

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 695**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2013 PCT/US2013/020169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103737**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2013 E 13733838 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2800973**

54 Título: **Métodos y compuestos para aumentar la sensibilidad de los ensayos de la botulina**

30 Prioridad:

04.01.2012 US 201261582940 P
31.05.2012 US 201213485537

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2018

73 Titular/es:

BIOMADISON, INC. (100.0%)
1568 Luneta Drive
Del Mar, CA 92014, US

72 Inventor/es:

PIAZZA, TIMOTHY M. y
TUCKER, WARD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 678 695 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

Métodos y compuestos para aumentar la sensibilidad de los ensayos de la botulina

5

Campo de la invención

El campo de la invención es la detección de las neurotoxinas botulínicas (BoNT).

10

Antecedentes de la invención

Las neurotoxinas botulínicas son las sustancias más letales conocidas, y en dependencia del serotipo, la dosis letal humana estimada se encuentra en el intervalo de 1 a 3 ng de toxina por kg de peso corporal. Debido a su facilidad de purificación y alta potencia, las BoNT representan una amenaza real y potencial para su uso como armas biológicas. Además, las BoNT se usan cada vez más con fines cosméticos y terapéuticos. Actualmente, la mayoría de las mediciones de detección y potencia de la BoNT completadas en laboratorios gubernamentales e industriales se realizan con el uso de ensayos basados en animales que presentan altos costos y poca precisión.

15

La principal ventaja de usar ensayos basados en células (CBA) para las mediciones de la potencia de la BoNT es que los sistemas CBA imitan de cerca las etapas fisiológicas individuales que ocurren en las neuronas durante la intoxicación. Las BoNT son endopeptidasas dependientes de zinc compuestas de una cadena pesada, responsable de la unión al receptor neuronal específico y la entrada de células, y una cadena ligera catalítica responsable de la escisión de la proteína sináptica. Al ingresar a las neuronas, las BoNT rompen específicamente la maquinaria proteínica responsable de la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, inhibiendo así la liberación de los neurotransmisores en la unión postsináptica. Debido a que todas las etapas fisiológicas deben tenerse en cuenta en los CBA, la mayoría de los ensayos no cumplen con los requisitos de sensibilidad para la medición de la actividad de la BoNT.

20

25

Recientemente se ha descrito el empleo de líneas celulares de modelo estable establecidas para la detección de las BoNT, sin embargo, los CBA anteriores no cumplen con los requisitos de sensibilidad para la cuantificación de preparaciones farmacéuticas de BoNT o la detección de BoNT en muestras clínicas. Presumiblemente, las líneas celulares modelo actualmente establecidas carecen de características neuronales críticas requeridas para la captación eficiente de la BoNT. Una solución reciente para aumentar la sensibilidad de la BoNT es el uso de células madre embrionarias de ratón (mESC). Debido a que estas células pueden diferenciarse terminalmente en neuronas, son más sensibles al tratamiento con BoNT. Sin embargo, un inconveniente importante de este método son las múltiples semanas requeridas para diferenciar completamente las mESC.

30

35

La publicación de patente internacional núm. WO 2009/035476 A1 describe un constructo molecular que comprende una etiqueta de donante, una etiqueta de aceptor, un péptido enlazador con una secuencia de sitio de escisión y un espaciador. En modalidades específicas, el péptido enlazador es un sustrato de la toxina botulínica que puede reconocerse y escindirse por la toxina botulínica.

40

La publicación de la patente internacional núm. WO 2009/114748 A1 describe un ensayo de actividad de serotipo A de la toxina botulínica basado en la inmunidad. Para determinar la presencia o ausencia de una BoNT/A activa en una muestra, se producen anticuerpos α -SNAP-25 que se unen a un epítipo del sitio de escisión de BoNT/A a partir de un producto de escisión de SNAP-25. Con tal anticuerpo, la cantidad de productos de escisión de SNAP-25 se mide en una línea celular que puede captar BoNT/A de una muestra.

45

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar ensayos basados en células para evaluar y cuantificar la potencia de muestras que contienen BoNT para la defensa de armas biológicas, enfermedades transmitidas por alimentos y propósitos terapéuticos.

50

Breve descripción de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1. En modalidades preferidas, el compuesto comprende el dicloruro de 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina (H7). El reportero es preferentemente un constructo artificial expresado en la célula, y la primera proteína fluorescente se selecciona preferentemente del grupo que consiste en la proteína fluorescente amarilla (YFP), Citrina, Venus y una proteína YPet, y el sitio de escisión comprende preferentemente al menos uno de una proteína, motivo y muteína de SNARE.

55

60

Preferentemente, el reportero *no* se acopla con el segundo fluoróforo de una manera que produzca una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) significativa. En tales modalidades, una célula puede expresar ventajosamente una enzima que facilita la degradación del reportero al menos diez veces más rápido después de la escisión que antes de la escisión, y la presencia de la toxina botulínica se correlaciona con la reducción de la señal a partir de una señal de la línea de base. Como se usa en la presente descripción, el término

65

"ensayos y constructos no-FRET" se refiere a los ensayos y constructos que o bien (a) no tienen señal FRET detectable, o (b) que producen una señal de FRET con una eficiencia de transferencia FRET de menos del 5%, de acuerdo con el método E_1 (la fluorescencia relativa del donante en presencia (FDA) y la ausencia (FD) del aceptor $E_1 = 1 - FDA/FD$) como se describió en "FRET o No FRET: A Quantitative Comparison", Claude Berney y Gaudenz Danuser, *Biophys J.* Junio 2003; 84(6): 3992-4010. Se contempla que cualquier señal de FRET que tenga una eficiencia de transferencia FRET de menos del 5% está a un nivel tan insignificante que no es práctico usar la señal para proporcionar una medida cuantitativa de la concentración de un componente acoplado a FRET.

La porción escindida que contiene el reportero se destruye o de cualquier otra manera se degrada por el entorno local, y la presencia de la sustancia en la investigación se evidencia después por la reducción en la señal del reportero. En el contexto de esta solicitud, se contempla que la degradación de la porción protegida típicamente será intracelular en al menos una de las dos rutas, mediante el proceso dependiente de ubiquitina que dirige las proteínas al proteasoma, o mediante la ruta autofagia-lisosómica. En una ruta, el proteasoma es la enzima. En las rutas lisosomales, se contempla que las enzimas de interés son las hidrolasas, que incluyen especialmente una familia de proteasas denominadas catepsinas.

En otros aspectos de modalidades preferidas, la porción que contiene el reportero escindible comprende, por ejemplo, la proteína fluorescente amarilla (YFP) como proteína fluorescente. La YFP es un mutante genético de la proteína verde fluorescente, derivada de *Aequorea Victoria*, y tiene un pico de excitación de 514nm y un pico de emisión de 527nm.

Se contempla además su uso en la porción que contiene el reportero escindible que son las proteínas estrechamente relacionadas Citrina, Venus y YPet. Las modificaciones redujeron la sensibilidad al cloruro, la maduración más rápida y el brillo aumentado (producto del coeficiente de extinción y el rendimiento cuántico). Por supuesto, cualquiera de las proteínas fluorescentes mencionadas en la presente descripción puede modificarse para incluir características específicas (por ejemplo, espectrales) o truncarse a un tamaño específico.

