

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 588**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07F 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2010 PCT/GB2010/051421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11024006**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2010 E 10760749 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2470672**

54 Título: **Compuestos para detectar proteasas**

30 Prioridad:

26.08.2009 GB 0914883

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2017

73 Titular/es:

**THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST
(100.0%)
University Road
Belfast, Antrim BT7 1NN, GB**

72 Inventor/es:

**MARTIN, STELLA LORRAINE y
WALKER, BRIAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 609 588 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

Compuestos para detectar proteasas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y compuestos para detectar biomarcadores, particularmente proteasas activas, por ejemplo serina-proteasas activas. Además, la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos en la detección y/o inhibición de biomarcadores, a un método para detectar un estado patológico, por ejemplo inflamación y un a kit que comprende dicho compuesto.

Fundamento de la invención

10 Las serina-proteasas son una de las clases de enzimas más ampliamente estudiadas: esto se debe en gran parte a sus funciones bien caracterizadas, generalizadas y diversas en un hospedante de procesos fisiológicos y patológicos. Muchas afecciones son causadas por una disfunción en la regulación exquisita normal de la actividad de estas enzimas proteolíticas, dando como resultado la destrucción anormal de tejidos y/o el procesamiento anómalo de otras proteínas y péptidos. Por ejemplo, la actividad de la serina-proteasa denominada elastasa de neutrófilos (abreviadamente en lo sucesivo NE por la expresión inglesa *Neutrophil Elastase*), normalmente está estrictamente controlada por una variedad de inhibidores naturales, tales como la alfa₁-antitripsina (AAT), el inhibidor secretorio de proteasa leucocitaria (abreviadamente SLPI por la expresión inglesa *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) y la elafina; sin embargo, en la inflamación crónica tal como la encontrada dentro del pulmón en la fibrosis quística (abreviadamente CF por la expresión inglesa *Cystic Fibrosis*), esta proteasa supera las defensas naturales de los tejidos, y la actividad no controlada resultante está implicada en la destrucción tisular, una respuesta inmune alterada y finalmente un deterioro pulmonar. De hecho, se ha demostrado que la NE como biomarcador de infección e inflamación está correlacionada con la gravedad de otras varias enfermedades respiratorias, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la bronquiectasia (Mayer-Hamblett et al., 2007, Fujimoto et al., 2005, Tsang et al., 2000). También se ha encontrado que la NE está elevada en el fluido de la grieta gingival y por lo tanto tiene valor como biomarcador de la enfermedad periodontal (Loos and Tjoa, 2005).

25 Las serina-proteasas también han estado implicadas como biomarcadores en una variedad de cánceres. Por ejemplo, las kalikreinas (KLK) de tejidos humanos que representan el mayor grupo de serina-proteasas y de las cuales el antígeno específico de la próstata (PSA) es la mejor conocida, han atraído una atención particular como biomarcadores para cribado, diagnóstico, pronóstico y monitorización de enfermedades malignas (Paliouras et al., 2007). Otras serina-proteasas implicadas en episodios asociados a tumores, tales como angiogénesis, invasión y metástasis, incluyen uroquinasa y activadores del plasminógeno tisular

30 Actualmente, las proteasas activas se miden predominantemente utilizando sustratos cromogénicos o fluorogénicos que requieren experiencia técnica e instrumentación costosa. Además, estos sustratos carecen de selectividad cuando se usan con muestras biológicas en bruto que contienen una batería de enzimas con múltiples proteasas proteolíticas e hidrolíticas. Estos ensayos requieren que las muestras sean procesadas, lo que implica el uso de instrumentación costosa.

35 Otros métodos de detección incluyen inmunoensayos que requieren tiempo y mano de obra intensiva y debido a su costo, requieren que las muestras se distribuidas en lotes para su análisis, dando como resultado la conservación a largo plazo de muestras y el impacto negativo de los ciclos de congelación/descongelación en la integridad de las proteínas. Además, estos ensayos solo miden las proteínas totales y no pueden diferenciar entre enzimas activas y latentes.

40 Por lo tanto, debido a la falta de un sistema de detección rápido y fácil para el usuario, las proteasas no se pueden analizar en la clínica y rara vez se analizan en laboratorios de hospitales.

45 De hecho, aunque se ha establecido la importancia de la NE en la patogénesis de la enfermedad respiratoria neutrofílica y se entiende que la determinación habitual de la NE en la clínica proporcionaría una información bioquímica importante que ayudaría al tratamiento del paciente, la NE solo se mide en muestras de las vías respiratorias como un punto final en estudios de investigación y en pruebas clínicas que evalúan la eficacia de las intervenciones terapéuticas. En estos casos, las muestras se transfieren a laboratorios de investigación contratados para su procesamiento, conservación y posterior análisis.

50 Hasta principios de los años noventa del siglo XX, las investigaciones sobre la asociación de la NE a la enfermedad periodontal incluía colocar tiras que contenían un sustrato fluorogénico (Prognostiks, Dentsply) directamente en la grieta gingival (Eley and Cox, 1998). Los sustratos fluorogénicos utilizados incluyen MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-7-amido-trifluoro-metilcumarina (AFC), que fue desarrollado por la compañía Enzyme System Products (ahora MP Biomedicals) para Dentsply. Este método no era suficientemente sensible y también era inconveniente para el paciente. Otro sistema de ensayo, basado de nuevo en el sustrato fluorogénico detallado anteriormente e impregnado en discos, no se desarrolló comercialmente (Cox et al., 1990).

55 Otros métodos actualmente disponibles para medir proteasas, tales como la NE emplean el formato ELISA (Ensayo

con inmunosorbente unido a enzima). Por ejemplo, para medir la NE, se determina un complejo de NE-alfa₁-antitripsina (AAT o α_1 PI) (Bender Medsystems and Biovendo). El AAT es el inhibidor endógeno de la NE, y en condiciones normales una cantidad de NE-AAT está correlacionada con una cantidad de NE liberada. Sin embargo, en las enfermedades neutrofilicas, el AAT está sobrepasado por la carga excesiva de NE, y se puede medir la NE activa libre en comparación con individuos sanos, donde no se puede detectar actividad debido a la inhibición efectiva. Por lo tanto, la medición de los complejos NE-AAT solo daría una indicación de la NE inhibida que, como ya está secuestrada, no puede causar daño al entorno del tejido circundante, ya sea las encías en la enfermedad dental o ya sean los pulmones en la CF. La medición importante tiene que ser la de la actividad elastinolítica no controlada. Esto está bien documentado en la bibliografía.

La sociedad Calbiochem ofrece actualmente un ensayo ELISA para NE activa que está en el mercado en la forma de un kit para análisis de actividad denominado *Innozyme™ NE Immunocapture*. Utilizando un anticuerpo monoclonal de captura para la NE, la falta de especificidad de la etapa posterior que emplea un sustrato es compensada a medida que se elimina por lavado el resto de la muestra bruta. El principal inconveniente es que la etapa que emplea sustrato requiere un período de incubación mínimo de 4 horas hasta 24 horas a 37°C, lo que hace que este ensayo consuma tiempo y sea impracticable para su uso, particularmente en los laboratorios de clínicas u hospitales.

Se han descrito previamente sondas de fosfonatos para dirigir las a la familia de las serina-hidrolasas, y se han desarrollado sondas selectivas que se dirigen específicamente a la serina-proteasa similar a tripsina basada en sondas derivadas de fosfato de difenilo (DPP) (Hawthorne et al., *Anal. Biochem.* 326 (2004) 273-275, Pan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2882-2885). Sin embargo, serían útiles sondas alternativas para ayudar a una mejor comprensión de la actividad de las enzimas proteasas en las muestras que se han de analizar y los ensayos correspondientes.

Sumario de la invención

Los inventores han desarrollado compuestos específicos de proteasas y métodos nuevos y rápidos para dirigirlos a proteasas, es decir, detectarlas y/o inhibirlas, en una amplia variedad de muestras que tienen diferentes complejidades, particularmente serina-proteasas activas. Dichas proteasas son valiosas en diagnóstico y pronóstico, por ejemplo para detectar un estado patológico, tal como inflamación.

En particular, el compuesto es capaz de unirse establemente a las especies de proteasas dianas activas, etiquetando de este modo las proteasas dianas presentes, por ejemplo en mezclas complejas que comprenden diversas especies de proteínas, tales como sol de esputo, lavado broncoalveolar y fluidos de sitios de inflamación o similares.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

El compuesto comprende:

un grupo de unión capaz de unirse establemente al biomarcador,

un grupo de reconocimiento específico para el biomarcador,

un grupo espaciador,

un resto de succinilo, y

un grupo indicador.

El resto de succinilo enlaza el grupo de reconocimiento con el grupo espaciador. Aunque los inventores no desean estar limitados por la teoría, se cree que el resto de succinilo actúa ventajosamente como un segundo grupo de reconocimiento para la proteasa específica. En particular, se cree que facilita la formación de interacciones esenciales de enlace por puentes de H entre el compuesto y la proteasa en virtud del enlace amídico formado entre la funcionalidad amínica del fosfato de difenilo y uno de sus dos grupos carboxilo.

Dicho resto de succinilo también puede actuar como unidad espaciadora para facilitar la interacción entre, por ejemplo, el conjugado estreptavidina-HRP y el resto de biotina para mejorar la "relación señal a ruido" del ensayo.

Adicionalmente, el resto o grupo de succinilo puede permitir que el compuesto de la presente invención sea generado sobre una fase sólida en comparación con la generación en solución. La capacidad de los compuestos de la presente invención para ser formados sobre una fase sólida proporciona una ventaja importante sobre los compuestos usados para analizar biomarcadores que solamente se pueden formar en solución.

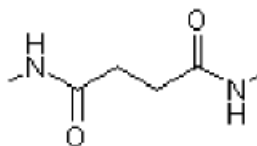
En particular, se cree que es posible la síntesis en fase sólida de los compuestos deseados de actividad dirigida al sitio activo, incluyendo la derivatización "en resina" con el grupo indicador de biotina y la incorporación de la unidad espaciadora pegilada. La incorporación en fase de solución de biotina en péptidos es frecuentemente lenta y necesita el uso de exceso de biotina para llevar la reacción a su término. Esto, a su vez, significa que se necesita una purificación extensa para obtener el producto deseado libre de biotina contaminante no unida. La omisión del resto de succinilo evitaría el anclaje del fosfonato de difenilo en el soporte de fase sólida, eliminando así la opción para la

síntesis acelerada en fase sólida del compuesto.

El resto de succinilo se puede unir al biomarcador específico, en particular cuando el biomarcador es una proteasa, preferiblemente la serina-proteasa activa.

5 Además, el succinilo hace que la sonda de actividad sea más resistente a la degradación por peptidasas que están presentes en las matrices biológicas sobre las cuales se realizan los análisis de proteasas, por ejemplo los análisis de elastasa de neutrófilos. Se sabe que las peptidasas son altamente eficaces en la degradación de péptidos compuestos totalmente por alfa-aminoácidos. Su acción degradante se reduce grandemente cuando el péptido contiene un aminoácido no proteogénico, tal como homo-beta-aminoácidos. El resto de succinilo difiere de un alfa-aminoácido en dos aspectos importantes no contiene una función NH, ni tiene un carbono alfa reconocible, puesto que estructuralmente es más análogo a un homo-beta-aminoácido.

10 En algunas realizaciones el resto de succinilo puede ser $\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse haciendo reaccionar, por ejemplo anhídrido succínico con la porción amínica del aminoácido del grupo de reconocimiento específico para formar derivados de succinilo, de tal modo que cuando se enlaza la porción de enlace del grupo de unión específico con el grupo espaciador puede ser representada por:



15 Como se apreciará, durante la síntesis de los compuestos, el grupo de unión succinilado y de reconocimiento se pone en contacto con el grupo espaciador, por ejemplo el grupo PEG, para permitir la reacción. Esto puede formar la conexión entre el los grupos de reconocimiento y espaciador.

