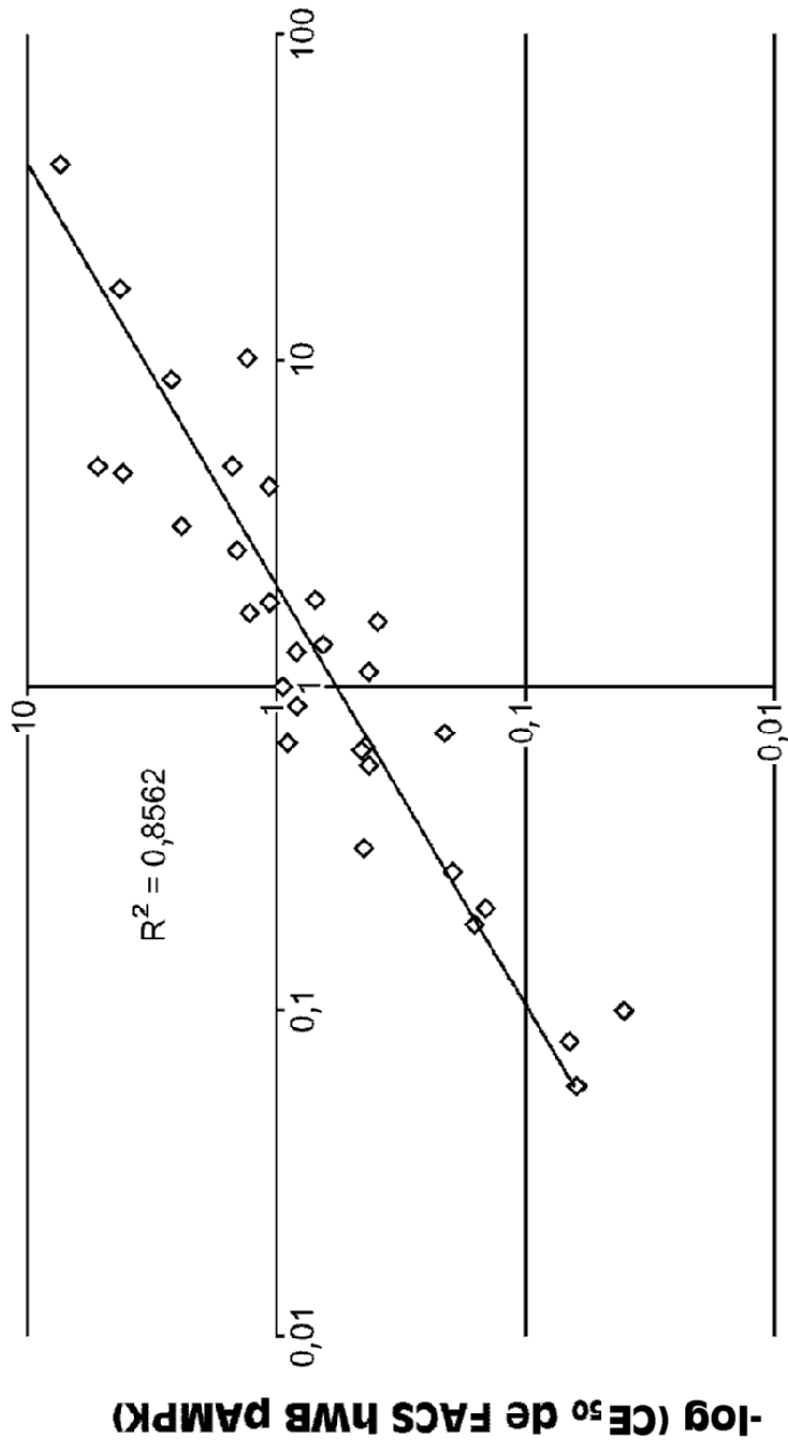


FIG. 10



$-\log (CE_{50} \text{ de FACS hWB pACC})$