Tras la escisión, el constructo se divide en dos partes, una porción que contiene el reportero que se destruye o de cualquier otra manera se degrada en el citosol u otro entorno local, y una segunda porción. Para normalizar la detección de señal, esa segunda porción puede incluir ventajosamente una segunda proteína fluorescente, preferentemente en un extremo opuesto del reportero, que puede ayudar a normalizar el ensayo. La segunda proteína fluorescente puede ser, por ejemplo, la Proteína Fluorescente Cian (CFP), mCherry o mStrawberry. La porción que contiene el reportero no se acopla con el segundo fluoróforo de manera que produzca transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

Por lo tanto, antes de la exposición del constructo a BoNT u otra sustancia de escisión, la composición que contiene el constructo (ya sea basada en células o de cualquier otra manera) exhibe una señal de la línea de base, y entonces después de la exposición muestra una señal reducida. Para la medición de la degradación de YFP, se recogen directamente, por separado las emisiones YFP excitadas (superior, Ex500, Em526) y las emisiones de CFP (centro, Ex434, Em470). Estas emisiones se restan del fondo después y la emisión de YFP se divide por la emisión de CFP para controlar la densidad celular y la expresión del reportero en las células individuales. Esa relación de emisión (YFP/CFP, inferior) es cómo se informa el ensayo.

La destrucción u otra degradación de la porción que contiene el reportero se produce a una velocidad mucho más rápida después de la exposición a la BoNT que la preexposición. En modalidades preferidas, se contempla que la destrucción u otra degradación de la porción que contiene el reportero se produce al menos 2 veces (dos veces) tan rápido posterior a la exposición como en la preexposición, pero con mayor preferencia la velocidad posterior a la exposición es al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces con relación a la velocidad de preexposición.

Aun en otros aspectos de las modalidades preferidas, el entorno local es el citosol de una célula viva. Por ejemplo, YFP puede usarse como fluoróforo C-terminal, y CFP puede usarse como fluoróforo N-terminal. El trabajo experimental se ha verificado que, en ausencia de BoNT/A, la YFP puede excitarse directamente y recoger la emisión. La excitación ocurre típicamente a 505nm y la emisión correspondiente a 527nm. En presencia de BoNT/A, el reportero se escinde liberando un fragmento que contiene YFP. Ese fragmento se degrada por la célula, destruyendo el YFP y su emisión. Así, la actividad de BoNT/A se detecta mediante las mediciones con relación a la pérdida en la emisión de YFP. Por lo tanto, no se requiere FRET, lo que evita todos los límites y los problemas indicados anteriormente.

Se contemplan además, los entornos locales para el constructo no FRET que no sean células vivas, que incluyen, por ejemplo, citosol de células lisadas y medios sintéticos que contienen una o más enzimas capaces de degradar el fragmento escindible cuando se escinde de la molécula reportera, pero incapaces o mucho menos capaces de degradar el fragmento escindible antes de escindirse de la molécula reportera.

Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la materia objeto de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de las modalidades preferidas, junto con las figuras de dibujos adjuntas en las que números iguales representan componentes similares.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra que el tratamiento de H7, pero no el tratamiento con calfofostina, IBMX, db-cAMP o 8-Br-cAMP, causa un aumento en la sensibilidad del Ensayo BoCell™.

10 La Figura 2 son gráficos que muestran que el efecto H7 depende de la dosis y no afecta la viabilidad celular.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del pretratamiento de H7 (antes de la adición de BoNT/A). En la presente, H7 incluye además la incubación de BoNT/A.

15 La Figura 4 son los gráficos que muestran que 1) solo la holotoxina (BoNT/A completa) pero no la cadena ligera (fragmento BoNT/A) induce una respuesta en el ensayo BoCell™ y 2) la actividad BoNT/A puede bloquearse por la adición de HcR/A que compite por los receptores celulares. Así, las respuestas de BoNT/A en el ensayo ocurren a través de los mecanismos naturales.

20 La Figura 5 es un gráfico que muestra que múltiples lotes de H7 de diferentes fabricantes causan un aumento en la sensibilidad. (Existe un informe en la literatura que algunos lotes de H7 de ciertos fabricantes no son realmente H7, así, se quiso confirmar el efecto con lotes múltiples.)

25 La Figura 6 es un gráfico que muestra la respuesta y sensibilidad del ensayo en presencia de H7 después de una incubación de 24 y 48 horas con BoNT/A. Se espera que los límites de detección de <3 pM sean posibles con la optimización del ensayo.

La Figura 7A es un esquema de un constructo BoCell™.

30 La Figura 7B es un esquema de un ensayo ilustrativo en el que los reporteros BoNT/A basados en células se usan para detectar la actividad de BoNT/A mediante la pérdida de fluorescencia YFP.

La Figura 8A es una imagen de cambios inducidos por BoNT/A en las respuestas de fluorescencia.

35 La Figura 8B es un gráfico que muestra las relaciones de fluorescencia y las sensibilidades de BoNT/A de los reporteros basados en células.

La Figura 8C es una transferencia de membrana que muestra la actividad de BoNT/A en las células independientemente del reportero.

40 La Figura 9 comprende múltiples gráficos que muestran los datos de emisión tanto para la degradación de YFP como para la pérdida de FRET de acuerdo con la práctica del estado de la técnica a partir de las mismas placas de células.

45 Descripción detallada

Secuencia(s) de escisión

50 En modalidades preferidas, la sustancia en investigación es una toxina botulínica (BoNT), y la secuencia de escisión se corresponde apropiadamente con la sustancia en investigación. Por ejemplo, BoNT/A, E y C escinden SNAP-25, y BoNT/B, D, F, G escinden sinaptobrevina (Syb), en sitios únicos pero diferentes. BoNT/C escinde además a sintaxina además de SNAP-25.

55 Las secuencias de sitios de escisión contempladas pueden comprender ventajosamente (a) una proteína, motivo, o muteína SNARE. "Muteínas" de una proteína deben interpretarse en la presente descripción como que tienen al menos 30% de identidad con una proteína nativa correspondiente, que incluye, por ejemplo, composiciones que tienen al menos 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de identidad con la proteína nativa. Las variaciones de la identidad pueden comprender una o más adiciones, supresiones y sustituciones. Las muteínas contempladas incluyen fragmentos, truncados y proteínas de fusión.

60 Células transfectadas

65 La(s) proteína(s) híbrida(s) que se forman en las células transfectadas preferentemente incluyen un dominio transmembrana, que tiende a localizar las vesículas intracelulares para BoNT/B, D, F y G, y por lo tanto presentan un sustrato unido a las vesículas. La endocitosis mediada por cadenas pesadas de la BoNT en la célula transfectada se sigue por la presentación de la cadena ligera en la superficie externa de la vesícula, permitiendo a la actividad de

la proteasa de la cadena ligera escindir la secuencia de escisión de la(s) proteína(s) híbrida(s), por lo tanto, se escinde la porción que contiene el reportero, que se destruye o degrada después para reducir la señal que se está probando. El Syb de longitud completa, por ejemplo, contiene 116 aminoácidos y se localiza en las vesículas a través de un único dominio transmembrana.

La(s) proteína(s) híbrida(s) que se forman en las células transfectadas incluyen preferentemente un dominio transmembrana, que tiende a ubicarse en la membrana plasmática para BoNT/A, C y E. En algunos ensayos contemplados, el dominio de anclaje a la membrana comprende un fragmento que contiene un sitio de palmitoilación. Los dominios adecuados de anclaje a la membrana se describen, por ejemplo, en el documento de patente núm. US 20060134722 de Chapman.