20 La proteasa puede ser una serina-proteasa activa. Típicamente, la serina-proteasa puede ser una proteasa similar a elastasa, por ejemplo elastasa de neutrófilos (NE) o similar, una proteasa similar a tripsina, por ejemplo la mayoría de las KLK, o una proteasa similar a quimotripsina, por ejemplo PSA, KLK-7 y KLK-9 o similar. De acuerdo con una realización, la serina-proteasa puede ser una proteasa derivada de neutrófilos, tal como elastasa de neutrófilos, catepsina G, proteinasa-3 o similar. Preferiblemente, la serina-proteasa es NE.

25 Aunque se han descrito previamente derivados de clorometilcetona como inhibidores útiles de serina-proteasas, en contraste con los compuestos de la presente invención dichos derivados de clorometilcetona exhiben una falta de especificidad y alta inestabilidad.

30 Ventajosamente, los compuestos de la presente invención pueden ser altamente específicos para detectar una proteasa. Además, los compuestos de la presente invención pueden ser potentes a concentraciones micromolares, estables en solución, incluso a temperatura ambiente, y tienen una vida útil prolongada. Esto permite realizar ensayos robustos y fiables, produciendo resultados altamente reproducibles. Los compuestos de la presente invención pueden tener altas especificidad y estabilidad. Además, los compuestos de la presente invención pueden ser capaces de actuar como inhibidores irreversibles, dependientes del tiempo, de biomarcadores, en particular biomarcadores de proteasas.

35 Un compuesto de la presente invención comprende un grupo indicador enlazado al resto de succinilo por un grupo espaciador. El resto de succinilo está enlazado al grupo de reconocimiento específico que está enlazado al grupo de unión. Los distintos grupos están enlazados directamente. Esta disposición es preferible tanto para la captura eficaz de la proteasa como para la descripción/detección del grupo indicador. Sin pretender estar limitado por la teoría, se considera que cualesquiera otras combinaciones/enlaces perjudican la captura y la descripción del biomarcador proteasa. En la presente memoria descriptiva, los términos "resto de succinilo" y "grupo succinilo" pueden usarse indistintamente.

40 El resto de succinilo enlaza el grupo de reconocimiento y el grupo espaciador. El resto de succinilo es altamente preferido con el fin de permitir que el compuesto de la presente invención se genere en una fase sólida en comparación con la generación en fase de solución más difícil químicamente. El resto de succinilo puede proporcionar un punto de fijación entre el grupo de reconocimiento específico del inhibidor y el grupo enlazador amínico que está presente en muchas resinas que típicamente formarían la fase sólida. La capacidad de los compuestos de la presente invención para ser formados en una fase sólida proporciona una ventaja importante sobre los compuestos usados para analizar proteasas que sólo se pueden formar en solución. La provisión del grupo succinilo en los compuestos de la presente invención significa que la síntesis de los compuestos es típicamente acelerada.

45 El grupo de unión se une selectivamente a la proteasa. Típicamente, el grupo de unión puede ser un grupo aminofenilfosfinato o un grupo difenilfosfonato. Dicho grupo de unión generalmente se une selectivamente a una proteasa activa por la explotación de su actividad catalítica inherente. Se apreciará que dichos grupos pueden ser capaces de

unirse covalentemente de forma irreversible al biomarcador proteasa y, de este modo, pueden discriminar claramente entre proteasas activas e inactivas.

5 Ventajosamente, el compuesto de la presente invención que comprende un grupo de unión difenilfosfonato o monofenilfosfinato carece de la capacidad de unirse a proteínas distintas de la proteasa diana, es decir, proteínas colaterales que residen en la muestra y, en consecuencia, el compuesto de la presente invención proporciona una actividad inhibidora pronunciada con respecto a la proteasa exclusivamente, en particular el biomarcador serina-proteasa activa.

Ventajosamente, en realizaciones el grupo de unión puede comprender un grupo monofenilfosfinato.

10 Si el grupo de unión es un grupo monofenilfosfinato, el compuesto de la presente invención exhibirá quiralidad. El compuesto puede ser un epímero (R) y (S) puesto que hay varias opciones para la localización del grupo o grupos indicadores (véase la Figura 4). Anteriormente, se emplearon compuestos racémicos puesto que las metodologías de síntesis eran incapaces de conseguir la inducción quiral. Esto era un inconveniente puesto que los epímeros (R) y (S) (con respecto a la configuración del carbono α) de dichos derivados pueden presentar diferentes actividades inhibitorias. Los inventores han mostrado ahora que cuando el compuesto de la presente invención comprende un grupo de unión monofenilfosfinato, el confórmero (R) posee una actividad inhibidora superior. Una parte activa que proporciona dicha actividad fue estudiada por Walker et al., 2000. En las realizaciones, el grupo de unión puede ser un confórmero R de monofenilfosfinato. Además, el análogo de fosfinato exhibe propiedades mejoradas en comparación con su correspondiente difenilfosfonato en la activación de su biomarcador diana. Por lo tanto, un grupo de unión monofenilfosfinato será también una entidad útil para la incorporación en la construcción de la sonda.

20 Como se describe en la presente memoria, el grupo de reconocimiento específico puede ser un grupo peptídico, por ejemplo, aminoácidos colocados en una posición P1 y/o P2 como se conoce convencionalmente en la técnica, etc. Preferiblemente, cuando el biomarcador proteasa diana es NE, el grupo peptídico puede ser un grupo valilo; cuando el biomarcador diana es una proteasa similar a la quimotripsina, el grupo peptídico puede ser un grupo fenilalanilo; y cuando el biomarcador diana es una proteína de tipo tripsina o kalikreina, el grupo peptídico puede ser un grupo lisilo o arginilo. Como se apreciará, otros grupos peptídico pueden estar presentes en P1 o P2 (o P1' o P2' en el caso de monofenilfosfinatos) para aumentar la especificidad. Se apreciará que el grupo peptídico se puede seleccionar basándose en la información conocida en relación con las especificidades de subsitios de proteasas, por ejemplo, Valil-prolil-valilo para elastasa.

30 El grupo de reconocimiento específico, que permite la elaboración de las especificidades P2-P3, se puede conectar al grupo de unión a través de cualquier enlace químico adecuado. Cuando el grupo de unión es un grupo monofenilfosfinato o un grupo difenilfosfonato, el grupo de reconocimiento específico está típicamente conectado al grupo de unión a través de un éster fenílico.

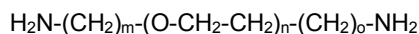
35 Como se ha discutido en la presente memoria, el grupo indicador puede ser cualquier grupo que pueda ser detectado directa o indirectamente, por ejemplo física, química y/o bioquímicamente. En particular, puede ser cualquier residuo químico, grupo, hapteno o antígeno adecuado. Por ejemplo, el grupo indicador puede comprender biotina, 2,4-dinitrofenol o uno de sus derivados o uno o más hapteno(s) o antígeno(s).

40 En los compuestos reivindicados, el grupo indicador es un resto de biotina. Como se apreciará, el resto de biotina puede ser específicamente capturado por estreptavidina. Además, la estreptavidina puede estar inmovilizada sobre una matriz sólida adecuada, que puede estar en forma de una placa, perla, película, membrana, lámina, chip, disco, matriz, nanopartícula, nanotubo de carbono o similar. La matriz se puede formar a partir de un material seleccionado de plásticos, vidrio, metal, agarosa, nitrocelulosa, polímero, silicio (oblea), carbono o similar

45 Como se describe en la presente memoria descriptiva, el grupo indicador puede comprender un resto de 2,4-dinitrofenilo, que puede ser detectado por un anticuerpo correspondiente, o el grupo indicador puede comprender un hapteno o antígeno adecuado, por ejemplo, His-Tag, FLAG-Tag, ferroceno, rodamina, rojo de Texas, proteína fluorescente verde (abreviadamente GFP por sus iniciales en inglés), glutatión-S-transferasa (GST) o similar, que puede ser detectado por un anticuerpo correspondiente. Como se apreciará por un experto en la técnica, puede usarse cualquier grupo indicador convencional adecuado.

Como se ha discutido en la presente memoria, el grupo espaciador puede comprender al menos un residuo de poli-etilenglicol (PEG), adecuadamente más de un residuo de PEG.

50 Cuando el grupo espaciador comprende uno o más residuos de PEG el grupo espaciador puede tener una estructura como la mostrada en las Figuras 1-5. El uno o más residuos de PEG pueden tener la estructura:



en donde $n= 1, 2, 3, 4, 5, 6,$ y m y o se seleccionan independientemente de 1-6 etc.

Como se ha discutido en la presente memoria el espaciador puede ser un PEG derivatizado con amino por ejemplo seleccionado o derivado de:

ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico

ácido 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico

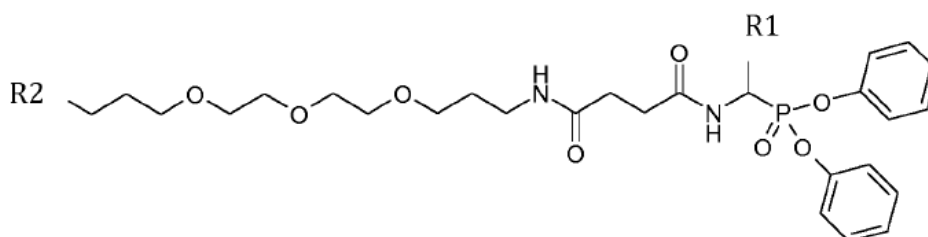
5 ácido 15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoico

ácido 18-amino-4,7,10,13,16-pentaoxaoctadecanoico

ácido 21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoico

en donde el compuesto de la invención se forma por una reacción de condensación entre el resto de succinilo y la función amínica del espaciador

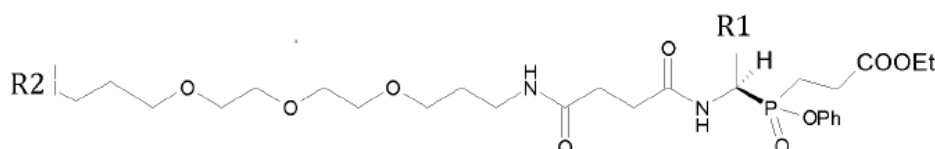
10 Como se ha discutido en la presente memoria un compuesto tiene la estructura:



en donde R1 puede ser H o cualquier cadena lateral de aminoácido adecuada o uno de sus derivados, y

en donde R2 puede ser cualquier grupo indicador adecuado, por ejemplo. un grupo biotínico o un grupo 2,4-dinitrofenilo, un resto de aminoácido, un grupo péptido o similar

15 Como se ha discutido en la presente memoria el compuesto tiene la estructura:



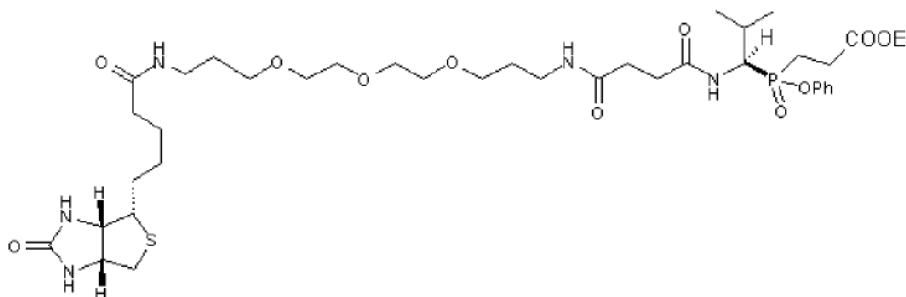
donde R1 puede ser H o cualquier cadena lateral de aminoácido adecuada o uno de sus derivados, y

donde R2 puede ser cualquier grupo indicador adecuado, por ejemplo, un grupo biotínico o un grupo 2,4-dinitrofenilo, un resto de aminoácido, un grupo péptido o similar.

20 Como se apreciará los derivados adecuados deben ser capaces de proporcionar la unión selectiva del compuesto de la invención con el biomarcador, preferiblemente la proteasa, por ejemplo la serina-proteasa de interés. Será conocido en la técnica, qué derivados se pueden usar en tal posición en lugar de, o además de, los residuos de aminoácidos en R1.

25 El compuesto puede ser un resto de biotina-PEG-succinilo-Phe-difenilfosfonato, un resto de biotina-PEG-succinilo-Val-difenilfosfonato o un resto de biotina-PEG-succinilo-Lys-difenilfosfonato, según la reivindicación 1.