FIG. 11

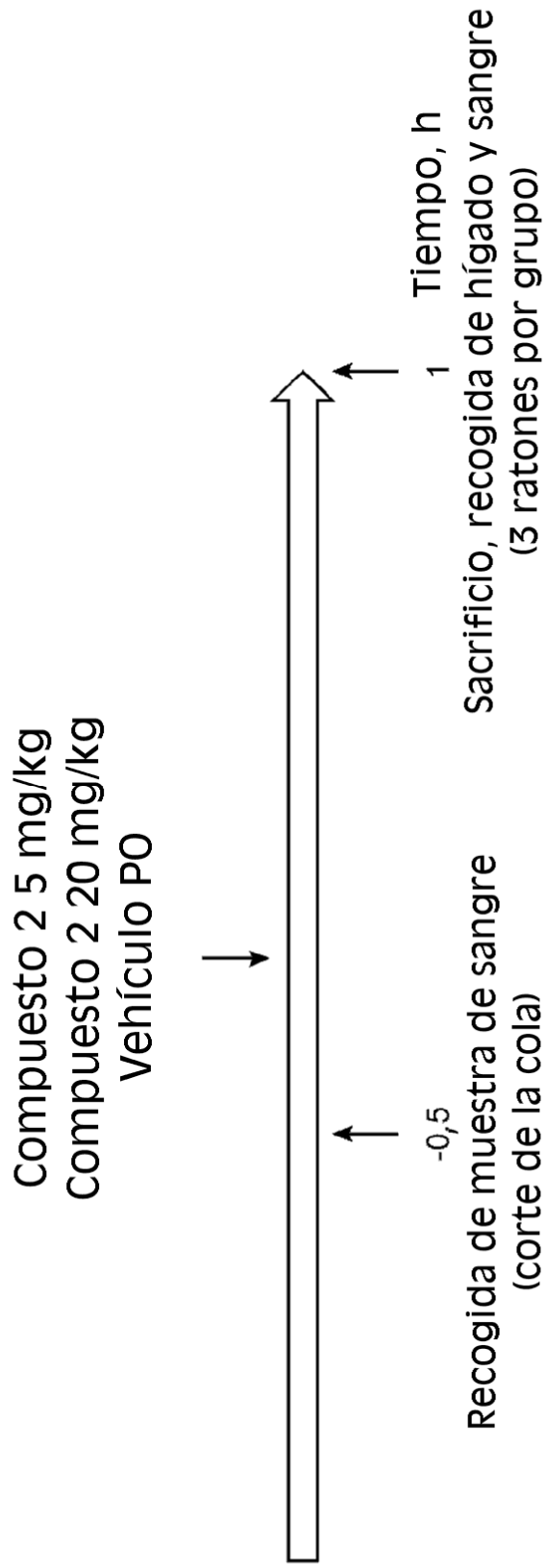


FIG. 12