Aunque se prefiere especialmente que el dominio transmembrana sea el dominio transmembrana de la sinaptobrevina, las mutaciones (por ejemplo, transiciones, transversiones, inserciones, deleciones, inversiones, etc.) de las mismas, e incluso dominios transmembrana no sinaptobrevina se consideran además adecuados para su uso en la presente descripción. Similarmente, se debe apreciar que el dominio transmembrana puede reemplazarse además por otro resto polipeptídico que permita al menos un anclaje temporal de la proteína híbrida a una membrana de manera que el resto de la proteína híbrida se exponga al citosol.

Con respecto a las células transfectadas que expresan la proteína híbrida, generalmente, se prefiere que la célula se transfecte establemente. Sin embargo, se contempla además la transfección transitoria. Todavía más típicamente se prefiere que la célula transfectada sea una célula neuronal. Sin embargo, numerosas otras células no neuronales (que incluyen células de mamíferos, roedores e insectos, e incluso levaduras y células bacterianas) se contemplan además en la presente descripción. Más típicamente, las células expresarán constitutivamente que la(s) proteína(s) híbrida(s) están, por lo tanto, bajo los elementos reguladores apropiados. En aspectos alternativos, la expresión además puede inducirse.

De acuerdo con una modalidad preferida, una molécula de ácido nucleico recombinante, preferentemente un vector de expresión, que codifica un polipéptido sustrato de BoNT y un reportero adecuado se introduce en una célula huésped adecuada. Un experto en la materia puede elegir un vector de expresión adecuado, preferentemente un vector de expresión de mamífero, y reconocerá que hay un enorme número de elecciones. Por ejemplo, la serie pcADN de vectores, tales como pCI y pSi (de Promega, Madison, Wisconsin), CDM8, pCeo4. Muchos de estos vectores usan promotores virales. Preferentemente, se usan promotores inducibles, tales como los vectores tet-off y tet-on de Clontech (Mountain View, California).

Muchas opciones de líneas celulares son adecuadas como célula huésped. Preferentemente, la célula es de un tipo en la que la BoNT respectiva exhibe sus actividades tóxicas. En otras palabras, las células preferentemente muestran receptores de superficie celular adecuados, o de cualquier otra manera permiten que la toxina se transloque en la célula de manera suficientemente eficiente, y permiten que la toxina escinda el polipéptido de sustrato adecuado. Los ejemplos específicos incluyen neuronas cultivadas primarias (neurona cortical, neurona del hipocampo, neurona motora de la médula espinal, etc.); células PC12 o derivadas de líneas celulares PC12; células cromafines de cultivo primario; varias líneas celulares de neuroblastoma cultivado, tales como la línea celular colinérgica Neuro 2a murina, línea celular adrenérgica SK-N-SH humana y línea celular NS-26. Ver por ejemplo, Foster y Stringer (1999), Genetic Regulatory Elements Introduced Into Neural Stem and Progenitor Cell Populations, Brain Pathology 9: 547-567.

La región de codificación para el constructo del sitio reportero / escisión está bajo el control de un promotor adecuado. Dependiendo de los tipos de células huésped usadas, se conocen muchos promotores adecuados y están fácilmente disponibles en la técnica. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Un promotor constitutivo puede seleccionarse para dirigir la expresión del polipéptido deseado. Dicho constructo de expresión puede proporcionar ventajas adicionales ya que elude la necesidad de cultivar los huéspedes de expresión en un medio que contiene un sustrato inductor. Ejemplos de promotores adecuados pueden ser LTR, SV40 y CMV en sistemas de mamíferos; lac o trp de E. coli en sistemas bacterianos; promotor poliedro de baculovirus (polh) en sistemas de insectos y otros promotores que se conocen que controlan la expresión en células eucariotas y procariontes o sus virus. Ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que se prefieren para su uso en huéspedes de expresión fúngica son aquellos promotores que pueden obtenerse a partir de los genes fúngicos para la xilanasasa (xlnA), fitasa, ATP-sintetasa, subunidad 9 (oliC), triosa fosfato isomerasa (tpi), alcohol deshidrogenasa (AdhA), .alfa.-amilasa (amy), amiloglucosidasa (AG--del gen glaA), acetamidasa (amdS) y glicerolaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpd). Ejemplos de promotores de levadura fuertes son los obtenibles a partir de los genes de alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato quinasa y triosafosfato isomerasa. Ejemplos de promotores bacterianos fuertes incluyen promotores de SPO2 así como promotores de genes de proteasas extracelulares.

Los promotores híbridos además pueden usarse para mejorar la regulación inducible del constructo de expresión. El promotor puede incluir adicionalmente características para asegurar o aumentar la expresión en un huésped adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas como una caja Pribnow o una caja TATA. El promotor puede incluso contener otras secuencias para afectar (tal como para mantener, mejorar o disminuir) los niveles de expresión de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, otras secuencias adecuadas

incluyen el intrón Sh1 o un intrón ADH. Otras secuencias incluyen elementos inducibles, como temperatura, elementos químicos, elementos inducibles por estrés o luz. Además, elementos adecuados para mejorar la transcripción o la traducción pueden estar presentes. Un ejemplo de este último elemento es la secuencia señal TMV 5' (ver Sleat, 1987, Gene 217: 217-225; y Dawson, 1993, Plant Mol. Biol. 23: 97).

El vector de expresión además puede contener secuencias que actúan sobre el promotor para amplificar la expresión. Por ejemplo, los elementos que actúan en cis SV40, CMV y polioma (potenciador) y un marcador seleccionable pueden proporcionar un rasgo fenotípico para la selección (por ejemplo, resistencia al dihidrofolato reductasa o neomicina para células de mamífero o resistencia a la ampicilina/tetraciclina para *E. coli*). La selección del vector apropiado que contiene el promotor apropiado y el marcador de selección están dentro del nivel de los expertos en la técnica.

Preferentemente, la región de codificación para el constructo está bajo el control de un promotor inducible. En comparación con un promotor constitutivo, es preferible un promotor inducible porque permite un control adecuado de la concentración del reportero en la célula, por lo tanto, la medición de los cambios en las señales se facilita en gran medida.

Por ejemplo, la expresión puede controlarse con el uso del sistema Tet-on & Tet-off de Clontech (Mountain View, California). Bajo el control de este promotor, la expresión génica puede regularse de manera precisa, reversible y cuantitativa. En resumen, para el sistema Tet-on, la transcripción del gen corriente abajo solo ocurre cuando la doxiciclina está presente en el medio de cultivo. Después de la transcripción durante un cierto período de tiempo, puede cambiarse el medio de cultivo para reducir la doxiciclina, así, detener la síntesis de nuevas proteínas reporteras. Por lo tanto, no existen antecedentes de proteínas reporteras recién sintetizadas, y uno puede ser capaz de ver un cambio más rápido después del tratamiento con la toxina.

Análisis fluorescente

El análisis fluorescente puede llevarse a cabo con el uso de, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para monitorear la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorómetro. La excitación para iniciar la emisión de energía puede llevarse a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado. Será evidente para los expertos en la técnica que los medios de excitación/detección pueden aumentarse mediante la incorporación de medios fotomultiplicadores para mejorar la sensibilidad de detección. Por ejemplo, el método de correlación cruzada de dos fotones puede usarse para lograr la detección en una escala de una sola molécula (ver por ejemplo Kohl y otros, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 99:12161, 2002).

Sensibilizador

En una modalidad particular, el inhibidor dicloruro de 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina (H7) aumenta significativamente la sensibilidad de la línea celular modelo BoCell™ a la neurotoxina botulínica tipo A (BoNT/A).