Ventajosamente, el compuesto de la presente invención tiene la siguiente estructura:



Alternativamente, el compuesto de la presente invención puede tener la estructura que se ha mostrado anteriormente en la que el grupo Valilo está reemplazado por un grupo fenilalanilo, un grupo lisilo o un grupo arginilo.

5 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método según la reivindicación 2,

En particular, la proteasa puede ser una serina-proteasa activa. Típicamente, la serina-proteasa puede ser una proteasa similar a elastasa, por ejemplo elastasa de neutrófilos (NE) o similar, una proteasa similar a tripsina, por ejemplo la mayoría de las KLK o una proteasa similar a quimotripsina, por ejemplo PSA, KLK-7 y KLK-9 o similar. Según una realización, la serina proteasa puede ser una proteasa derivada de neutrófilos tal como elastasa de neutrófilos, catepsina G, proteinasa-3 o similar. Preferiblemente, la serina-proteasa es NE.

La muestra es una muestra biológica que puede proceder de una célula, tejido, órgano, fluido corporal, fluido derivado de una cavidad corporal y/o un sitio potencialmente patológico, por ejemplo un sitio de inflamación potencial, malignidad o similar, un fluido de lavado o similar

15 Típicamente, el fluido corporal es saliva, sangre, fluido linfático, fluido gingival crevicular, fluido de las vías respiratorias, por ejemplo, esputo inducido o expectorado o lavado broncoalveolar, líquido sobrenadante de un homogeneizado de tejido o preparación celular, fluido fecal, ascitis o fluido de herida o similar. Las células o el tejido pueden tratarse apropiadamente para obtener un fluido, por ejemplo utilizando un tampón, un tampón de lisis celular o similar y maceración, homogeneización y/o centrifugación. El fluido de lavado puede ser adecuadamente fluido de lavado broncoalveolar. El fluido de lavado puede proceder, por ejemplo de la broncoscopia de un paciente con FC, EPOC, cáncer de pulmón, bronquiectasia u otra enfermedad crónica o aguda de las vías respiratorias.

20 El fluido procedente de un sitio potencialmente patológico puede ser adecuadamente fluido crevicular gingival de pacientes con enfermedad periodontal. Es particularmente preferible determinar las serina-proteasas derivadas de neutrófilos en el fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal, ya que estas proteasas están asociadas con enfermedad periodontal.

25 Si un fluido y/o tejido procede de un sitio potencialmente patológico, por ejemplo un sitio que muestra malignidad se detectan preferiblemente kalikreina y/o activador de plasminógeno.

Adicionalmente, la muestra biológica, por ejemplo esputo, puede ser adecuadamente tratada, por ejemplo lavada con tampón y sometida a vórtice, lisada, homogeneizada, centrifugada, al menos parcialmente fraccionada, al menos parcialmente purificada o similares. La sangre puede ser fraccionada para obtener plasma o suero.

30 La cantidad de compuesto que ha de añadirse depende del tipo de muestra biológica y la proteasa que se ha de detectar. Típicamente, para la detección de una proteasa activa se añaden 1 a 10 μ L de una solución 10 mM del compuesto por mL de muestra biológica acuosa; más adecuadamente se añaden 5 μ L de una solución 10 mM del compuesto por mL de una muestra biológica acuosa.

35 El tiempo transcurrido entre el mezclamiento de la muestra y el compuesto y la detección del complejo detectable depende de la cantidad de muestra que se ha de determinar y de la proteasa activa que se ha de detectar. Típicamente, el tiempo transcurrido será de 5 minutos a 1 hora, adecuadamente menos de 30 minutos.

40 El método de la presente invención proporciona por tanto un método de detección y/o inhibición de biomarcadores de proteasas dianas rápido, práctico y fiable. Esto permite la detección habitual de proteasas, por ejemplo en clínicas y laboratorios de hospitales.

45 De acuerdo con una realización de un método de la invención que utiliza un compuesto de la invención, el método para la detección comprende el uso de un ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA). Típicamente, el complejo detectable es capturado por contacto con un sustrato que comprende un grupo de captura que se une al complejo detectable inmovilizándolo sobre el sustrato. Típicamente, el grupo de captura se puede unir al grupo indicador. Adecuadamente, en una realización, el sustrato se puede recubrir con un grupo de captura que comprende estrepta-

vidina y el grupo indicador es biotina. Se puede usar cualquier sustrato adecuado, tal como placa(s), perlas, disco, partículas, matrices o similares. El complejo del compuesto de la invención y la proteasa en donde el complejo está unido a un sustrato se pueden detectar, por ejemplo, por inmunodetección usando un conjugado anticuerpo-enzima específico para la proteasa, por ejemplo la proteasa activa.

- 5 En realizaciones, el anticuerpo de detección por ejemplo, en el caso de un ensayo de elastasa sería anti-elastasa (de especie, por ejemplo de neutrófilos humanos) y podría ser un anticuerpo monoclonal o policlonal que contenga un conjugado enzimático, tal como peroxidasa de rábano silvestre (HRP), fosfatasa alcalina (AP) o similares. La cuantificación de la proteasa activa unida se realizaría por lo tanto a través de la conversión de un sustrato complementario en un producto legible, por ejemplo sustratos cromógenos tales como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB),
10 ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) o dihidrocloruro de *o*-fenilendiamina (OPD) para la conversión por HRP o en el caso de AP, fosfato de *p*-nitrofenilo (PNPP); o cualquier sustrato quimioluminiscente, quimiofluorescente o Raman adecuado para el revelado con HRP.

- 15 Alternativamente, antes o durante el mezclado con el compuesto de la presente invención se puede añadir a la muestra biológica un conjugado de anticuerpo específico no neutralizante (es decir, en donde la unión a la proteasa no interfiere con la exposición del sitio activo de la proteasa al compuesto). De acuerdo con una realización, el anticuerpo y el compuesto de la presente invención se añaden a la muestra biológica en una sola etapa. Por ejemplo, se añaden simultáneamente los reactivos requeridos o se añade una premezcla que comprende los reactivos requeridos. La adición simultánea de los reactivos requeridos reduciría el tiempo total de análisis. La adición simultánea de los reactivos requeridos es particularmente apropiada cuando el anticuerpo no interfiere con el sitio activo de la proteasa. La adición simultánea de los reactivos requeridos también puede ser particularmente apropiada cuando la muestra biológica está en forma de una mezcla bruta, tal como un lisado celular, una mezcla de proteínas parcialmente purificada o similar.

- 25 El complejo del compuesto de la invención y la proteasa puede ser inmovilizado como se ha indicado anteriormente y ser detectado en consecuencia. En general, pueden usarse los mismos métodos de detección independientemente de si el anticuerpo se añade a la mezcla, antes o después de la adición del compuesto de la presente invención. Alternativamente, el soporte/sustrato sólido puede ser recubierto con un anticuerpo no neutralizante específico que se puede usar para inmovilizar la proteasa sobre el soporte sólido. A continuación, el compuesto se puede añadir al ensayo después de una etapa de lavado apropiada para unirse irreversiblemente a la proteasa inmovilizada con anticuerpo y el complejo se puede detectar por la adición de un conjugado apropiado. El grupo indicador en el compuesto es biotina y por lo tanto un conjugado estreptavidina-HRP es capaz de unirse al grupo indicador y el complejo ser cuantificado a través de la conversión de un sustrato de HRP adecuado como se ha indicado anteriormente.

- 30 En realizaciones, el ensayo se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. Alternativamente, el ensayo se puede llevar a cabo a temperaturas elevadas adecuadas, por ejemplo de 30°C a 38°C, por ejemplo aproximadamente 37°C. Se apreciará que los resultados se pueden obtener más rápidamente si la temperatura de reacción es la temperatura de reacción óptima o un valor próximo, generalmente 30 a 38°C, preferiblemente alrededor 37°C.

- 35 Preferiblemente, se lleva a cabo al menos una etapa de lavado adecuada para purificar al menos parcialmente la proteasa. Típicamente, la etapa de lavado se realiza después de la formación, pero antes de la detección del complejo detectable. Puede utilizarse cualquier solución de lavado adecuada conocida por el experto en la técnica, tal como un tampón de lavado, por ejemplo una solución salina tamponada con fosfato o una solución salina tamponada con Tris, que contiene preferiblemente Tween-20 al 0,05% (v/v).

- 40 Dependiendo del sustrato soporte sólido y del mecanismo de captura, es decir, bien por el anticuerpo de captura o por el compuesto, el método puede incluir la etapa de bloquear los sitios no unidos sobre el soporte sólido, típicamente antes de que la muestra se mezcle con el compuesto. Esta etapa puede efectuarse por la adición de un péptido, proteína o mezcla de proteínas adecuados, tal como seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, caseína, gelatina, leche desnatada o similar.

- 45 Preferiblemente, la etapa de detección del complejo detectable se realiza utilizando al menos un sustrato adecuado, preferiblemente un sustrato acuoso, capaz de convertirse en un producto detectable, en particular un producto de color diferente. Según una realización, el sustrato es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) o fosfato de *p*-nitrofenilo. El sustrato se puede convertir por peroxidasa de rábano silvestre o fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina o con un anticuerpo específico.

- 50 Adicional o alternativamente, se pueden usar sustratos fluorogénicos, luminescentes o Raman adecuados. Como se apreciará, dichos sustratos pueden aumentar la sensibilidad de la detección hasta niveles de nanogramos y picogramos.

- 55 El método tiene la ventaja de que es altamente específico, puesto que el grupo de reconocimiento específico del compuesto es reconocido por una secuencia de reconocimiento específica de la proteasa diana. Además, el método proporciona una buena sensibilidad de detección, puesto que el compuesto tiene una alta afinidad para la proteasa diana.

Cuando el método de detección se realiza sobre una muestra de control, se detecta al menos 90 por ciento de la

proteasa presente. Adecuadamente se detecta 95 a 100 por cien de la proteasa presente; ventajosamente se detecta alrededor de 99 por ciento de la proteasa presente.

5 De acuerdo con una realización, el método se puede usar para detectar más de una proteasa en una muestra por el uso de más de un compuesto de la presente invención, en donde cada compuesto de la presente invención añadido a la muestra tiene una afinidad diferente. Típicamente, en una muestra se detecta más de una proteasa. Cada compuesto de la presente invención puede añadirse a la muestra simultánea o secuencialmente.

También se describe un compuesto como se ha descrito anteriormente y a continuación para su uso en la detección y/o inhibición de proteasas, particularmente serina-proteasas activas.

10 También se describe un método para detectar o monitorizar un estado patológico en un sujeto, que comprende las etapas de:

proporcionar una muestra del sujeto,

15 Incubar la muestra con un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para unir la proteasa, en particular una serina-proteasa diana activa, con el fin de formar un complejo detectable y determinar la cantidad de proteasa en la muestra por análisis de la cantidad del complejo detectable presente, comparando la cantidad de proteasa en la muestra con un nivel normal de proteasa en dicha muestra, y en donde un nivel elevado de la proteasa comparado con un nivel normal es indicativo de un estado patológico.

20 La proteasa puede ser una serina-proteasa activa. Típicamente, la serina-proteasa puede ser una proteasa similar a la elastasa, por ejemplo elastasa de neutrófilos (NE) o similar, una proteasa similar a tripsina, por ejemplo la mayoría de las KLK, o una proteasa similar a quimotripsina, por ejemplo PSA, KLK-7 y KLK-9 o similar. De acuerdo con una realización, la serina-proteasa puede ser una proteasa derivada de neutrófilos, tal como elastasa de neutrófilos, cathepsina G, proteinasa-3 o similar. Preferiblemente, la serina-proteasa es NE.

25 El aumento porcentual de la proteasa depende de la proteasa diana, así como de la naturaleza del estado patológico. Típicamente, la cantidad de proteasa activa está aumentada en al menos 10 veces en comparación con el nivel normal y puede exceder de 100 veces dependiendo de la enfermedad y estado de salud del paciente. Típicamente, las proteasas activas no se detectan en individuos sanos a niveles tan elevados. Por ejemplo, las proteasas activas generalmente no se detectan en los pulmones de individuos sanos.

El nivel normal de proteasa puede estar en un intervalo, en cuyo caso la cantidad de proteasa en la muestra se compara con el valor superior del intervalo normal.