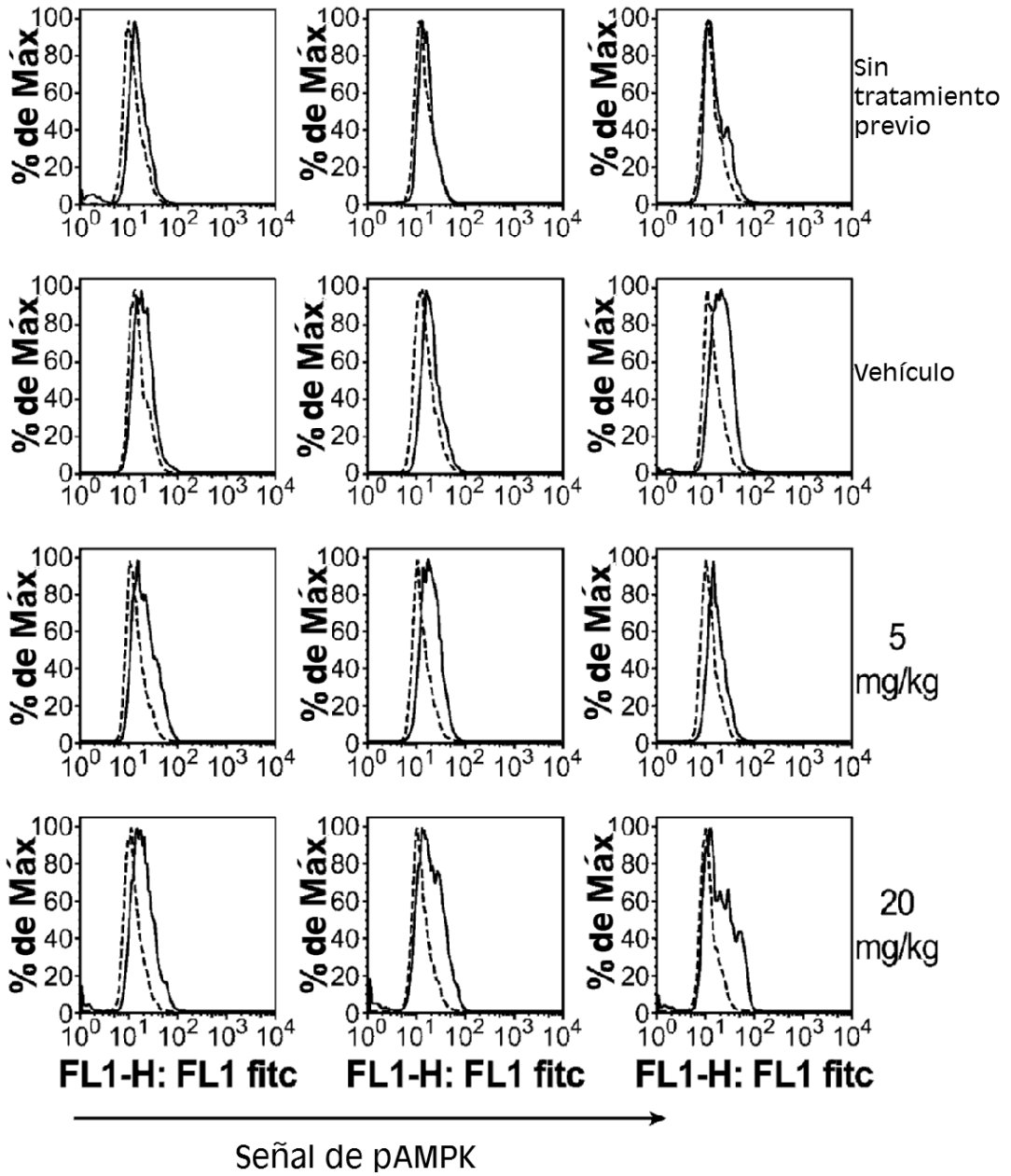


FIG. 13

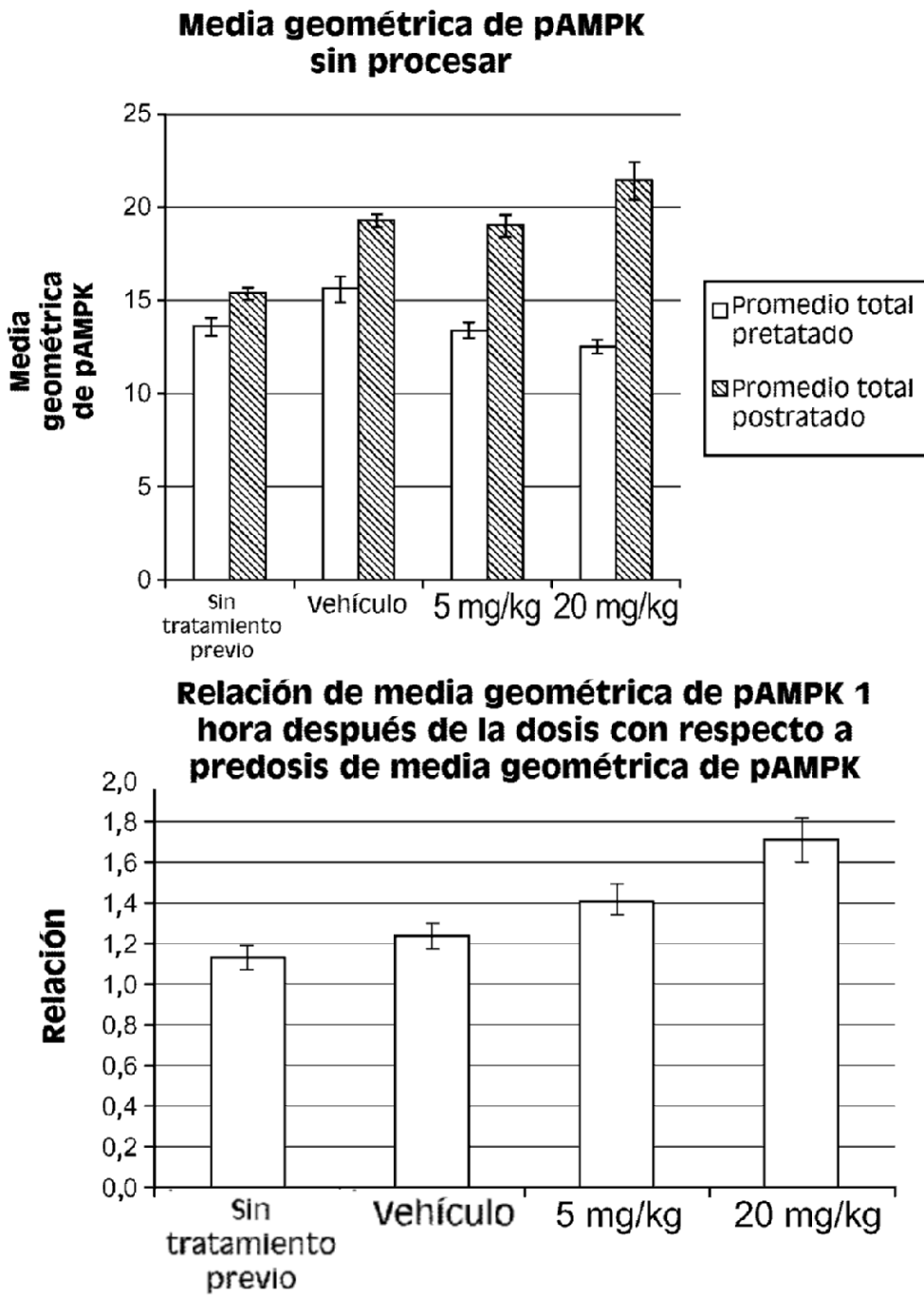


FIG. 14