El pretratamiento de las células de neuroblastoma modificadas BoCell™ con H7 provocó un rápido aumento tanto en la longitud de la neurita como en el número de neuritas por células. El efecto de H7 fue dependiente tanto del tiempo como de la dosis con los efectos máximos observados con el tratamiento de H7 1mM. Además, este cambio fenotípico podría ser "rescatado" mediante la eliminación de H7. Por último, el pretratamiento de las células con H7 aumentó significativamente la sensibilidad de estas células al tratamiento con BoNT/A como se midió mediante la escisión del reportero SNAP-25.

H7 además inhibe las quinasas dependientes de cAMP y cGMP, aunque el pretratamiento de las células con el fármaco HA1004, un inhibidor selectivo de quinasas de cAMP y cGMP falló en inducir cambios morfológicos en células de neuroblastoma, lo que sugiere que el efecto es específico para la inhibición de PKC (1990, artículo JBC). Por otro lado, otras moléculas conocidas como diferenciadores de células neuronales, que incluyen algunos inhibidores de PKA y PKC, no aumentan la sensibilidad del ensayo BoCell™. El aumento de la sensibilidad no se observó con otros fármacos que previamente demostraron inducir la formación de neuritas: Calfostina C, IBMX, dibutilil-cAMP, y 8-Bromoadenosina-cAMP.

Así se contempla que la inhibición de isoformas de PKC específicas con análogos de isoquinolinilo selectivos y otros fármacos puede inferir aumentos similares en la sensibilidad de BoNT/A en líneas celulares modelo establecidas induciendo la formación de neuritas.

Además se contempla que los medios de cultivo pueden incluir uno o ambos de H7 y B27, y que la osmolaridad de los medios de cultivo puede modificarse para optimizar la eficacia con respecto a toxinas botulínicas específicas, especialmente las de la Tabla 1. La osmolaridad puede ajustarse de acuerdo con principios conocidos, que incluyen especialmente la modificación del contenido de sal y/o azúcar. Como se usa en la presente descripción, el término

"optimización" significa tomar medidas para mejorar un resultado deseado, que puede o no alcanzar realmente el mejor resultado posible.

Tabla 1 - Formulaciones excipientes de productos farmacéuticos basados en BoNT/A. Botox® se fabrica por Allergan Inc. (Irvine, CA), Dysport® por Ipsen (Francia) y Xeomin® por Merz GmbH (Alemania).

Terapéutico	Ingrediente activo por vial	Forma suministrada	Excipientes por vial	Concentraciones del contenido en 1 ml
Botox®	BoNT/A 100 U	Polvo liofilizado	HSA 0,5 mg, NaCl 0,9 mg	BoNT/A 100 U, HSA al 0,05%, NaCl 15,4 mM
Dysport®/Reloxin®	BoNT/A 500 U	Polvo liofilizado	HSA 125 µg, lactosa 2,5 mg	BoNT/A 500 U, HSA al 0,0125%, lactosa al 0.25%
Xeomin®	BoNT/A 100 U	Polvo liofilizado	HSA 1 mg, sacarosa 4,7 mg	BoNT/A 100 U, HSA al 0,1%, sacarosa al 0,47%

Resultados experimentales del sensibilizador

El descubrimiento es que el tratamiento de las células BoCell™ con el compuesto H7 aumenta la sensibilidad del ensayo BoCell™. Desde el punto de vista de los métodos, las posibles ventajas tecnológicas del tratamiento con H7 incluyen:

1. Tiempos de ensayo reducidos. Con el tratamiento con H7, se obtuvieron sensibilidades con BoNT/A de BoCell™ después de 24 horas de tratamiento con BoNT/A que son equivalentes a los tratamientos con BoNT/A de 72 horas con las condiciones de ensayo actuales. Una reducción del tiempo de ensayo de 48 horas.

2. Aumento general en la sensibilidad del ensayo. Usando H7 podemos aumentar la sensibilidad del ensayo en 0,5 log - 1,0 log con un tratamiento con BoNT/A de 48 horas en comparación con las condiciones de ensayo actuales. Se espera que aumente aún más la sensibilidad con la optimización del ensayo.

3. Aumenta la sensibilidad de las células neuronales a otros serotipos de BoNT. Actualmente se está probando esto.

Así se contempla que el uso de los compuestos contemplados en la presente descripción puede aumentar la sensibilidad del ensayo en al menos 0,5 log, al menos 0,6 log, al menos 0,7 log, al menos 0,8 log, al menos 0,9 log y al menos 1,0. A menos que el contexto dicte lo contrario, todos los intervalos establecidos en la presente descripción deben interpretarse como inclusivos de sus puntos finales y los intervalos abiertos deben interpretarse para incluir solo valores comercialmente prácticos. Similarmente, todas las listas de valores deben considerarse como inclusivas de valores intermedios a menos que el contexto indique lo contrario.

Las Figuras 1-6 muestran los datos generados con el uso de H7.

En la Figura 1, las BoCell se sembraron y se pretrataron durante 24 horas con A) H7, B) Calfostina C, C) IBMX, D) dibutiliril-cíclico AMP (db-cAMP), o E) 8-brom o-AMP cíclico (8-Br-cAMP) en la concentración indicada. Las células de control se trataron con el vehículo equivalente a la máxima concentración de fármaco probada. Después del pretratamiento, se trataron las BoCell con BoNT/A que contenía la concentración de fármaco indicada durante 24 horas adicionales. La respuesta del ensayo se recolectó leyendo la emisión a 485 y 535 nm con el uso de un lector de microplacas de la serie Tecan™ Infinite 500. Las relaciones de emisión (YFP/CFP) se graficaron como una función de la concentración de BoNT/A. Los datos representan la media ± desviación estándar de la media de las muestras procesadas por triplicado.

En la Figura 2, A) las BoCell se sembraron y se pretrataron durante 24 horas con la concentración indicada de H7. Las células de control se trataron con el vehículo equivalente a la máxima concentración de fármaco probada. Después del pretratamiento. Las BoCell se trataron con BoNT/A que contenía la concentración de fármaco indicada durante 24 horas adicionales. La respuesta del ensayo se recolectó leyendo la emisión a 485 y 535 nm con el uso de un lector de microplacas de la serie Tecan™ Infinite 500. Las relaciones de emisión (YFP/CFP) se graficaron como una función de la concentración de BoNT/A. Los datos representan la media ± desviación estándar de la media de las muestras procesadas por triplicado. B) Las BoCell se tiñeron con azul tripán después se contaron 3x campos de 50 o más células por tratamiento y se calculó la viabilidad celular.

En la Figura 3, se sembraron las BoCell y se pretrataron para cualquiera de los 3. 6. 12 o 24 horas con H7 0,75 mM. Después del pretratamiento. Se trataron las BoCell con BoNT/A que contenía H7 0,75 mM durante 24 horas adicionales. La respuesta del ensayo se recolectó leyendo la emisión a 485 y 535 nm con el uso de un lector de microplacas de la serie Tecan Infinite 500. Las relaciones de emisión (YFP/CFP) se graficaron como una función de la concentración de BoNT/A. Los datos representan la media ± desviación estándar de la media de las muestras procesadas por triplicado.