30 Un aumento de 5 veces o más de la proteasa es generalmente indicativo de un estado patológico. Típicamente los estados patológicos pueden estar asociados a un aumento de hasta 100 veces o más.

35 De acuerdo con una realización, el estado patológico es inflamación, incluyendo enfermedades de las vías respiratorias, tales como fibrosis quística (Mayer-Hamblett et al., 2007), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Djekic et al., 2009), bronquiectasia, enfisema, deficiencia congénita de alfa₁-antitripsina y trastornos respiratorios agudos (abreviadamente ARDS por la expresión inglesa *Acute Respiratory Distress*) (Hayakawa et al., 2010); aterosclerosis (Henriksen and Sallenave, 2008), pancreatitis (Frossard et al., 2001); enfermedad periodontal aguda (Özçaka et al., 2010); tumores malignos sólidos (Sato et al., 2006) y malignidades hematológicas, por ejemplo leucemias; coagulación intravascular diseminada, septicemia (Hayakawa et al., 2010), aneurismas (Gaetani et al., 1998), heridas crónicas no cicatrizantes (Tregrove et al., 1996), infección bacteriana, viral o fúngica o similares. Como se discute en la presente memoria, sería ventajoso proporcionar un método rápido para detectar proteasas activas, puesto que la determinación de proteasas activas puede ser útil en pruebas de diagnóstico y/o pronóstico. Puede ser útil detectar un amplio conjunto de proteasas activas o una o más de una proteasa particular, por ejemplo seleccionada de elastasa, proteasa similar a quimotripsina o similar a tripsina; metaloproteinasas, tales como gelatinasas, matrilisina o colágeno intestinal; cisteína, por ejemplo cathepsina, B, L, S o caspasas.

45 Utilizando los compuestos de la presente invención: un grupo indicador enlazado (grupo indicador y espaciador) - una secuencia de reconocimiento específica y un grupo de unión (ligando de captura (parte activa)) los inventores han desarrollado kits de ensayos para detectar específica y selectivamente proteasas de muestras de ensayo.

Los kits de ensayo pueden utilizar el formato ELISA para cuantificar el nivel de proteasa en un dispositivo de flujo lateral con muestra, tal como la tecnología de tira reactiva o la tecnología de chip de proteasa.

50 Pueden usarse adecuadamente kits ensayo para realizar el diagnóstico o pronóstico de enfermedades o afecciones, tales como, por ejemplo, enfermedades respiratorias (fibrosis quística, bronquiectasia y EPOC), cáncer, leucemia, enfermedad cardiovascular e infección bacteriana.

Adicionalmente, los kits se pueden usar en el descubrimiento de fármacos para cribar quimiotecas para la identificación de inhibidores específicos, que se podrían usar por ejemplo como terapias antiproteasas en una gama de trastornos patológicos. Por consiguiente, dichos ensayos de cribado de fármacos en donde se proporcionan a una pro-

teasa un compuesto de ensayo y un compuesto de la presente invención y la inhibición de la unión del compuesto de la invención a la proteasa en relación con la presencia de un compuesto de ensayo pueden ser un aspecto adicional de la presente invención.

5 Ventajosamente, el kit mide proteasas activas, no proteasas que ya han sido inactivadas por neutralización con un inhibidor endógeno y por lo tanto ya no son capaces de causar daño tisular, propagar inflamación o activar otras entidades bioquímicas. Por ejemplo, la NE es inactivada de un modo estequiométrico 1:1 por su inhibidor natural alfa₁-antitripsina. Una vez unida, se somete a degradación y ya no es clínicamente relevante. Por lo tanto, la medición de esta proteína no sería útil ni para el diagnóstico ni para el pronóstico. La proteína biomarcadora total es detectada por ELISA solo con anticuerpos estándares que en el caso de la NE abarcaría tanto la NE libre activa como la NE/AAT complejada inactiva.

10 También se discute un sistema o kit de ensayo para la detección de una proteasa, que comprende un compuesto como el descrito anteriormente y a continuación

15 Particularmente, la proteasa es una serina-proteasa activa, por ejemplo una proteasa similar a la elastasa, similar a la tripsina y similar a la quimotripsina. Como se apreciará, el sistema de ensayo s que comprende dicho compuesto proporciona altas especificidad y sensibilidad, es rápido y sencillo para el usuario. Además, el sistema de ensayo es fácil de usar y tiene un alto valor predictivo.

En una realización, el sistema de ensayo puede estar en forma de un ensayo ELISA, dispositivo de flujo lateral que incluye tiras reactivas, chip o similar

20 En una realización preferida, el método para la detección es un ensayo ELISA (Ensayo con inmunosorbente unido a enzima). El ensayo ELISA puede incluir la captura selectiva de un complejo formado por la proteasa y el compuesto de la presente invención usando un sustrato que comprende un grupo de captura, tal como estreptavidina. Adecuadamente, el sustrato puede estar en la forma de placa(s), perla(s) o similares recubiertas con estreptavidina. Tras la captura del complejo por el sustrato, se puede detectar dicho complejo, por ejemplo por inmunodetección usando un anticuerpo específico para la proteasa o similar. Alternativamente, la inmunocaptura que usa un anticuerpo específico para la proteasa se puede usar también para detectar y/o aislar selectivamente la proteasa en una mezcla bruta, tal como un lisado celular, una mezcla de proteínas parcialmente purificada o similar, antes de la adición del compuesto para la subsiguiente detección. En este caso la subsiguiente detección se puede realizar por la formación de un conjugado biotina-estreptavidina-peroxidasa formado a partir del complejo del compuesto y el biomarcador de captura. Esto se puede realizar en una reacción de una sola etapa. Por ejemplo, el uso de un anticuerpo que no interfiera con el sitio activo de la proteasa puede permitir la aportación simultánea a una muestra del anticuerpo y el compuesto de la presente invención. Por ejemplo, en un formato particular del sistema de ensayo los reactivos requeridos se pueden añadir simultáneamente o se añade una premezcla que comprende los reactivos requeridos, reduciendo de este modo el tiempo total de ensayo.

35 El formato ELISA es ventajoso, puesto que proporciona un formato cuantitativo, que ahorra trabajo y tiempo, que típicamente lleva 3,5 horas y normalmente no más de 4 horas.

En particular, el formato ELISA es ventajoso para analizar la NE activa, que puede ser capturada por un compuesto que es específico para la NE. Un conjugado del anticuerpo específico subsiguientemente aplicado proporciona una amplificación adicional de la señal, proporcionando por tanto mucha mayor sensibilidad.

40 La incubación con el anticuerpo llevará generalmente 5 minutos a 2 horas, particularmente alrededor de 1 hora. Esta incubación a corto plazo es particularmente ventajosa, puesto que se pueden obtener rápidamente los resultados.

45 Como se apreciará el formato de ensayo con dispositivo de flujo lateral o tira reactiva es ventajoso puesto que es robusto, conveniente y fácil de usar. Además, se puede incorporar fácilmente en las determinaciones habituales de pacientes bien sea en el punto de atención o para la monitorización personal como kit de ensayo doméstico. Se apreciará que el formato de ensayo con dispositivo de flujo lateral/tira reactiva es particularmente útil en la clínica para un resultado cualitativo y posiblemente semicuantitativo que podría ayudar a la monitorización del paciente y proporcionar un marcador temprano que podría informar para decisiones clínicas respecto a tratamiento, incluyendo tratamientos profilácticos.

También se discute un kit para detectar una proteasa, particularmente una serina-proteasa activa, que comprende un compuesto como se ha definidos antes y en lo sucesivo en la presente memoria.

50 El kit puede comprender además al menos un agente de detección adecuado, que sea capaz de detectar, por ejemplo uniéndose a él un grupo indicador del compuesto como se ha descrito antes y en lo sucesivo en la presente memoria.

55 El kit puede comprender un soporte adecuado, por ejemplo un soporte de matriz sólida. El soporte de matriz puede ser una membrana, tal como nitrocelulosa, una resina, tal como resina N-MCA-N¹-FMOc-etilendiamina MPB-AM (vendida típicamente con el nombre comercial NovaTag™) o similar. Preferiblemente, el al menos un agente de unión puede estar unido al menos temporalmente al soporte. Por ejemplo, el agente de unión está unido covalente-

mente al soporte. Adicionalmente, otros componentes del análisis pueden estar unidos, por ejemplo covalentemente al soporte.

5 El kit puede comprender un dispositivo de detección adecuado, que sea capaz de detectar un grupo indicador adecuado del compuesto. Por ejemplo, el dispositivo de detección puede comprender una fuente de luz (UV o visible), fluorescencia, luminiscencia, un láser o similar.

El kit puede comprender al menos un componente de tampón adecuado, por ejemplo una premezcla de tampón, una solución tampón o similar. Como se apreciará el componente de tampón ayuda a la preparación de la muestra.

Para el usuario del kit puede ser de ayuda que dicho kit comprenda una referencia, tal como una tarjeta de colores que da el intervalo del ensayo como guía de los niveles clínicos aceptables o inaceptables o similar.

10 También se describe un producto o dispositivo para detectar específicamente serina-proteasas activas, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y una matriz a la cual está fijado por ejemplo unido, el compuesto permanentemente o semipermanentemente.,

15 Particularmente, el producto puede ser un dispositivo de flujo lateral, tal como una tira reactiva, chip, membrana, placa o similar. En realizaciones, el producto puede comprender una almohadilla absorbente, una membrana de ensayo, un anticuerpo inmovilizado y un compuesto de la presente invención, en donde la almohadilla absorbente está dispuesta para recibir una muestra de ensayo, de tal modo que la muestra de ensayo se ponga en contacto con un compuesto de la presente invención, tal que si está presente una proteasa en la muestra que se ha de detectar, pueda formar un complejo con el compuesto. El complejo puede migrar luego a través del dispositivo y unirse a un conjugado con un agente de detección, por ejemplo estreptavidina-oro coloidal. El complejo expandido puede migrar luego a través del dispositivo, por ejemplo típicamente por flujo lateral. El complejo expandido puede ser unido luego por el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo el anticuerpo inmovilizado específico para la proteasa que se investiga. Preferiblemente, la unión del complejo por el anticuerpo inmovilizado puede ser visualizada en una ventana de ensayo. En realizaciones preferidas el producto puede comprender además un anticuerpo inmovilizado con especificidad de unión para el grupo indicador del compuesto o agente de detección del conjugado.

25 En realizaciones se pueden proporcionar al menos dos compuestos en donde al menos los dos compuestos tienen especificidad para diferentes proteasas, por ejemplo un primer compuesto con especificidad para elastasa y un segundo compuesto con especificidad para proteasas similares a quimi tripsina o tripsina.

También se discute un método de identificar un compuesto capaz de unir específicamente un biomarcador diana, en particular una serina-proteasa activa, para uso en un sistema de ensayo., que comprende las etapas de:

30 proporcionar un compuesto, comprendiendo dicho compuesto un grupo de unión capaz de unirse establemente al biomarcador diana, un grupo de reconocimiento específico, particularmente un grupo peptídico para el biomarcador diana, un grupo espaciador, y un grupo indicador, que está conectado al grupo de reconocimiento por el grupo espaciador, y preferiblemente un resto de succinilo entre el grupo espaciador y el grupo de reconocimiento específico,

35 incubar el compuesto con la proteasa diana y al menos otra proteasa, en particular al menos otra serina-proteasa activa, y determinar si se ha formado un complejo detectable solamente con el biomarcador diana,

40 en donde un complejo detectable con solamente la proteasa diana es indicativo de que el compuesto es capaz de unir selectivamente la proteasa diana..

Esto es particularmente ventajoso, puesto que una variedad de compuestos específicos o familias de compuestos específicos puede ser conveniente y rápidamente desarrollada para uso en un sistema de ensayo, tal como un formato ELISA, un formato de análisis con un dispositivo de flujo lateral/tira reactiva, formato de chip o similar.

