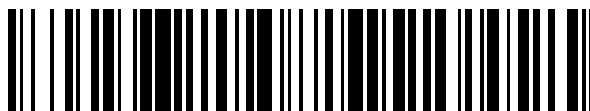


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 050**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2011** **PCT/JP2011/079806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012** **WO12086756**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011** **E 11850746 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** **EP 2657336**

54 Título: **Método de bioensayo para la detección de sustancia fisiológicamente activa**

30 Prioridad:

24.12.2010 JP 2010288305

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2018

73 Titular/es:

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, Kanda Tsukasa-machi 2-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535 , JP

72 Inventor/es:

ARAKI, NAOHIRO;
IIDA, MITSURU y
MACHIDA, KIYOTAKA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 687 050 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de bioensayo para la detección de sustancia fisiológicamente activa

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un kit para su uso en la medición de la cantidad de una forma activa de GLP-1 o la cantidad de AVP en una muestra biológica, a un método de diagnóstico de diabetes insípida o SIADH, a un método de determinación de cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar, a un método de determinación del efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1 y a un método de cribado de un antagonista de GPCR acoplado a G.

Técnica anterior

- 10 Los receptores a los se unen sustancias fisiológicamente activas pueden servir de dianas para el desarrollo de fármacos. Particularmente, los receptores que alteran la concentración de AMPc intracelular como segundos mensajeros, tales como los receptores acoplados a la proteína G (en lo sucesivo, también denominados GPCR), son importantes como dianas para el desarrollo de fármacos. Se han desarrollado hasta la fecha muchos agentes que se unen a dichos receptores. Los ejemplos de dichos GPCR incluyen receptores a los se une la arginina vasopresina
- 15 (en lo sucesivo, también denominada AVP) o el péptido 1 de tipo glucagón (en lo sucesivo, también denominado GLP-1).

- La arginina vasopresina producida por la glándula pituitaria es una hormona peptídica con un peso molecular de 1000 que está compuesta por 9 aminoácidos. La AVP es un tipo de hormona importante de la regulación del agua y de los electrolitos que realiza la reabsorción de agua en el riñón dependiendo de la disminución en el volumen de
- 20 sangre circulante y un aumento en la osmolaridad en plasma. El ensayo de AVP en plasma se aplica clínicamente ampliamente a, por ejemplo, el diagnóstico de trastornos del metabolismo del agua y de los electrolitos, tales como la diabetes insípida que es una afección patológica que implica la disminución de la secreción de AVP o el síndrome de secreción inapropiada de AVP en el que se observa en su lugar el aumento en la secreción de AVP. Además, la AVP no solo se ensaya para enfermedad endocrina, sino que también se usa como un marcador para el pronóstico
- 25 de cáncer de pulmón de células pequeñas o para insuficiencia cardíaca aguda. Se usa ampliamente como método para ensayar AVP un kit de ELISA por el que se permite que AVP químicamente marcada compita con AVP en una muestra y AVP se cuantifica basándose en una tasa de inhibición competitiva. Sin embargo, el método de ELISA que usa la técnica de competición tiene mala sensibilidad y tiene limitaciones en el ensayo de una muestra a microescala en sangre. Puesto que AVP es un péptido de bajo peso molecular, no se puede ensayar AVP en plasma con alta
- 30 sensibilidad debido a la falta de disponibilidad de un ensayo de ELISA de sándwich que use anticuerpos de sándwich contra una pluralidad de determinantes antigénicos que permiten mayor sensibilidad. Así, en la práctica clínica todavía se usa ampliamente un método de radioinmunoensayo que usa AVP marcada con isótopo, que se desarrolló por Robertson et al. en 1973, como un método de ensayo de AVP en plasma (Bibliografía no de patente 1).

- 35 Se conocen como receptores de AVP un receptor de V1a, un receptor de V1b y un receptor de V2 (en lo sucesivo, también denominados V2R). Se ha informado que el antagonista selectivo del receptor de vasopresina V2 tolvaptan es eficaz para hiponatremia (insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática y el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH)) (Bibliografía no de patente 2).