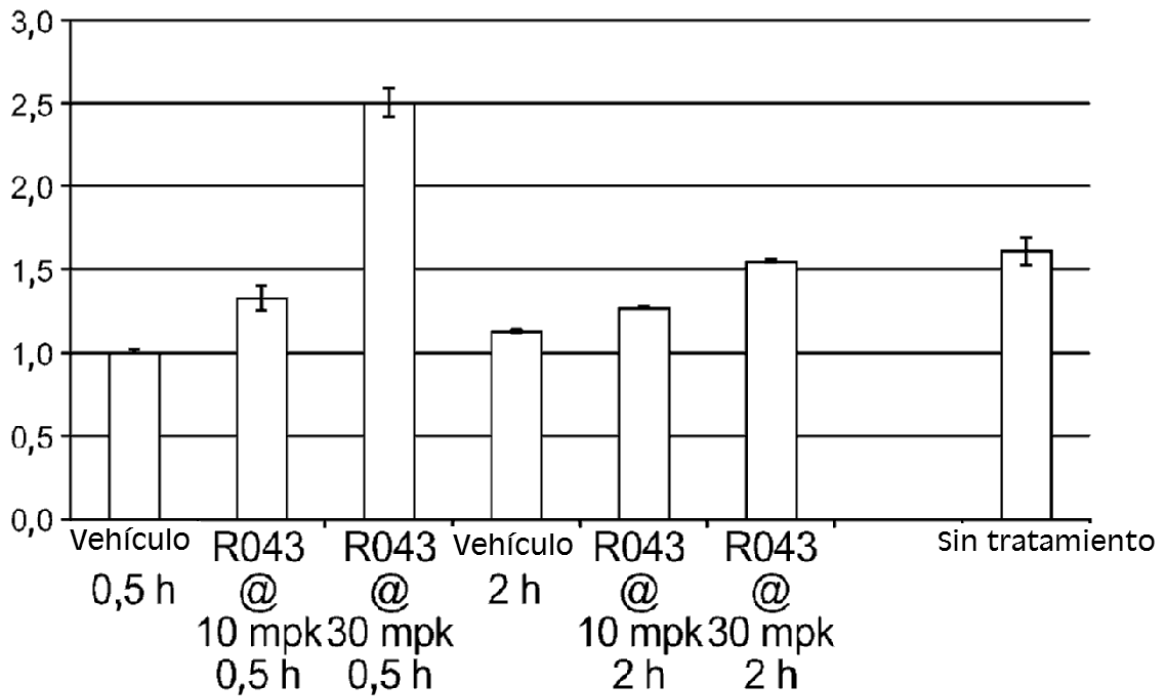
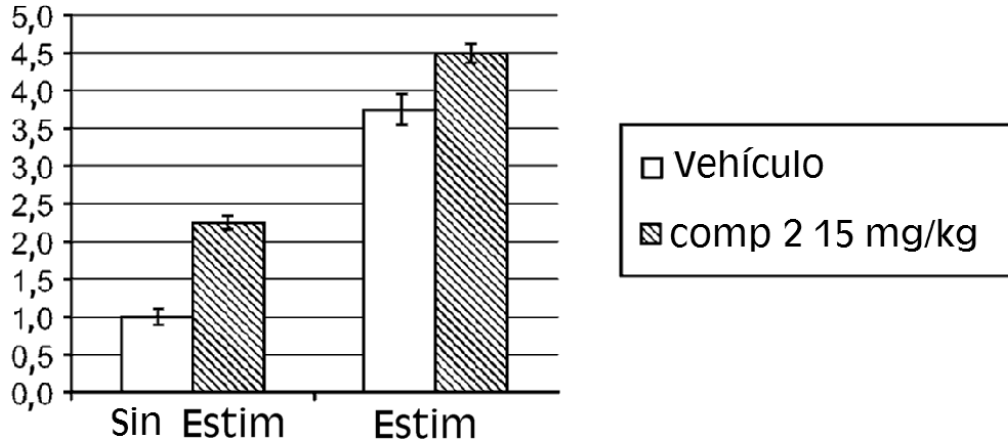