En la Figura 4, A) las BoCell se sembraron en placas y se pretrataron durante 24 horas con H7 0,75 mM. Después del pretratamiento. Las BoCell se trataron ya sea con holotoxina BoNT/A o cadena ligera de BoNT/A que contenía H7 0,75 mM durante 24 horas adicionales. B.) Las BoCell se pretrataron durante 24 horas con H7 0,75 mM. Se añadió HcR/A 10 mM o vehículo a los pocillos durante 1 hora antes de la adición de BoNT/A. La respuesta del ensayo se recogió después de 24 horas leyendo la emisión a 485 y 535 nm con el uso de un lector de microplacas de la serie Tecan Infinite 500. Las relaciones de emisión (YFP/CFP) se graficaron como una función de la concentración de BoNT/A. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media de las muestras procesadas por triplicado.

En la Figura 5, las BoCell se preincubaron con H7 0,75 mM de tres fabricantes independientes (listados) durante 24 horas después se trataron con BoNT/A en presencia de H7 0,75 mM. La respuesta del ensayo se recogió después de 24 horas leyendo la emisión a 485 y 535 nm con el uso de un lector de microplacas serie Tecan™ Infinite 500. Las relaciones de emisión (YFP/CFP) se graficaron como una función de la concentración de BoNT/A. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media de las muestras procesadas por triplicado.

En la Figura 6, las BoCell se preincubaron con H7 0,75 mM durante 24 horas después se trataron con BoNT/A en presencia de H7 0,75 mM. La respuesta del ensayo se recogió después de 24 horas y 48 horas leyendo la emisión a 485 y 535 nm con el uso de un lector de microplacas serie Tecan™ Infinite 500. Las relaciones de emisión (YFP/CFP) se graficaron como una función de la concentración de BoNT/A. Los datos representan la media \pm desviación estándar de la media de las muestras procesadas por triplicado.

Ensayos no basados en FRET

La Figura 7A representa el constructo BoCell™ A BoNT/A de BioSentinel. El fluoróforo reportero, YFP, y el fluoróforo de normalización, CFP, se acoplan por una secuencia de escisión, SNAP-25 (verde). La palmitoilación de SNAP-25 localiza el reportero a una membrana plasmática.

La Figura 7B representa un ensayo ilustrativo en el que se usan reporteros basados en células BoNT/A para detectar la actividad de BoNT/A por la pérdida de fluorescencia de YFP. Aquí, la porción de YFP se excita directamente lo que conduce a la emisión de fluorescencia en ausencia de BoNT/A. La escisión del reportero mediante BoNT/A libera un fragmento reportero C-terminal que contiene la porción YFP en el citosol. El fragmento se degrada rápidamente y así se pierde la emisión de YFP. La señal de CFP todavía se usa para controlar los niveles de expresión del reportero célula a célula y la densidad celular.

Sorprendentemente, no todas las proteínas fluorescentes relacionadas con YFP son eficaces como fluoróforo reportero. Por ejemplo, las Figuras 8A - 8C proporcionan evidencia de que los reporteros que contienen YFP o el derivado Venus estrechamente relacionado puede detectar la actividad BoNT/A en las células, pero no mCherry o mStrawberry. Aquí, las células Neuro2A se cultivaron en una placa de 96 pocillos con una confluencia del 70% y se transfectaron transitoriamente con el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen™), con reporteros que contienen los pares de fluoróforos indicados N-terminal y C-terminal (N-term/C-term). Después de 24 horas, las células se incubaron en presencia o en ausencia de BoNT/A 10 nM a 37 °C durante 72 horas en 100 μ l de medio MEM libre de rojo fenol.

La Figura 8A muestra los cambios inducidos por BoNT/A en las respuestas de fluorescencia. Se realizaron mediciones semiautomatizadas de fluorescencia de YFP y CFP con el uso de un microscopio fluorescente Nikon™ TE2000-U con 20x aumentos y el software Nikon NIS Elements 3.4. Se muestran campos seleccionados aleatoriamente pseudocoloreados para la relación de fluorescencia de proteína fluorescente (FP) C-terminal/N-terminal. Se calcularon las relaciones a partir de las emisiones recogidas tras la excitación directa de cada fluoróforo.

La Figura 8B representa las relaciones de fluorescencia y las sensibilidades de BoNT/A de los reporteros basados en células. Se analizaron 30 células seleccionadas aleatoriamente por condición para las relaciones de fluorescencia en presencia o ausencia de BoNT/A 10 nM. Se muestra la señal promedio de las 30 células de 5 campos microscópicos en 3 pocillos diferentes. Se excluyeron las células que exhiben fluorescencia sobresaturada.

La Figura 8C es una transferencia de membrana que muestra que BoNT/A estaba activo en las células independientemente del reportero. Todos los reporteros muestran algo de escisión en presencia de BoNT/A, y todos los SNAP25 nativos se escinden. Se transfectaron las células y se trataron con BoNT/A como se describió anteriormente, pero se ampliaron en placas de 6 pocillos. Después de 72 horas de incubación con BoNT/A, las células se lavaron 3X con MEM libre de suero, se recolectaron mediante raspado y se lisaron con el uso de Tampón de Lisis M-Per (Pierce™). Se sometieron 40 μ g de lisado celular a SDS-PAGE antes de la transferencia a papel de nitrocelulosa y el análisis de inmunoelectrotransferencia con el uso de un anticuerpo dirigido contra SNAP-25 (clon 71.2, Synaptic Systems). Las flechas indican la posición de las formas en toda su longitud (cerradas) y escindidas (abiertas) de los reporteros. Se indican los SNAP-25 nativos en toda su longitud (*) y escindidos (**).

La materia de la invención puede extenderse más allá de los sustratos escindibles, a cualquier ensayo que tenga un constructo con un reportero que pueda desprotegerse, y después degradarse de alguna manera por el citosol u otro

entorno local. Por ejemplo, un reportero susceptible podría modificarse para incluir un dominio 'señuelo' que se usa para tamizar contra una biblioteca de proteínas recombinantes que posiblemente podrían unirse al dominio señuelo. Sin el dominio señuelo protegido por una proteína de unión, el reportero susceptible se degradará. En un ensayo de ese tipo, las células que expresan las proteínas de unión formarán un complejo para proteger al reportero susceptible de la degradación, mientras que las células que expresan una pareja de unión al señuelo se iluminarán. El dominio señuelo podría ser ventajosamente un péptido pequeño, y las parejas de unión podrían ser miembros de una biblioteca de proteínas (o mutantes de proteínas). El sistema además podría invertirse de manera que exista una biblioteca de dominios señuelos probados contra una única proteína de prueba (o biblioteca de proteína de prueba).

En cada uno de estos casos se considera ventajoso incluir un segundo reportero que no se degrade después de la exposición por el citosol u otro entorno local, o se degrade al menos mucho más lentamente después de la exposición que el primer reportero.

Todavía más, mientras que el reportero puede seleccionarse convenientemente a partir de fluoróforos adecuados, se contempla que el reportero podría reemplazarse o aumentarse por cualquier otra proteína u otro componente con una función definida que se sabe que (a) tiene un recambio relativamente rápido en la célula sin protección, y (b) que puede protegerse mediante la interacción con una pareja de unión. Las funciones definidas incluyen activadores de transcripción para el gen reportero, represores de genes letales, etc. (cualquier cosa que pueda identificarse o seleccionarse fácilmente).

La Figura 9 comprende múltiples gráficos que muestran los datos de emisión tanto para la degradación de YFP como para la pérdida de FRET de acuerdo con la práctica del estado de la técnica a partir de las mismas placas de células. Para la degradación de YFP, se recogen las emisiones YFP directa y singularmente excitadas (superior, Ex500, Em526) y las emisiones de CFP (centro, Ex434, Em470). Estas emisiones se restan del fondo después y la emisión de YFP se divide por la emisión de CFP para controlar la densidad celular y la expresión del reportero en los pocillos individuales. Esa relación de emisión (YFP/CFP, inferior) se usa después para el reporte del ensayo.