- 40 La incretina, un tipo de hormona gastrointestinal, es secretada del tubo digestivo en respuesta a la estimulación de la ingesta alimentaria y potencia la secreción de insulina de las células beta pancreáticas. Se conocen GLP-1 y GIP (péptido inhibidor gástrico o polipéptido insulínico dependiente de glucosa) como las principales moléculas activas de las hormonas incretinas. Entre ellas, el péptido GLP-1 ha recibido la mayor atención como un regulador de la glucosa en sangre.

- 45 GLP-1 no solo promueve la secreción de insulina dependiente de glucosa, sino que también participa en la inhibición de la secreción de glucagón de células alfa pancreáticas y además en la inhibición del vaciamiento gástrico. Además, GLP-1 puede actuar centralmente sobre el hipotálamo para suprimir el apetito, dando como resultado el control de aumento de peso. Puesto que esta serie de acciones fisiológicas provoca un efecto deseable sobre el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2, se la llevado a cabo ampliamente el desarrollo de fármacos que pretende potenciar la acción de GLP-1.

- 50 GLP-1 es secretado de células L intestinales y se convierte en GLP-1 (7-37) o GLP-1 (7-36 amida) por procesamiento. Ambas formas tienen actividad fisiológica equivalente contra receptores de GLP-1. En sangre, 80 % o más de las formas activas de GLP-1 son las formas GLP-1 (7-36 amida). Estos péptidos GLP-1 se denominan "formas activas de GLP-1". La forma activa de GLP-1 se inactiva inmediatamente en GLP-1 (9-37 o 9-36 amida) mediante la escisión de su resto del extremo N por dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). A este respecto, se han
- 55 desarrollado y se han usado clínicamente ampliamente (Bibliografía no de patente 3) inhibidores de DPP-IV que pretenden potenciar la acción de GLP-1. Además, también se han desarrollado derivados de GLP-1 resistentes a DPP-IV y funcionan como fármacos clínicos. Además, los agentes que dirigen la acción de potenciamiento de la secreción de GLP-1 también están en ensayo clínico como fármacos antidiabéticos de última generación

(Bibliografía no de patente 4). Se espera un aumento en la demanda en un futuro cercano de un método para medir con exactitud y rápidamente la concentración en suero de la forma activa de GLP-1 en la determinación del efecto de estos fármacos potenciadores de la acción de GLP-1.

- 5 Además, se ha informado recientemente que la concentración en suero en ayunas de la forma activa de GLP-1 es mucho más baja en asiáticos que en occidentales, que sugiere que se requerirá un método de ensayo altamente sensible capaz de detectar diferencias en la concentración en suero de la forma activa de GLP-1 entre razas o entre individuos (Bibliografía no de patente 5).

- 10 Ya se ha lanzado un kit de EIA (inmunoensayo enzimático) basado en un método de sándwich de dos anticuerpos como método de medición de la concentración en suero de la forma activa de GLP-1 antes de someterse a degradación. El kit existente se usa en, por ejemplo, la determinación del efecto de inhibidores de DPP-IV que inhiben la degradación de GLP-1. La sensibilidad de detección más baja del método de EIA existente es aproximadamente 1-2 pM (3,3-6,6 pg/ml) para la forma activa de GLP-1 (7-36 amida) y también es del mismo nivel para la forma de GLP-1 (7-37). Puesto que la concentración en ayunas de la forma activa de GLP-1 es 1 pM o más baja en asiáticos, se requiere mayor sensibilidad para medir con exactitud la concentración en ayunas de la forma activa de GLP-1. A este respecto, la concentración y purificación de una muestra son necesarias para el kit existente (Bibliografía no de patente 6).

La Bibliografía de patente 1 y 2 desvela células que expresan un GPCR, un canal de CNG y apoaeucorina recombinante para medir niveles de AMPc intracelular.

- 20 La Bibliografía no de patente 7 desvela un ensayo de alto rendimiento para la monitorización en tiempo real de cambios de AMPc en células vivas usando un colorante sensible al potencial de membrana fluorescente.