FIG. 15

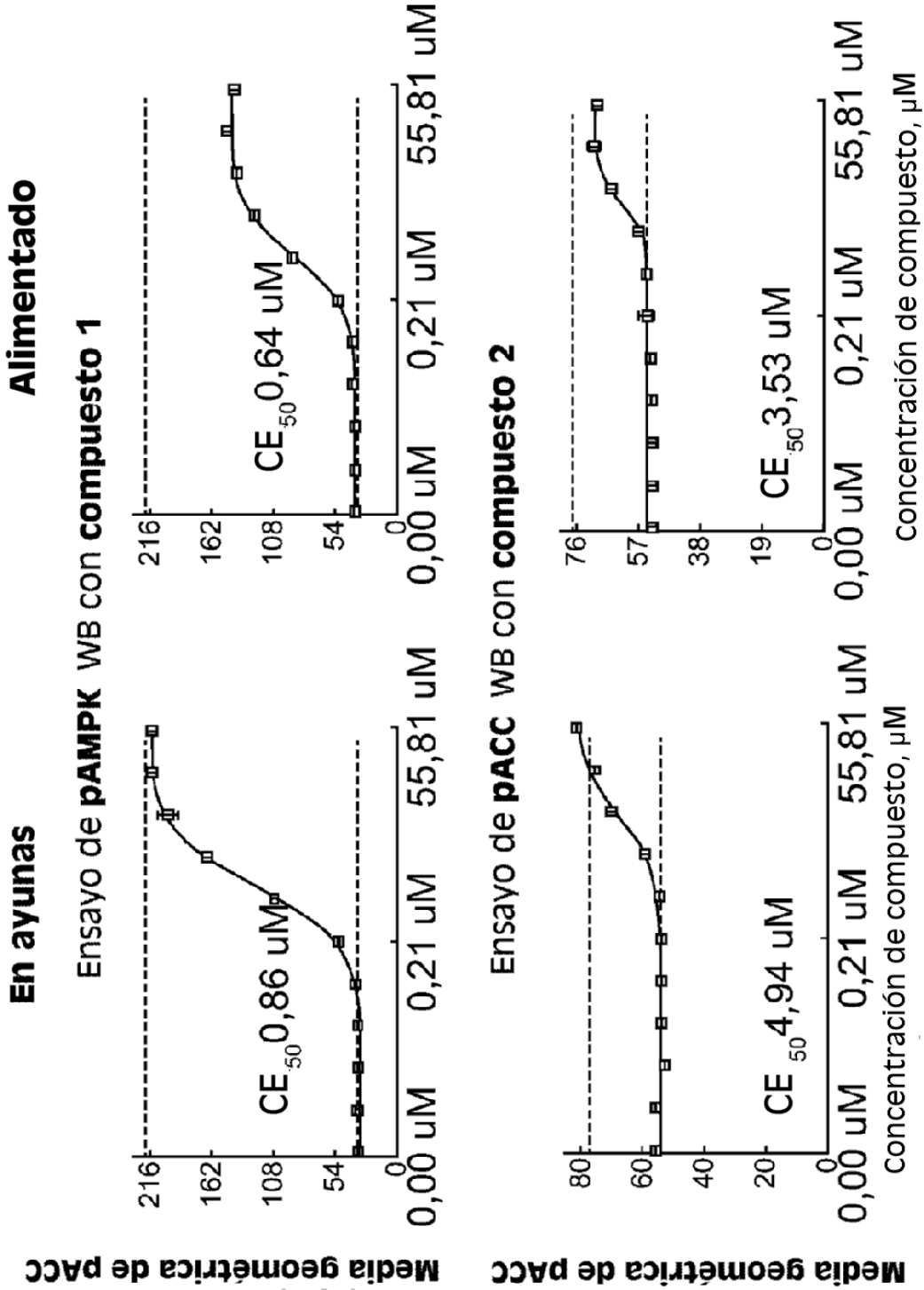


FIG. 16A