Para la pérdida de FRET, se recogen las emisiones de FRET (superior, Ex434, Em526) y las emisiones de CFP (centro, Ex434, Em470). Estas emisiones se restan del fondo después, y la emisión de FRET se divide por la emisión de CFP para controlar la densidad celular y la expresión del reportero en los pocillos individuales. Esa relación de emisión (FRET/CFP, inferior) se muestra aquí para compararla con el método normal.

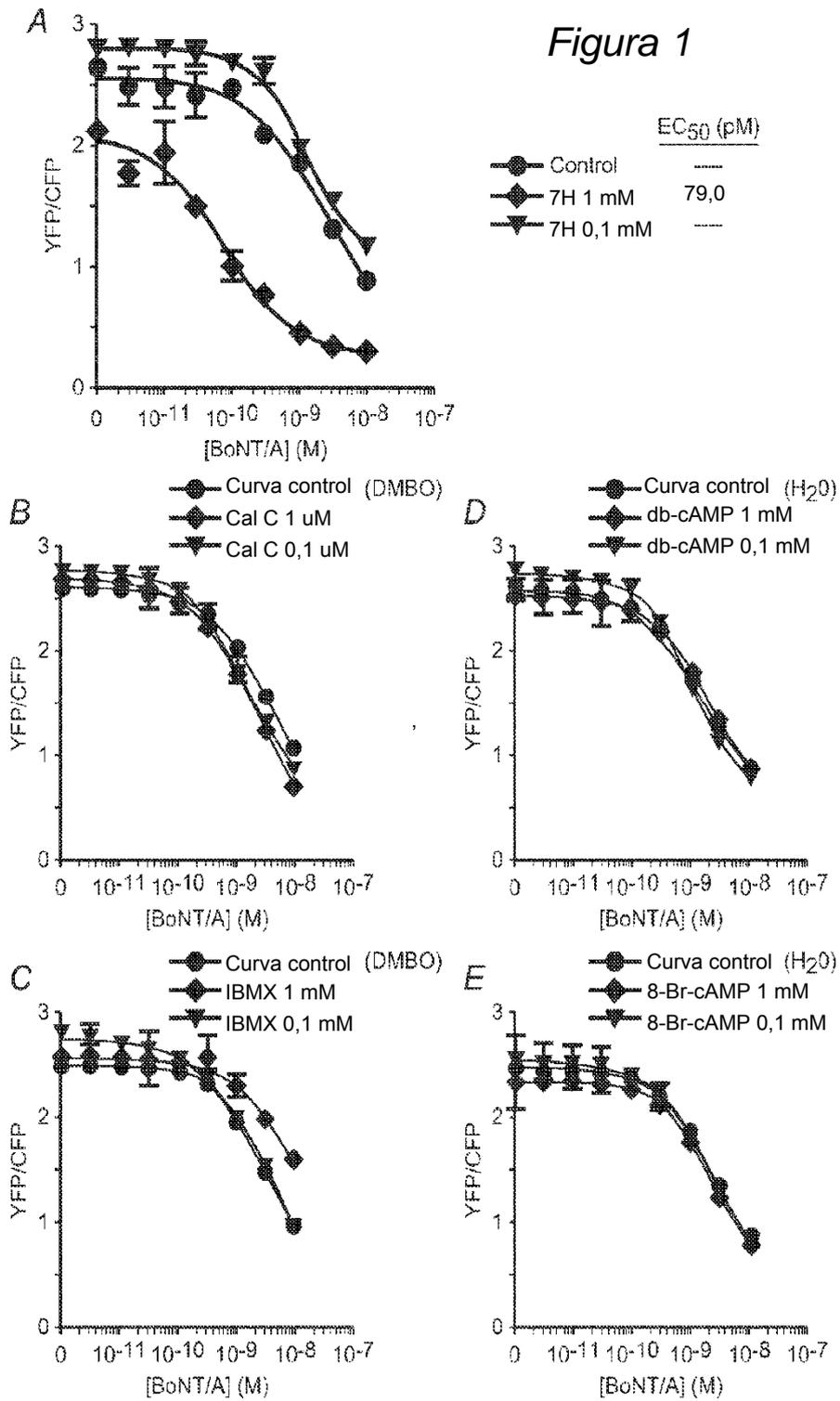
La comparación clave es la pérdida de YFP directamente excitado en función de la pérdida de emisión de FRET. A partir de la comparación entre las mediciones y las curvas correspondientes, resulta inmediatamente evidente que el intervalo dinámico general para la degradación de YFP es mucho mayor que el intervalo dinámico de pérdida de emisiones de FRET. En algunos casos, no hay diferencia, estadísticamente, entre las células tratadas sin BoNT en función de las células tratadas con concentraciones saturantes de BoNT cuando se observan únicamente las emisiones de FRET sin procesar. Para la pérdida del método FRET, la respuesta a la dosis de BoNT solo se vuelve clara después de dividir la emisión de FRET por la emisión de CFP (donante). La emisión de CFP (donante) muestra un pequeño aumento de emisión debido a la desactivación en respuesta a la escisión del reportero.

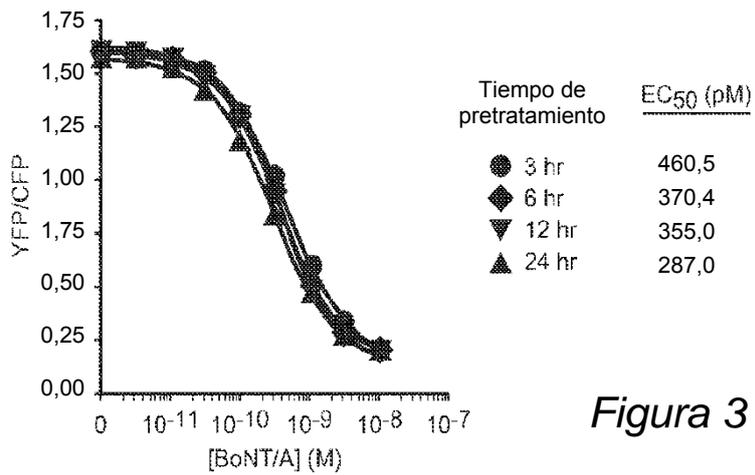
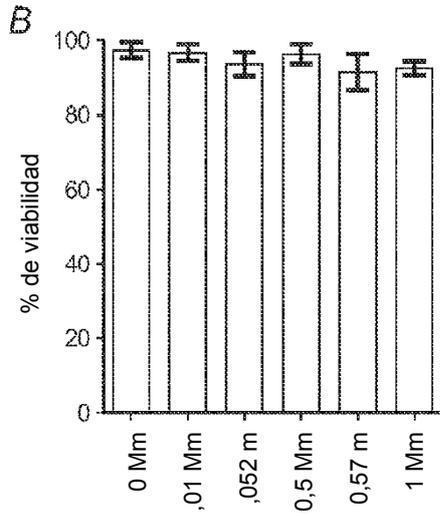
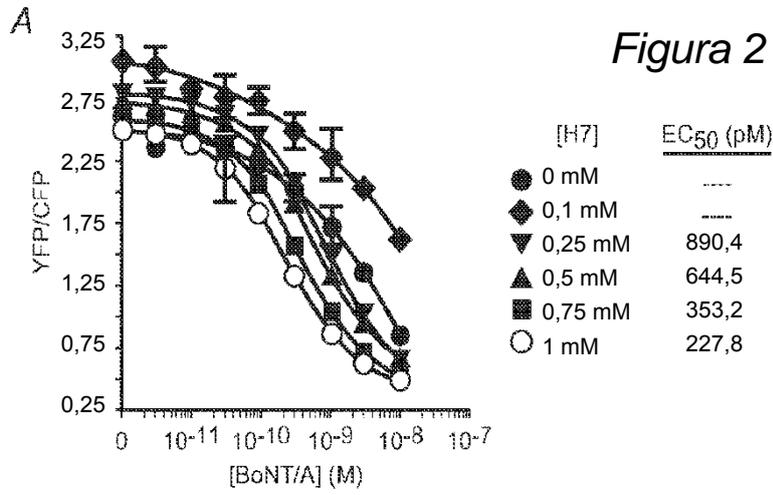
En resumen, la pérdida del método de FRET informa pobremente los cambios inducidos por BoNT en el reportero, o en lo absoluto, y por lo tanto no puede usarse para una determinación cualitativa y cuantitativa correcta. Por el contrario, los métodos preferidos contemplados en la presente descripción tienen un alto grado de especificidad y reproducibilidad, lo que permite confiar en los datos tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo.