45 Un sistema o kit de ensayo que comprende un compuesto de la invención puede ser un dispositivo de flujo lateral o tira reactiva. Dichas realizaciones pueden ser formadas adecuadamente para uso en un punto de ensayo de atención para ayudar al tratamiento del paciente o como kit de ensayo doméstico para el tratamiento y el control personal de la enfermedad.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

50 un grupo indicador que está conectado al grupo de reconocimiento por el grupo espaciador, y preferiblemente

un resto de succinilo entre el grupo espaciador y el grupo de reconocimiento específico,

incubar el compuesto con el biomarcador diana y al menos otro biomarcador, en particular al menos otra serina-proteasa activa, y

determinar si se ha formado un complejo detectable solamente con el biomarcador diana,

- 5 en donde un complejo detectable solamente con el biomarcador diana es indicativo de que el compuesto es capaz de unirse selectivamente al biomarcador diana.

Adecuadamente en el método se proporciona un compuesto de la presente invención como se ha descrito en la presente memoria.

- 10 Esto es particularmente ventajoso, puesto que se puede desarrollar conveniente y rápidamente una variedad de compuestos específicos o familia de compuestos específicos para uso en un sistema de ensayo, tal como un formato de ELISA, un formato de dispositivo de flujo lateral/tira reactiva, formato de chip o similar.

- 15 En realizaciones de la invención, un sistema o kit de ensayo que comprende un compuesto de la invención puede ser un dispositivo de flujo lateral o tira reactiva. Dichas realizaciones pueden ser formadas adecuadamente en un punto de ensayo de atención para ayudar al tratamiento del paciente o como kit de ensayo doméstico para el tratamiento y control personal de la enfermedad.

La invención se describirá ahora en los siguientes ejemplos no limitativos con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de un biotina-PEG-Phe-difenilfosfonato,

La Fig. 2 muestra una representación esquemática de un biotina-PEG-Val-difenilfosfonato,

- 20 La Fig. 3 muestra una representación esquemática de un biotina-PEG-Lys-difenilfosfonato,

La Fig. 4 muestra una representación esquemática de la síntesis de biotina-PEG-Succ-Val^P(OPh)₂,

La Fig. 5 muestra una representación esquemática de la síntesis de biotina-PEG-Succ-Arg^P(OPh)₂,

La Fig. 6 muestra una representación esquemática de la preparación de sal del ácido fosfonoso,

La Fig. 7 muestra una representación esquemática de la síntesis del análogo racémico de la valina,

- 25 La Fig. 8 muestra una representación esquemática de la síntesis de (R)-Cbz-Val^P(OH)H,

La Fig. 9 muestra una representación esquemática de la síntesis del análogo de (R)-Succ-Val^P, y

La Fig. 10 muestra una representación esquemática del acoplamiento del análogo de (R)-Succ-Val^P a biotina-PEG-resina NovaTag™

- 30 La Fig. 11 ilustra el ensayo ELISA de NE-Tag frente al de la actividad de la fluorescencia, donde en el eje Y se representan las unidades de fluorescencia relativa/minuto (UFR/min) y en el eje X la elastasa de neutrófilos (ng/mL). ■ muestra el ensayo ELISA de NE-Tag que usa el compuesto de la invención y ◆ muestra el ensayo de actividad fluorogénica, y

- 35 La Fig. 12 muestra los resultados de ensayos comparativos en los que los datos se presentan como ρ (rho) de Spearman (valor p), ** correlación significativa en el nivel de 0,01 (2 colas), * correlación significativa en el nivel de 0,05 (2 colas), ND. No se realizó debido a una muestra insuficiente, y

La Fig. 13 muestra las correlaciones de NE con los datos clínicos, en donde los datos estadísticos se representan como el valor r de Pearson (valor p), † Datos no paramétricos se representan como ρ de Spearman (valor p), ** correlación significativa en el nivel de 0,01 (2 colas), * correlación significativa en el nivel de 0,05 (2 colas).

- 40 En la Fig. 1 se muestra una representación esquemática de biotina-PEG-Phe-difenilfosfonato. El biotina-PEG-Phe-difenilfosfonato tiene la fórmula molecular C₄₄H₆₀N₅O₁₀PS y una composición molecular de 59,92% de C, 6,86% de H, 7,94% de N, 18,14% de O, 3,51% de P y 3,64% de S. Tiene un peso molecular de 882,03 y una masa de 881.

En la Fig. 2 se muestra una representación esquemática de biotina-PEG-Val-difenilfosfonato. El biotina-PEG-Val-difenilfosfonato tiene la fórmula molecular C₄₀H₆₀N₅O₁₀PS y una composición molecular de 57,61% de C, 7,25% de H, 8,40% de N, 19,18% de O, 3,71% de P y 3,84% de S. Tiene un peso molecular de 833,99 y una masa de 833.

- 45 En la Fig. 3 se muestra una representación esquemática de biotina-PEG-Lys-difenilfosfonato. El biotina-PEG-Lys-difenilfosfonato tiene la fórmula molecular C₄₁H₆₃N₆O₁₀PS y una composición molecular de 57,06% de C, 7,36% de H, 9,74% de N, 18,54% de O, 3,59% de P y 3,72% de S. Tiene un peso molecular de 863,03 y una masa de 862.

Ejemplo I

Síntesis de biotina-PEG-Succ-Val^P(OPh)₂

Se sintetizó biotina-PEG-Succ-Val^P(OPh)₂ de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 4.

- 5 Se calentaron isobutiraldehído (1), trifenilfosfito (2) y carbamato de bencilo (3) en ácido acético proporcionando Cbz-Val^P(OPh)₂ (4) que se desprotegió utilizando HBr al 33%/AcOH v/v (típicamente incubado a temperatura ambiente durante 90 minutos). La sal de HBr resultante (5) se hizo reaccionar con anhídrido succínico y el derivado de succinilo formado (6) se acopló a biotina-PEG-resina Novatag^R usando HATU/DIPEA obteniéndose (7) como se muestra en la Fig. 4

Ejemplo II

10 Síntesis de biotina-PEG-Succ-Arg^P(OPh)₂

Se sintetizó biotina-PEG-Succ-Arg^P(OPh)₂ de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 5.

- 15 Se calentó 4-(N-ftaloil)butiraldehído (10) (preparado a partir de anhídrido ftálico (9) y 4-aminobutiraldehído-dietilacetil (8)) con fosfito de trifenilo y carbamato de bencilo en AcOH obteniéndose N-ω-Pth-N-α-Cbz-Orn^P(OPh)₂ (12). La eliminación del grupo ftaloilo usando hidrato de hidrazina seguido por reacción con N,N'-bis-Boc-S-metiltiourea produjo el derivado de arginina (14) que se desprotegió en el α-N por hidrogenólisis catalítica usando H₂-Pd al 10%/C. El material desprotegido (15) se hizo reaccionar luego con anhídrido succínico y se acopló a biotina-PEG-resina Novatag usando HATU/DIPEA obteniéndose (17).

Ejemplo III

Síntesis de biotina-PEG-Succ-(R)-Val^P(CH₂CH₂CO₂Et)(OPh)

20 (a) Preparación de la sal del ácido fosfonoso

La sal del ácido fosfonoso se sintetizó de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 6.

Se hicieron reaccionar ácido hipofosforoso anhidro (19) (preparado a partir de una solución acuosa al 50% p/v por eliminación de agua a alto vacío a temperatura ambiente) y difenilmetilamina (18) en etanol anhidro y el producto precipitado resultante se recogió por filtración.

25 (b) Preparación del análogo racémico de la valina

Se sintetizó el análogo racémico de la valina de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 7.

- 30 Se calentaron la sal del ácido hipofosforoso-difenilmetilamina (20) e isobutiraldehído en etanol a reflujo formando el ácido difenilmetilaminofosfonoso (21). Este se desprotegió utilizando ácido bromhídrico al 48%. Después del tratamiento con óxido de propileno se obtuvo el material protegido con Cbz (23) haciendo reaccionar (22) con clorofor- miato de bencilo a pH 9,0 - 9,5.

(c) Preparación de (R)-Cbz-Val^P(OH)H

Se sintetizó (R)-Cbz-Val^P(OH)H de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 8.

- 35 Se hizo reaccionar Cbz-Val^P(OH)H racémico (23) con (R)-(+)-α-metilbencilamina (24) en etanol anhidro a reflujo. La sal precipitada se recuperó y recristalizó en etanol anhidro varias veces hasta que se obtuvo el material ópticamente puro [rotación óptica ([α]_D = -16,40 c, 1 en etanol)]. La sal resuelta (25) se agitó en HBr al 33%/AcOH a 0°C seguido por tratamiento con óxido de propileno obteniéndose el ácido (R)-aminofosfonoso (26) que se reconvirtió en el mate- rial protegido con Cbz (27) por reacción con clorofor- miato de bencilo a pH 9,0 - 9,5.

(d) Preparación del análogo de (R)-Succ-Val^P

Se sintetizó el análogo de (R)-Succ-Val^P de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 9.

- 40 Se preparó el análogo de N-Succ-(R)-Val^P(CH₂CH₂CO₂Et)(OPh) (31) a partir del ácido (R)-N-Cbz-fosfonoso (27) por reacción con acrilato de etilo obteniéndose ácido fosfínico (28) seguido de tratamiento con cloruro de oxalilo forman- do el cloruro de ácido y con fenol formando el éster de fenilo (29). La eliminación del grupo Cbz con HBr al 33%/AcOH y la reacción con anhídrido succínico dio el producto de succinilo requerido (31)

(e) Acoplamiento del análogo de (R)-Succ-Val^P a biotina-PEG-resina Novatag

- 45 Se acopló el análogo de (R)-Succ-Val^P a biotina-PEG-resina Novatag de acuerdo con el esquema mostrado en la FIG. 10.

Esta etapa se realizó bajo las condiciones de acoplamiento utilizadas previamente, es decir, HATU/DIPEA, como se indica en los ejemplos I y II.

Ejemplo IV

Unión del compuesto proporcionado por uno de los Ejemplos I a III y una proteasa diana.

- 5 El compuesto se une rápidamente a la proteasa diana a temperatura ambiente. Sin embargo, se prefiere una temperatura de 37°C. La unión se consigue añadiendo el compuesto a una concentración adecuada (o a la concentración óptima) obteniéndose típicamente una concentración final de 10 µM a una muestra que comprende la proteasa diana e incubándola durante aproximadamente 15 minutos u otro tiempo adecuado para formar un complejo. El complejo se puede detectar usando ELISA como se ha descrito anteriormente; por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) seguido por electrotransferencia sobre nitrocelulosa y detección utilizando un agente adecuado, por ejemplo estreptavidina o un anticuerpo relevante, conjugado con una enzima, tal como fosfatasa alcalina o preferiblemente peroxidasa de rábano silvestre; por transferencia de puntos o por un dispositivo de flujo lateral, tal como un ensayo con tira reactiva.

Ejemplo V

- 15 Un kit de ensayo puede comprender un sustrato de estreptavidina previamente recubierto, por ejemplo, una placa de estreptavidina comercialmente disponible, y se proporciona un compuesto de la presente invención. Opcionalmente, el kit puede incluir además un anticuerpo o miembro de unión con especificidad de unión a la proteasa a la que el compuesto tiene especificidad de unión con un indicador conjugado a él.

- 20 En una realización, un kit de ensayo puede comprender una placa de estreptavidina previamente recubierta, que sea capaz de unirse a un compuesto de la presente invención con especificidad de unión a la elastasa de neutrófilos y un grupo indicador ligado a la biotina.

- 25 La muestra de ensayo se puede mezclar con el compuesto de la invención y aplicarse a la placa de estreptavidina previamente recubierta de manera que el grupo indicador ligado a biotina del compuesto de la invención se pueda unir a la estreptavidina en la placa. Los tiempos de incubación de la muestra en la placa se pueden optimizar para que se produzca una unión adecuada. La placa se puede lavar entonces con tampón y un anticuerpo conjugado anti-elastasa de neutrófilos-peroxidasa usado para sondear la placa lavada. Puesto que la placa retendrá la elastasa de neutrófilos activa que había sido unida por el compuesto de la invención, el anticuerpo conjugado anti-elastasa de neutrófilos-peroxidasa se unirá solamente a la elastasa de neutrófilos retenida y la peroxidasa se puede usar para realizar una reacción ELISA para determinar el nivel de elastasa de neutrófilos presente. Opcionalmente, se pueden incluir en el kit tampones de bloqueo y el método puede incluir una etapa de adición de los tampones de bloqueo para minimizar la probabilidad de unión no específica del anticuerpo conjugado anti-proteasa a la placa.