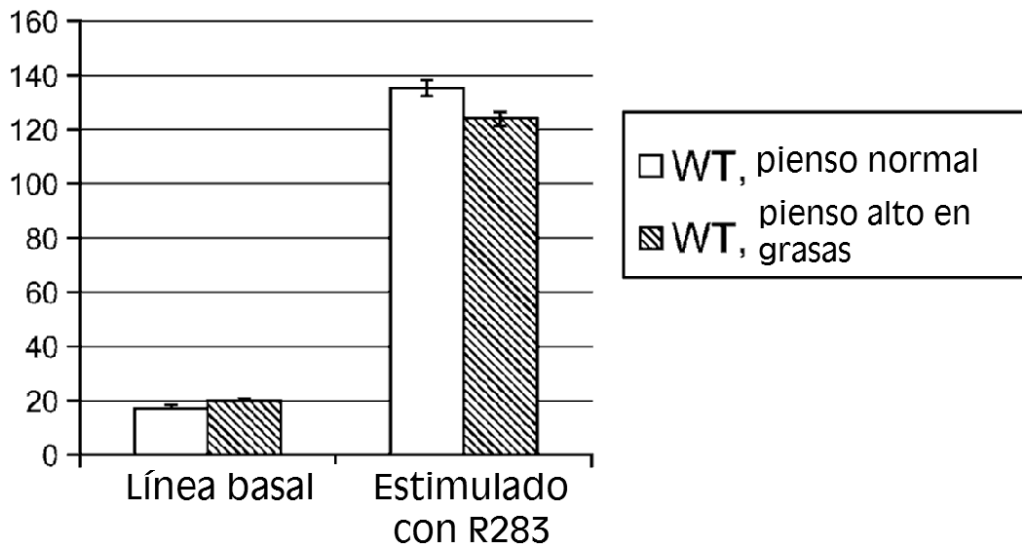
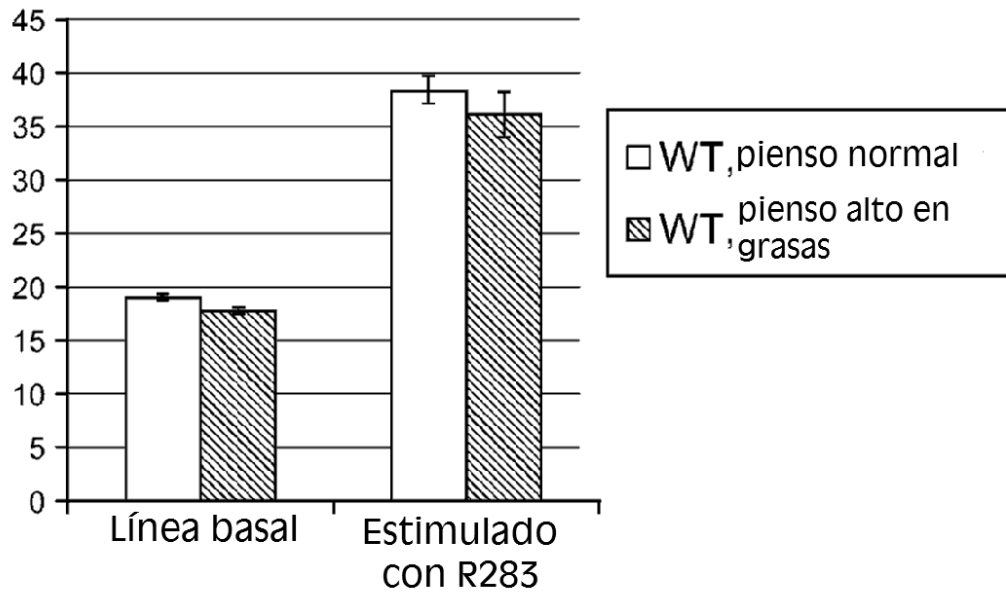