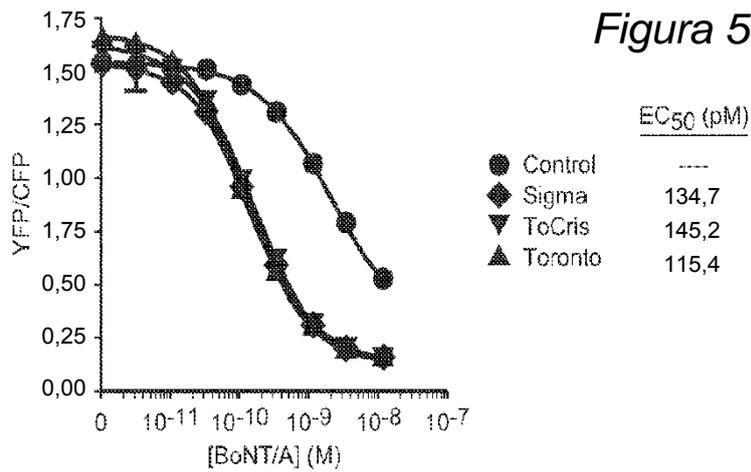
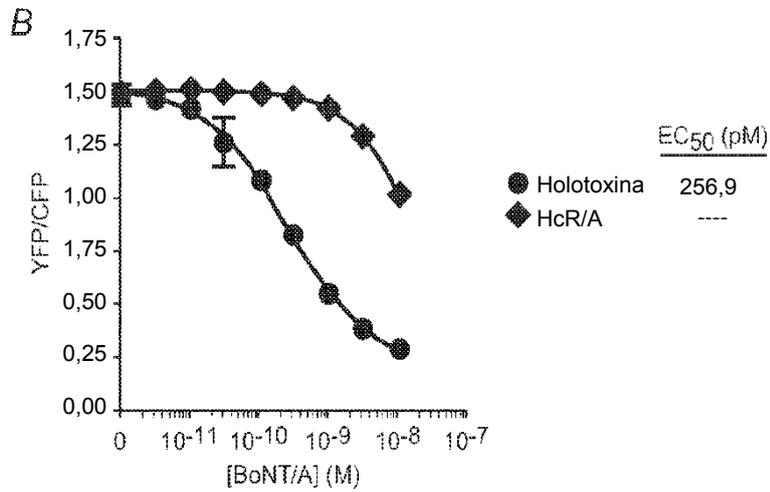
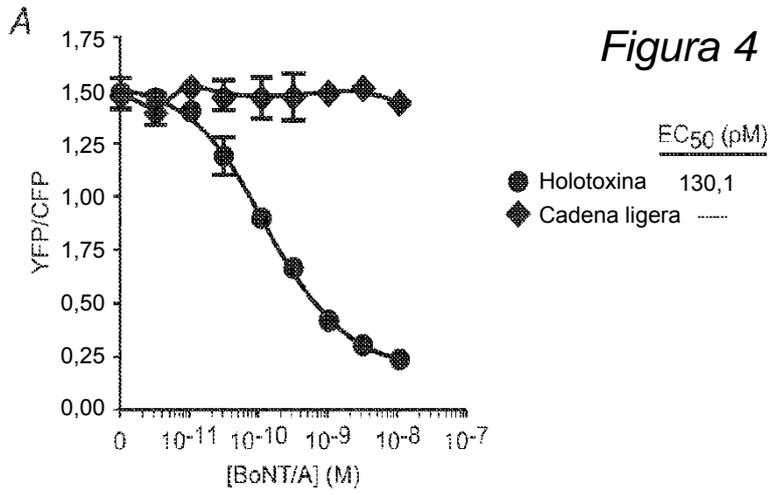
Todos los términos deben interpretarse de la manera más amplia posible en consonancia con el contexto. En particular, los términos "comprende" y "que comprende" deben interpretarse como referencias a elementos, componentes o etapas de manera no exclusiva, lo que indica que los elementos, componentes o etapas a los que se hace referencia pueden estar presentes o utilizarse, o combinarse con otros elementos, componentes o etapas que no se mencionan expresamente. Cuando las reivindicaciones de la especificación se refieren a al menos uno de algo seleccionado del grupo que consiste en A, B, C y N, el texto debe interpretarse como que requiere solo un elemento del grupo, no A más N, o B más N, etc.