- 30 La Figura 11 ilustra un ensayo ELISA de NE-Tag y un ensayo de actividad de fluorescencia. El ensayo de NE-Tag tenía un intervalo de detección de alrededor de 250-3500 ng/mL y era sensible a aproximadamente 125 ng.

Ejemplo VI

- 35 Comparación de tres sistemas de ensayo.

Se recogieron muestras de esputo de sujetos seleccionados aleatoriamente hospitalizados por exacerbación aguda de fibrosis quística.

- 40 Las muestras se dividieron de tal manera que una fracción de muestras se centrifugó a 30.000 g durante 1 hora a 4°C, mientras que otra fracción se diluyó en 4 partes de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se hizo girar mecánicamente durante 1 minuto antes de la centrifugación a 3000 g durante 30 minutos a 4°C.

A continuación se detectó la actividad de NE usando un ensayo de actividad de fluorescencia convencional, usando el ensayo de actividad de inmunocaptura convencional de NE Innozyme™ (Calbiochem) y el ensayo ELISA descrito en el Ejemplo V. Los resultados de estos ensayos se proporcionan en las Figuras 11 y 12.

- 45 Ventajosamente, el ensayo ELISA de NE-TAG proporcionó una captura selectiva acoplada con inmunodetección específica y se correlacionó apropiadamente con parámetros clínicos.

Ejemplo VII

También se puede proporcionar un kit de ensayo para detectar la proteasa utilizando compuestos de la invención como un dispositivo de flujo lateral/ensayo con tira reactiva.

- 50 En dicha realización, una tira reactiva puede comprender un compuesto de la invención que se puede unir específicamente a una proteasa de interés, una parte receptora de muestra, un anticuerpo inmovilizado con especificidad de unión a la proteasa de interés, una parte del resultado del ensayo y opcionalmente una parte de control.

Se proporciona la muestra de ensayo a la parte receptora de la muestra, por ejemplo una almohadilla absorbente en comunicación con una membrana de ensayo. Se permite que el compuesto de la invención forme un complejo con proteasa en la muestra de ensayo a la que el compuesto de la invención tiene especificidad de unión, por ejemplo un compuesto de la invención con especificidad de unión a NE puede unirse a NE activa presente en la muestra de ensayo.

La proteasa unida al compuesto de la invención con un grupo indicador enlazado adecuado puede entonces ser puesto en comunicación con el anticuerpo inmovilizado, por ejemplo utilizando un recorrido de fluido en una membrana de ensayo sobre la cual se puede inmovilizar un anticuerpo, de manera que el complejo puede ser concentrado por el anticuerpo inmovilizado en una parte del resultado del ensayo, por ejemplo una ventana de visualización en la que se puede detectar la parte indicadora del compuesto de la invención.

Opcionalmente, la tira reactiva puede comprender además una parte de control que, por ejemplo, comprende anticuerpos inmovilizados con especificidad de unión al indicador del compuesto de interés, situados más allá de la trayectoria de flujo de los anticuerpos inmovilizados con especificidad de unión a la proteasa, de tal manera que queda claro cuando la muestra y el compuesto de interés deberían haberse movido más allá de la parte del resultado del ensayo.

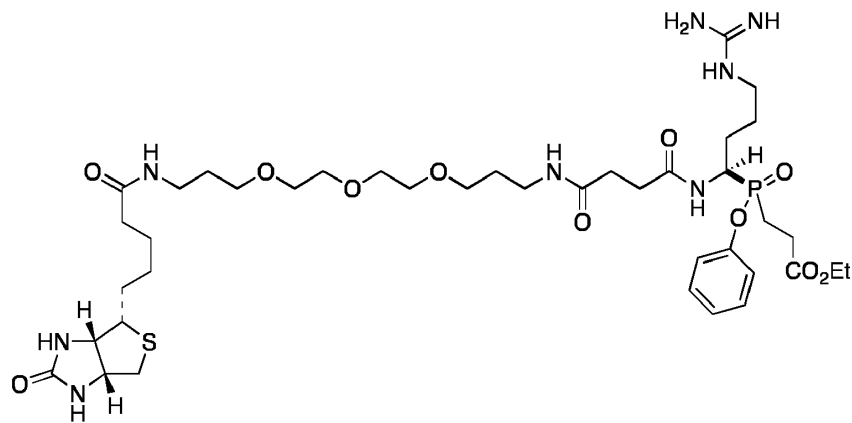
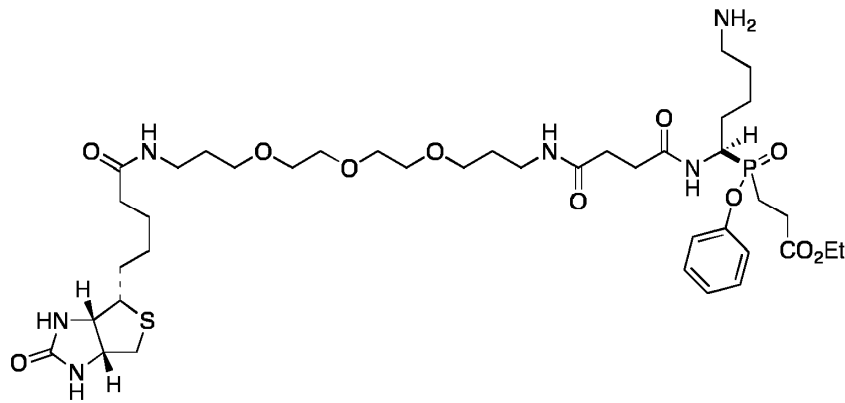
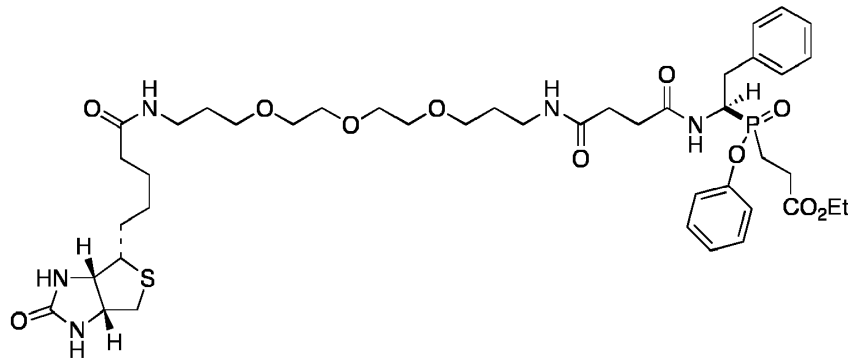
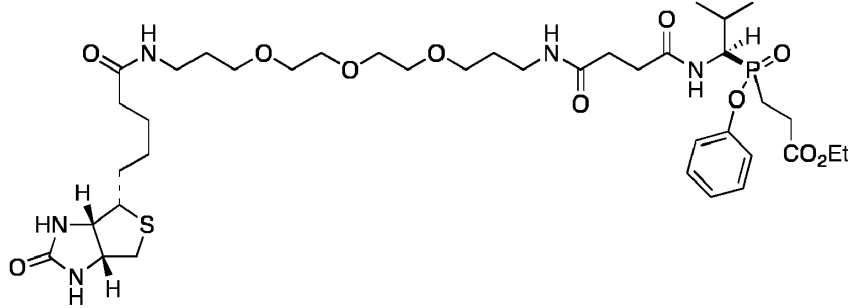
Referencias

1. Mayer-Hamblett, N, Aitken, ML, Accurso, FJ, Kronmal, RA, Konstan, MW, Burns, JL, Sagel, SD and Ramsey, BW (2007) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175: 822-828.
2. Fujimoto K, Yasuo, M, Urushibata, K, Hanaoka, M, Koizumi, T and Kubo, K (2005) *Eur. Respir. J.* 25(4): 640-646.
3. Tsang, KW, Chan, K, Ho, P, Zheng, L, Ooi, GC, Ho, JCM and Lam, W (2000) *Chest* 117: 420-426.
4. Loos, BG and Tjoa, S (2005) *Periodontology* 2000 39: 53-72.
5. Paliouras, M. et al. (2007) *Cancer Letts.* 249: 61-79.
6. Hamilton, R, Walker, BJ and Walker, B (1993) *Tetrahedron Lett.* 34: 2847-2850.
7. Kay, G, Kennedy, R, Walker, B and Nelson, J (1993) *Biochem. Soc. Trans.* 22: 20S.
8. Hawthorne, SJ, Halton, DW and Walker, B (1994) *Parasitology* 108: 595-601.
9. Hamilton, R, Walker, B and Walker, BJ (1998) *Bioorg. Med. Chem. Letts.* 8: 1655-1660.
10. Hawthorne, S, Hamilton, R, Walker, BJ & Walker, B (2004) *Anal. Biochem.* 326: 273-275.
11. Walker, B, Wharry, S., Hamilton, RJ, Martin, SL, Healy, A, and Walker, B (2000) *Biochem. Biophys. Res. Comms* 276: 1235-1239.
12. Eley, BM and Cox, SW (1998) *Br. Dent. J.* 184: 373-376.
13. Cox, SW, Cho, K, Eley, BM and Smith, RE (1990) *J. Periodont. Res.* 25: 164-171.
14. Pan Z, Jeffery DA, Chegade K, Beltman J, Clark JM, Grothaus, P, Bogoyo, M and Baruch, A. (2006) *Bioorg. Med. Chem. Letts.* 16: 2882-2885.
15. Djekic UV, Gaggar A, and Weathington NM. (2009) *Pharmacol Ther.* 121(2): 132-46.
16. Hayakawa M, Katabami K, Wada T, Sugano M, Hoshino H, Sawamura A, and Gando S. (2010) *Shock* 33: 14-18.
17. Henriksen PA and Sallenave JM. (2008) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40(6-7): 1095-100.
18. Frossard J-L, Hadengue, A, and Pastor CM. (2001) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 162-170.
19. Özçaka Ö, Bıçakci N, Pussinen P, Sorsa T, Köse T and Buduneli N. (2010) *Oral Diseases.*
20. Sato T, Takahashi S, Mizumoto T, Harao M, Akizuki M, Takasugi M, Fukutomi T, Yamashita J. (2006) *Surg. Oncol.* 15(4): 217-22.
21. Gaetani-P, Tartara F, Grazioli V, Tancioni F, Infuso L and Rodriguez y Baena R. (1998) *Life Sciences* 63: 285-292.
22. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G and Schultz G. (1999) *Wound Repair and Regeneration* 7: 442-452.
23. Oleksyszyn, J and Powers, JC (1991) *Biochemistry* 30: 485-493.