FIG. 16B

Plan experimental

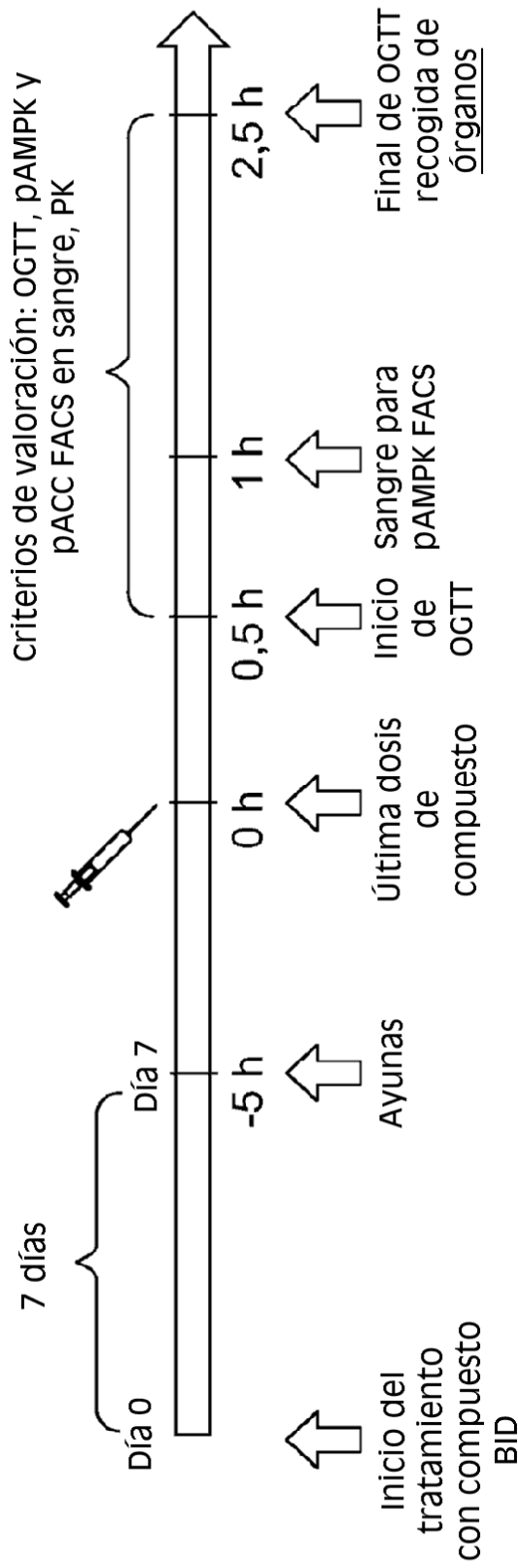