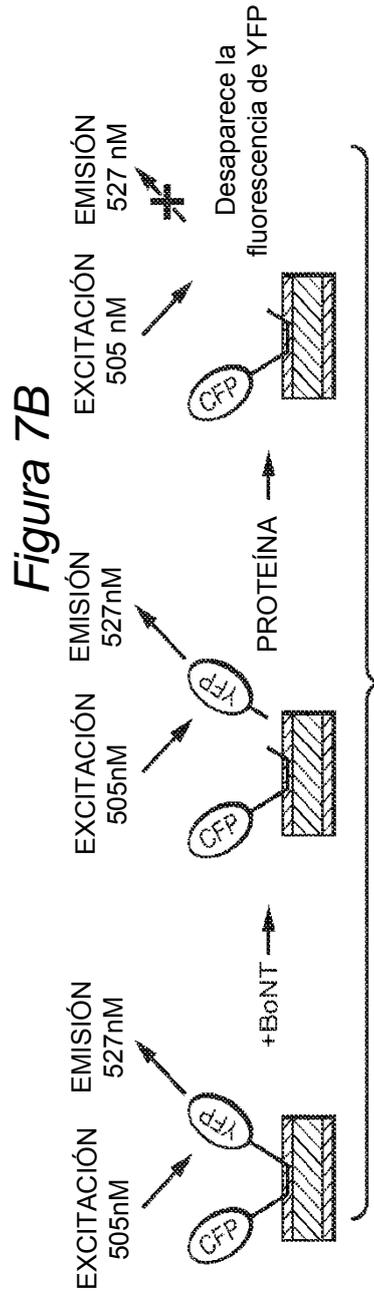
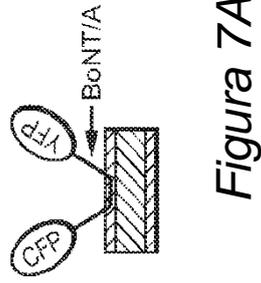
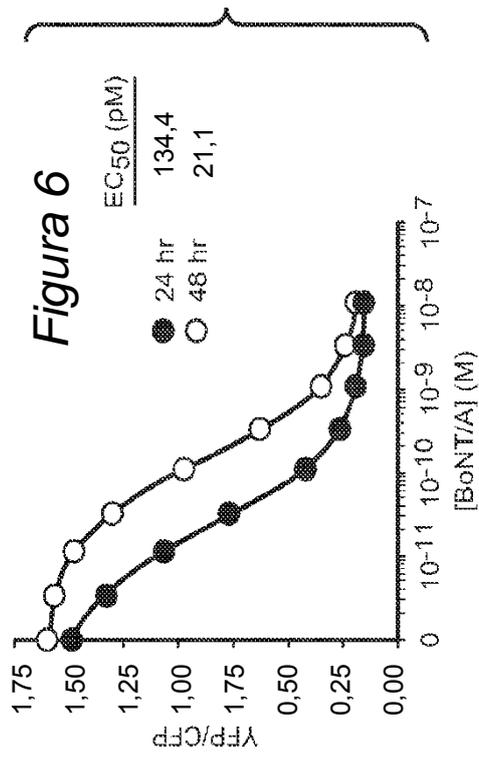
REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de una toxina botulínica, que comprende:
 - 5 proporcionar un ensayo con una célula que tiene (a) una molécula con sitio de escisión que interactúa con una porción de la toxina botulínica y (b) un reportero que proporciona una señal observable tras la escisión de la molécula en el sitio de escisión inducido por la toxina botulínica, caracterizado porque el reportero comprende una proteína fluorescente; e
 - 10 incubar la célula en un medio de cultivo que contiene un compuesto de isoquinolinilo eficaz para aumentar la sensibilidad del ensayo en al menos 0,5 log con relación a una sensibilidad de la línea de base proporcionada por el ensayo que utiliza la incubación en ausencia de dicho compuesto;
 - 15 tratar la célula con una cantidad de toxina botulínica, después detectar la señal, y correlacionar la señal con la presencia o ausencia de la toxina botulínica, en donde dicho compuesto es eficaz tanto para inhibir PKC como para inducir la formación de neuritas.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto de isoquinolinilo comprende dicloruro de 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina (H7).
3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de cultivo comprende B27.
4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la osmolaridad de los medios se optimiza para Botox, es decir, BoNT/A 100 U, HSA al 0,05%, NaCl 15,4 mM o se optimiza para Dysport/Reloxin, es decir, BoNT/A 500 U, HSA al 0,0125%, lactosa al 0,25%, o se optimiza para Xeomin, es decir, BoNT/A 100 U, HSA al 0,1%, sacarosa al 0,47%.
5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el reportero es un constructo artificial expresada en la célula.
6. El método de conformidad con la reivindicación 1 caracterizado porque el reportero comprende la proteína fluorescente y el sitio de escisión, y el sitio de escisión comprende al menos uno de una proteína SNARE, motivo de proteína SNARE y muteína de proteína SNARE.
7. El método de conformidad con la reivindicación 6 caracterizado porque la molécula incluye el reportero y un segundo fluoróforo, preferentemente en donde el reportero no se acopla con el segundo fluoróforo de manera que produce transferencia de energía de resonancia Förster (FRET).
8. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la célula se selecciona para expresar una enzima degradativa que facilita la degradación del reportero al menos dos veces más rápido después de la escisión que antes de la escisión, o en donde la célula se selecciona para expresar una enzima degradativa que facilita la degradación del reportero al menos cinco veces más rápido después de la escisión que antes de la escisión; o en donde la presencia de la toxina botulínica se correlaciona con la reducción de la señal a partir de una señal de la línea de base.
9. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en Proteína fluorescente amarilla (YFP), Citrino, Venus y una proteína YPet.









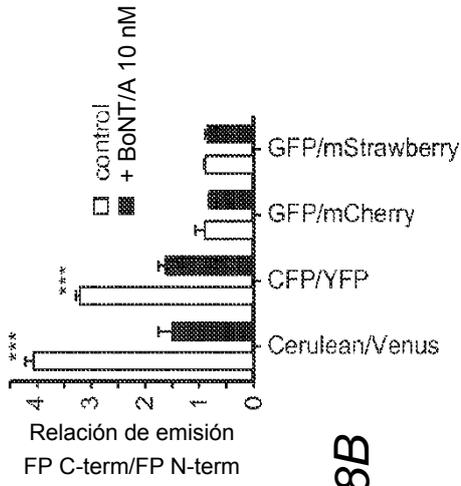


Figura 8B

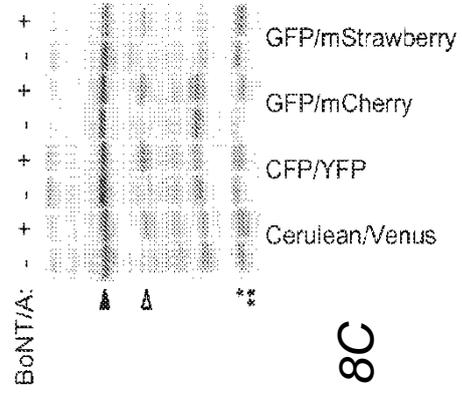


Figura 8C

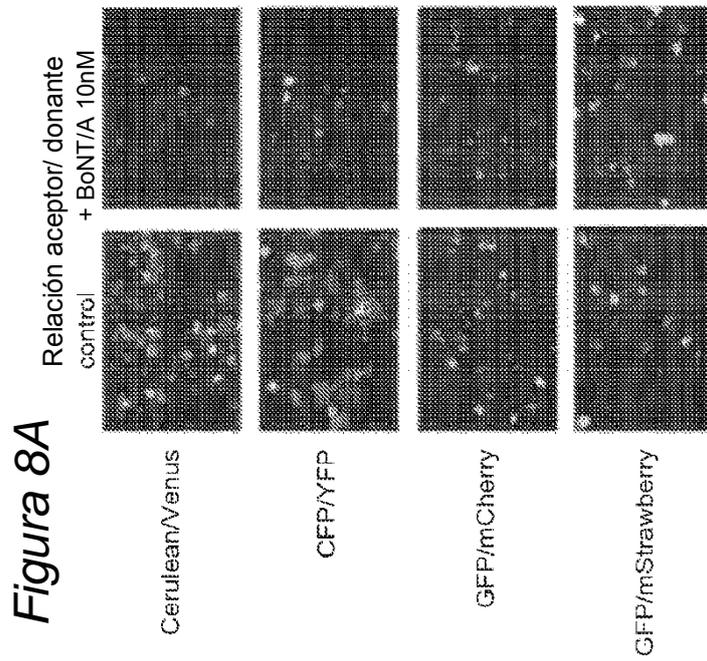
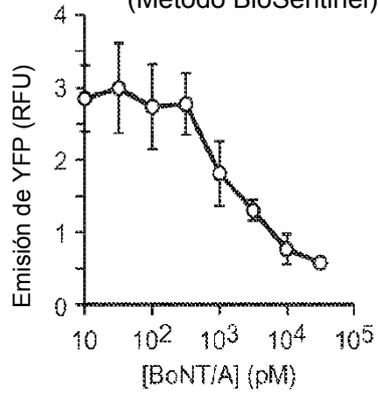


Figura 8A

Figura 9

Degradación de YFP (Método BioSentinel)



Pérdida de FRET