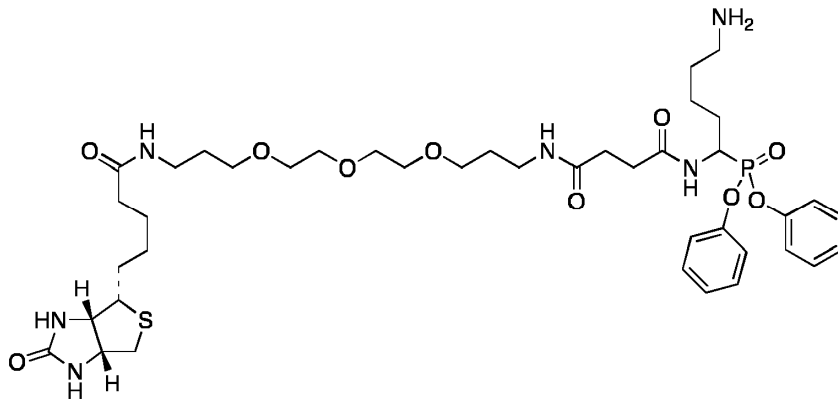
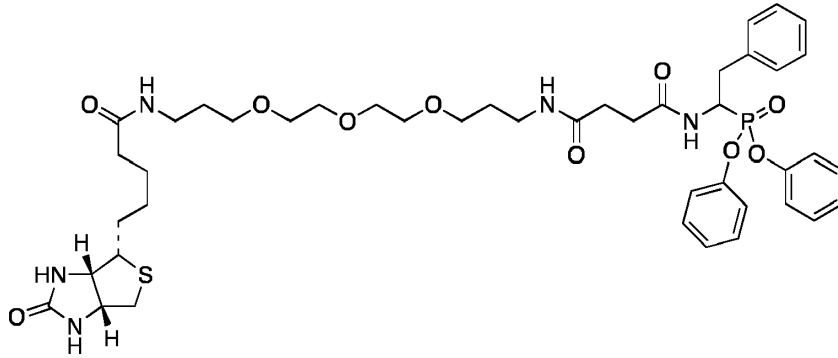
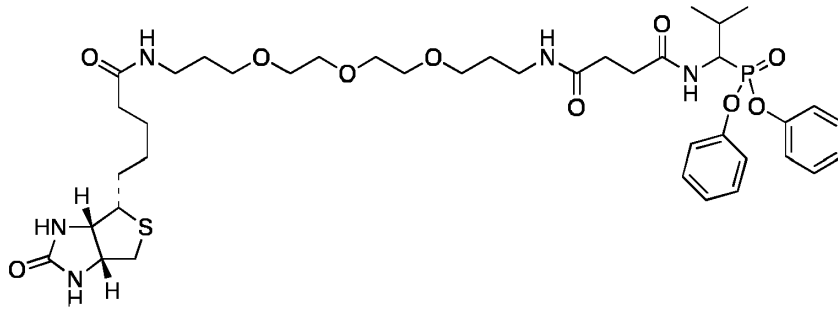
24. Oleksyszyn, J and Powers JC (1994) *Methods Enzymol.* 244: 423-441.
25. Hamilton, R, Walker, BJ and Walker B (1993) *Tet. Letts.* 34: 2847-2850.
26. Hamilton, R, Shute, RE, Travers, J, Walker, B and Walker, BJ (1994) *Tet. Letts.* 35: 3597-3600.
27. Hamilton, R, Walker B and Walker, BJ (1995) *Tet. Letts.* 36: 4451-4454.

REIVINDICACIONES

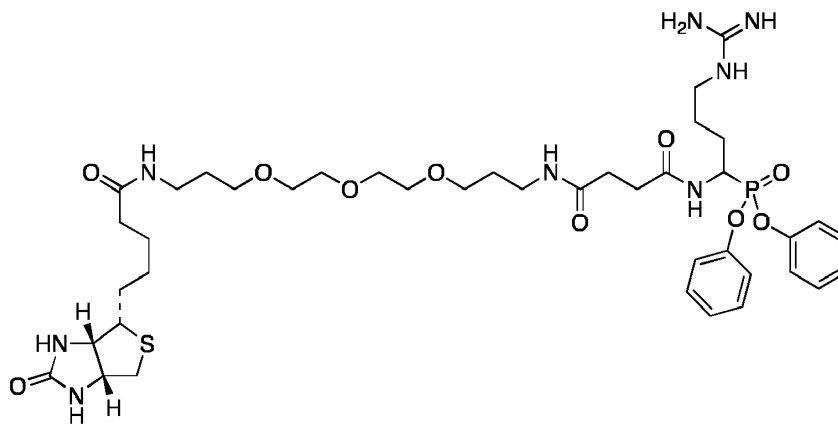
1. Un compuesto, para la detección de una proteasa específica en una muestra, en donde el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:



5



o



5

2. Un método para la detección y/o inhibición de una o más proteasas, que comprende las etapas de:
- mezclar una muestra biológica, con al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1,
 - permitir que el compuesto se una establemente a una proteasa diana en la muestra para formar un complejo detectable, y

detectar el complejo detectable.

3. Un método para detectar un estado patológico en un sujeto, que comprende las etapas de:

proporcionar un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 a una muestra del sujeto,

5 incubar la muestra con un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para unir una proteasa con el fin de formar un complejo detectable,

determinar la cantidad de proteasa en la muestra por la comparación de la cantidad del complejo detectable presente con un patrón, y comparar la cantidad de proteasa en la muestra con un nivel normal de proteasa en dicha muestra,

10 en donde un nivel elevado de la proteasa en comparación con un nivel normal es indicativo de un estado patológico.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde un aumento de al menos 5-100 veces es indicativo de un estado patológico.

15 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en donde el estado patológico es una enfermedad crónica o aguda de las vías respiratorias, tal como fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias, deficiencia congénita de alfa₁-antitripsina, enfisema, disfunción respiratoria aguda (ARDS); aterosclerosis; pancreatitis, enfermedad periodontal aguda, tumores malignos sólidos, coagulación intravascular diseminada, septicemia, aneurismas o heridas crónicas no cicatrizantes e infección bacteriana, viral o fúngica.

6. Un sistema de ensayo para la detección de una proteasa, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.

20 7. El sistema de ensayo de la reivindicación 6, en forma de un ensayo ELISA, dispositivo de flujo lateral/tira reactiva o chip.