FIG. 17A

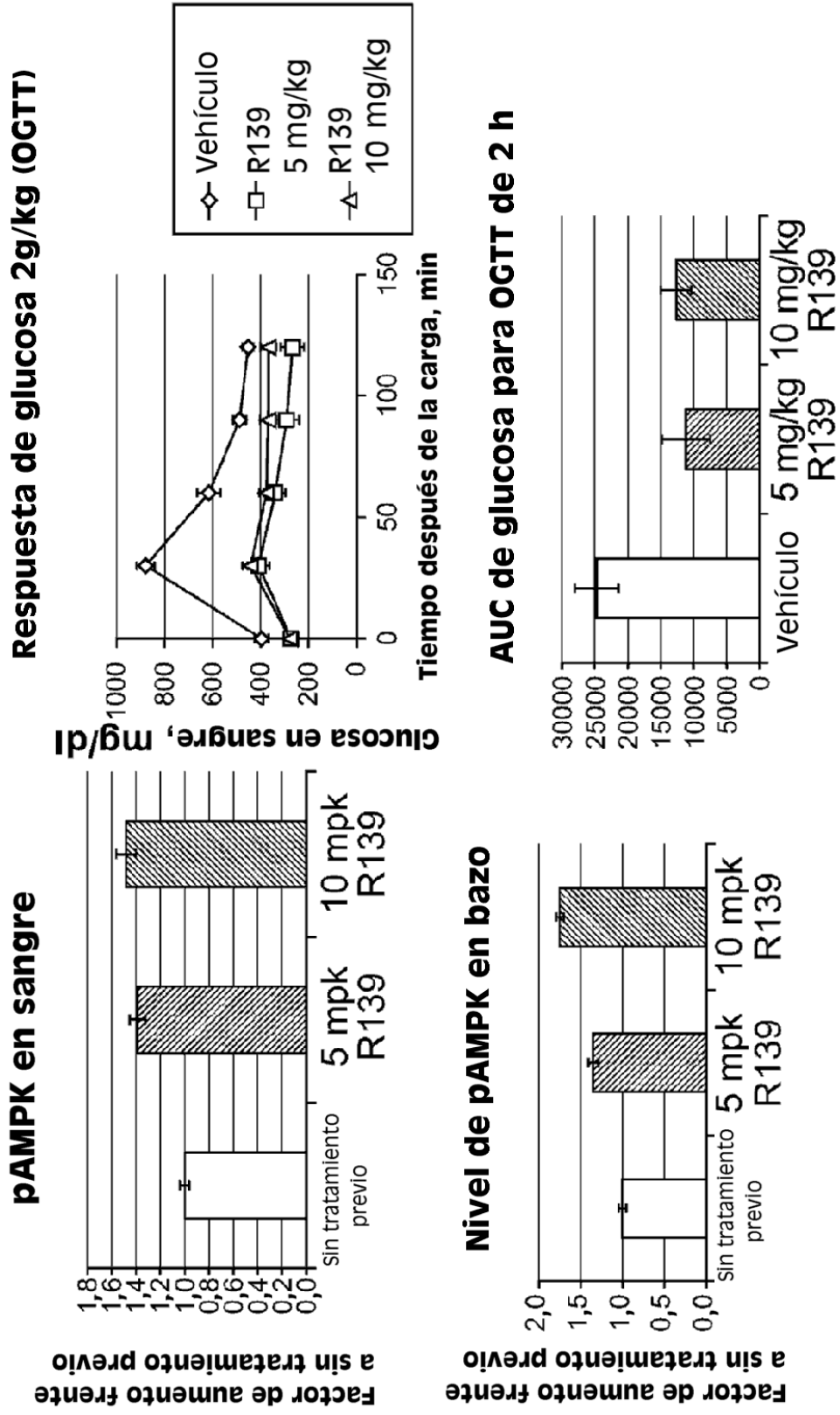


FIG. 17B