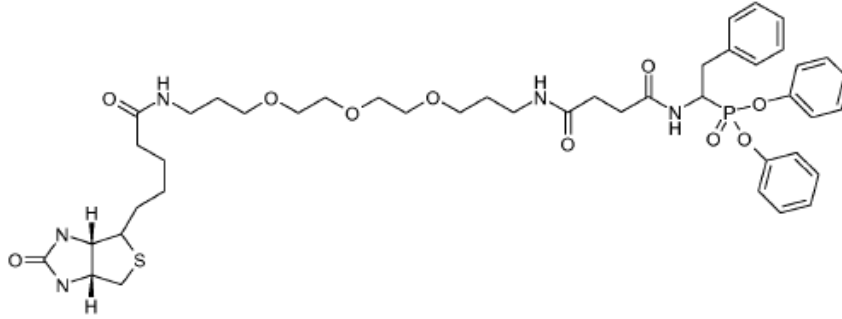


Fig. 1

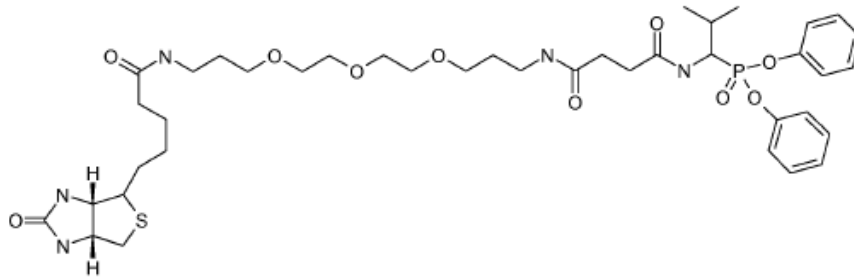


Fig. 2

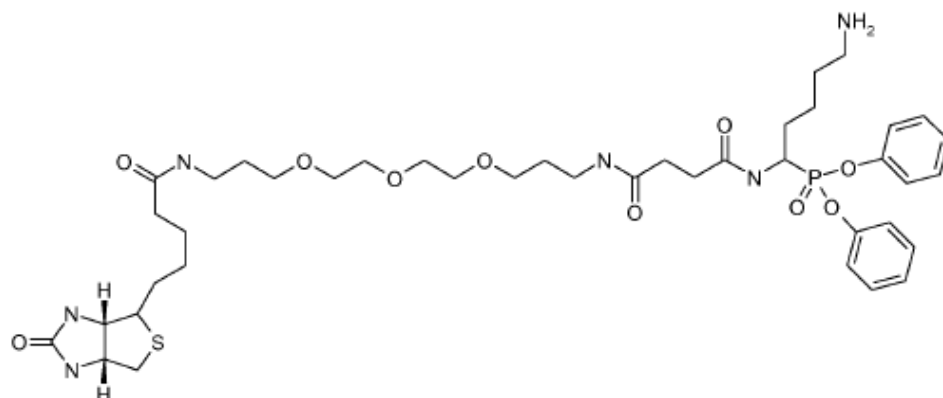


Fig. 3

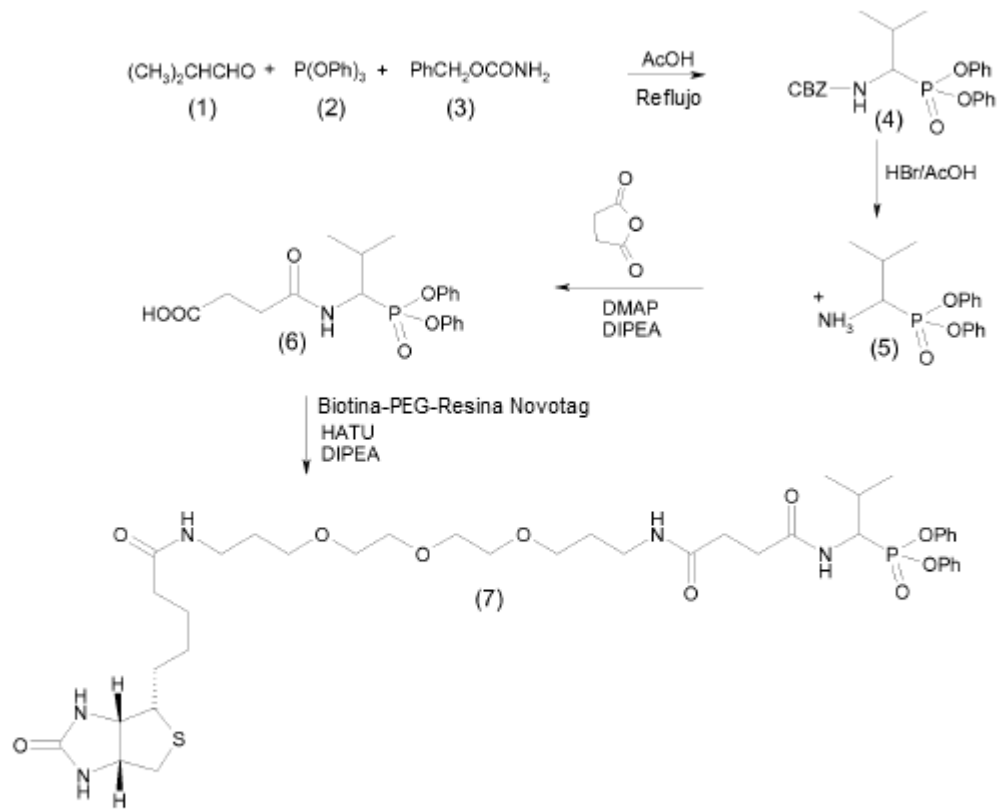


Fig. 4

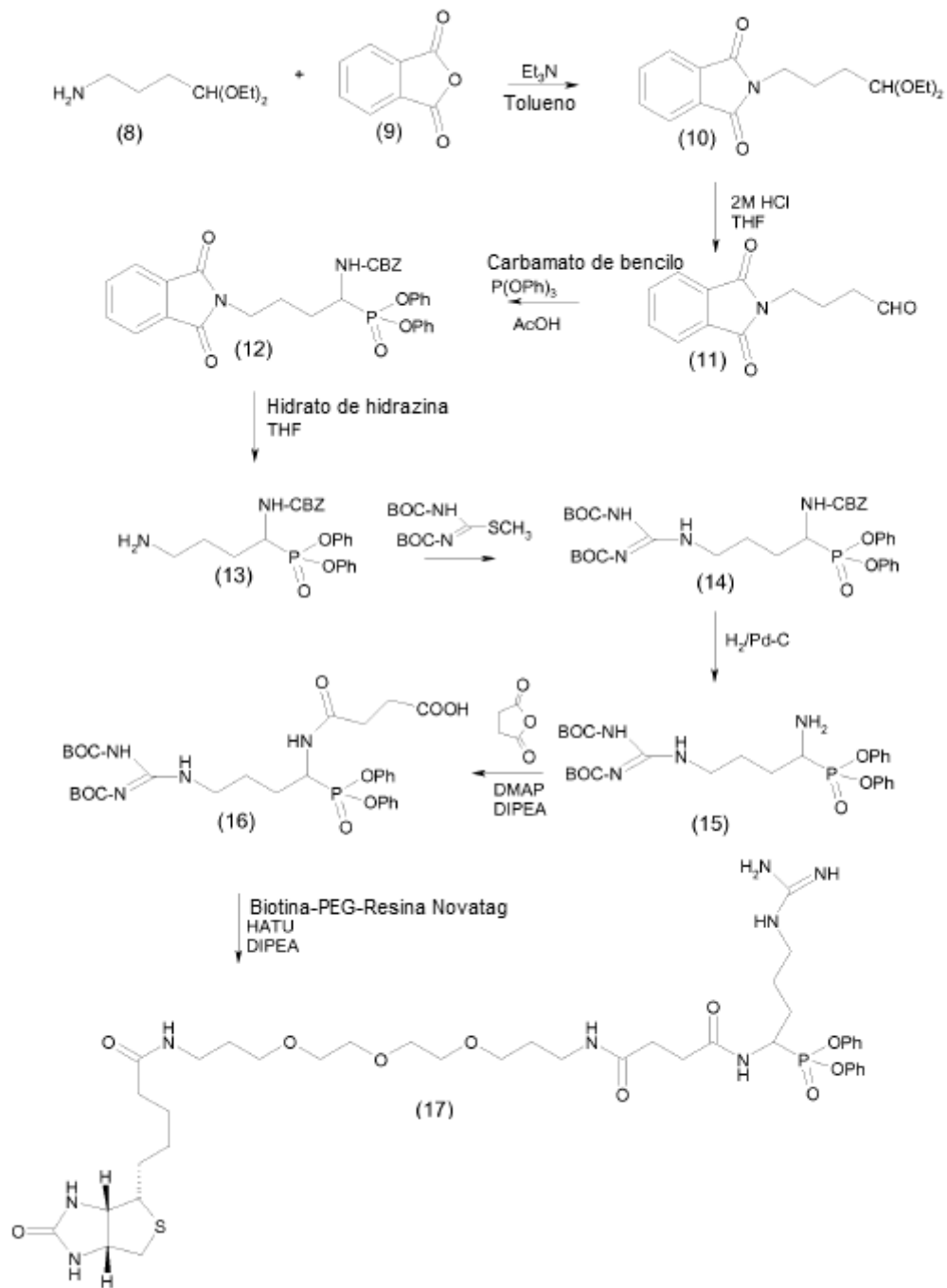


Fig. 5



Fig. 6

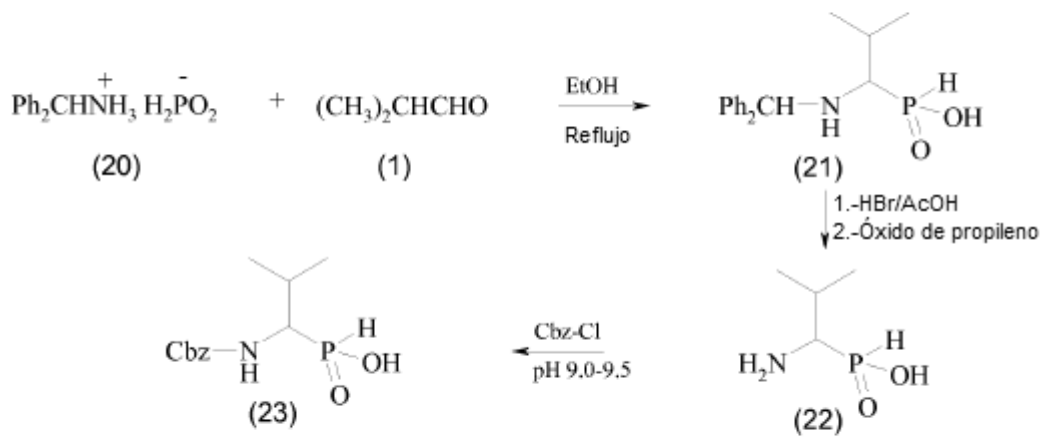


Fig. 7

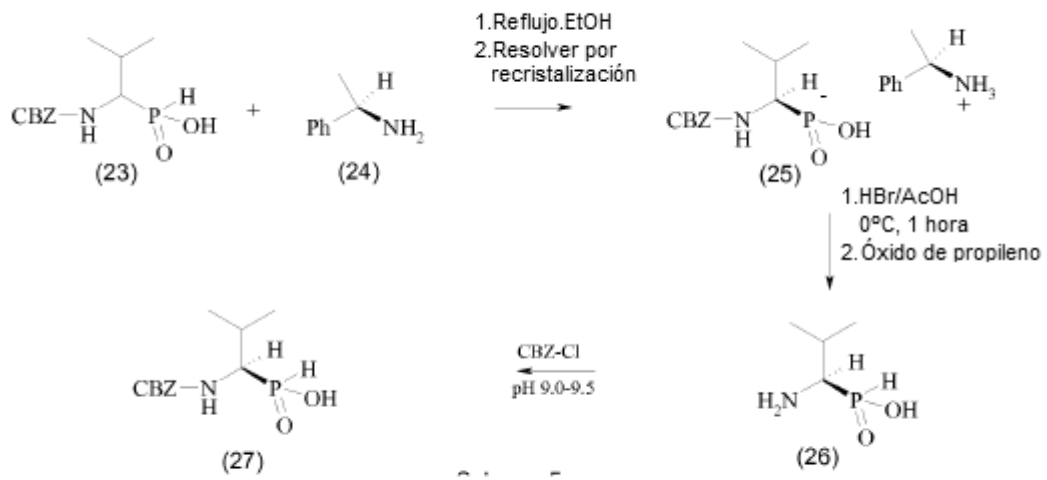


Fig. 8

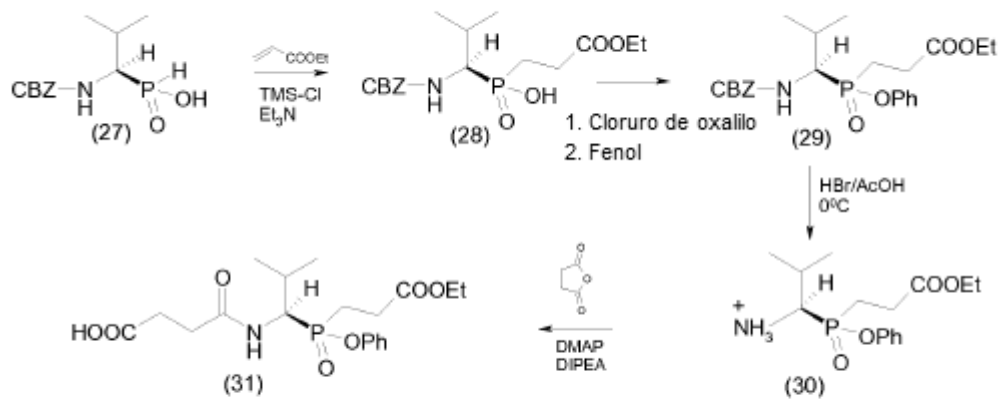


Fig. 9

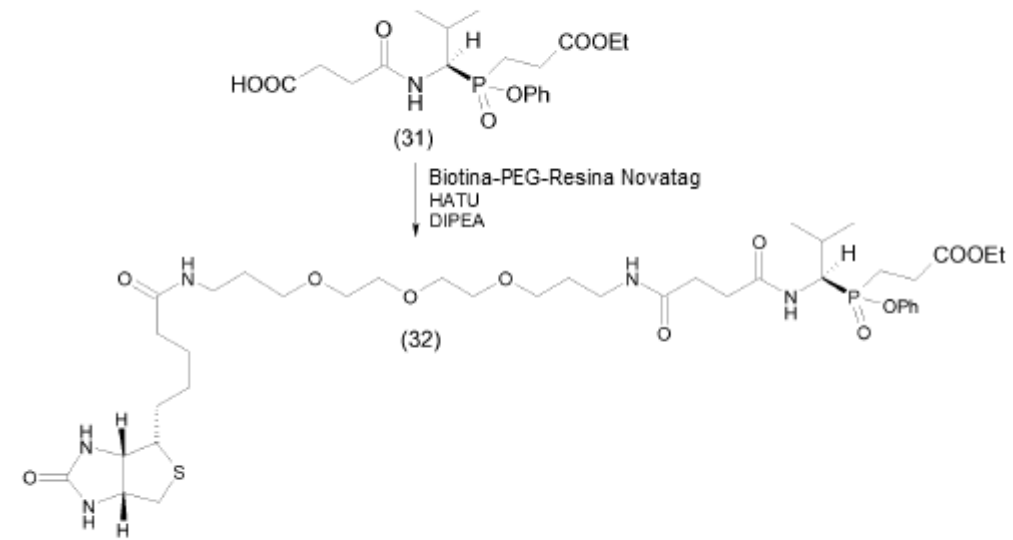
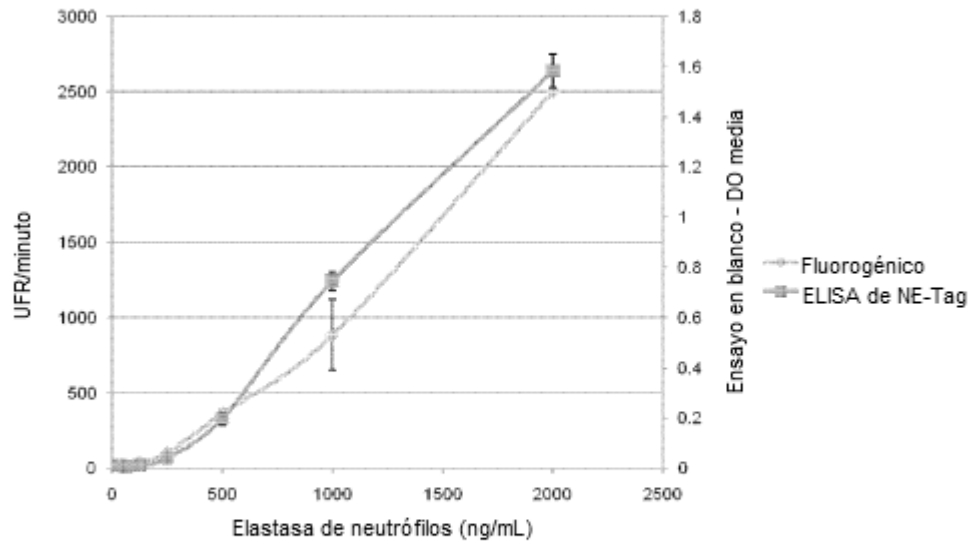


Fig. 10



$r = 0,992$ ($p = 0,000$)

Fig. 11

Fig. 12

A

Muestra	Método de análisis	Actividad de NE (ng/mL)	
		Valor de la media (DT)	Valor de la mediana (IQR)
Lavado con PBS	Fluorescencia	120,1 (131,9)	63,3 (2,5 - 229,1)
	NE-Tag	113,6 (274,6)	1,78 (0,54 - 93,7)
	InnoZyme	116,2 (281,3)	17,7 (6,87 - 46,8)
Solución neta	Fluorescencia	411,9 (615,5)	44,7 (0,10 - 660,3)
	NE-Tag	81,7 (333,4)	0,40 (0,31 - 0,90)
	InnoZyme	ND	ND

B

Método de análisis	Análisis de actividad por fluorescencia	ELISA de NE-Tag
Fluorescencia		
Lavado con PBS	-	0,330 (0,027)*
Solución neta	-	0,815 (0,000)**
ELISA de NE-Tag		
Lavado con PBS	0,330 (0,027)*	-
Solución neta	0,815 (0,000)**	-
InnoZyme		
Lavado con PBS	0,259 (0,085)	0,910 (0,000)*
Solución neta	ND	ND

Parámetro	Análisis de actividad por Fluorescencia. Valor r (p)	ELISA de NE-Tag Valor r (p)	InnoZyme Valor r (p)
Edad	-0,204 (0,178)	-0,024 (0,876)	-0,047 (0,759)
BMI	-0,085 (0,579)	-0,045 (0,768)	0,113 (0,461)
FEV1 (%)	0,180 (0,236)	-0,313 (0,336)*	-0,384 (0,009)**
FVC (%)	-0,243 (0,121) †	-0,228 (0,147)†	-0,142 (0,369)†
CRP en suero	-0,247(0,102) †	0,314 (0,035)†*	0,245 (0,105)†
WCC total	-0,209 (0,168)	0,554 (0,000)**	0,493 (0,001)**
Neutrófilos totales	-0,238 (0,115)	0,566 (0,000)**	0,514 (0,000)**

Fig. 13