Lista de referencias

Bibliografía no de patente

Bibliografía no de patente 1: Robertson, G.L., et al., J. Clin. Invest. 52:2340, 1973

Bibliografía no de patente 2: Plosker G.L., Drugs. 70(4):443-54, 2010

- 25 Bibliografía no de patente 3: Chronic administration of alogliptin, a novel, potent, and highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves glycemic control and beta-cell function in obese diabetic ob/ob mice. European Journal of Pharmacology 588: 325-332 (2008) Moritoh, Y. et al.

Bibliografía no de patente 4: Targeting GRP120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. Trends in Pharmacol. Sci. 32:543-550 (2011) Talukdar, S. et al.

- 30 Bibliografía no de patente 5: Little enhancement of meal-induced glucagon-like peptide 1 secretion in Japanese: Comparison of type 2 diabetes patients and healthy controls. Journal of Diabetes investigation 1: 56-59 (2010) Yabe, D. et al.

Bibliografía no de patente 6: Analysis of glucagon-like peptide 1; what to measure? Clinica Chimica Acta 412, 1191-1194 (2011) Heijboer, A.C. et al.

- 35 Bibliografía no de patente 7: Real-time and high throughput monitoring of cAMP in live cells using a fluorescent membrane potential-sensitive dye. ASSAY and Drug Development Technologies 4 (4): 461-474 (2006) Tang, Y. et al.

Bibliografía de patente 1: US 2009/104644

Bibliografía de patente 2: WO 2007/100618

- 40 Sumario de la invención

Problema técnico a resolver

- 45 Es un objeto de la presente invención un kit para su uso en la medición de la cantidad de una forma activa de GLP-1 o la cantidad de AVP en una muestra biológica, que se puede usar más convenientemente que los kits convencionales sin el uso de un radioisótopo que requiere técnicas o equipo especiales. Además, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método de diagnóstico de diabetes insípida o SIADH, un método de determinación de cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar, un método de determinación del efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1 y un método de cribado de un antagonista de GPCR acoplado a G.

Solución al problema

Los presentes inventores se centraron en la interacción entre un receptor que altera la concentración de AMPc intracelular, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio y se centraron en V2R y un receptor al que se une GLP-1 (en lo sucesivo, también denominado un receptor de GLP-1) como ejemplos del receptor que altera la concentración de AMPc intracelular. Los presentes inventores usaron además la proteína sensible al calcio para medir la cantidad de entrada de ion de calcio en una célula estimulada por AMPc que se forma por la unión de ligandos a estos receptores. Como resultado, los presentes inventores han medido satisfactoriamente las cantidades de ligandos, y, por consiguiente, completado la presente invención.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un kit para su uso en la medición de la cantidad de una forma activa de GLP-1 o la cantidad de AVP en una muestra biológica, que comprende una célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio.

En una realización preferida, el kit es para diagnosticar diabetes insípida o SIADH, para determinar cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar o para determinar el efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de diabetes insípida o SIADH, un método de determinación de cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar o un método de determinación del efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1, que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

(A) preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un "receptor que altera la concentración de AMPc", un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de prueba;

(B) añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (A); y

(C) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de cribado de un antagonista de un GPCR acoplado a G, que comprende las siguientes etapas (A') a (C'):

(A') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un "receptor que altera la concentración de AMPc", un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} , un agonista de GPCR expresado en la célula y un compuesto de prueba;

(B') añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (A'); y

(C') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método de cribado de un antagonista de GPCR acoplado a G, que comprende las siguientes etapas (A'') a (C''):

(A'') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un "receptor que altera la concentración de AMPc", un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene Ca^{2+} , un agonista de GPCR expresado en la célula y un compuesto de prueba;

(B'') añadir forskolina a la mezcla preparada en (A''); y

(C'') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

Efectos de la invención

Con los kits y métodos según la presente invención, se puede medir por procedimientos simples y seguros la cantidad de una forma activa de GLP-1 o la cantidad de AVP en una muestra biológica sin la necesidad de procedimientos complicados acompañados del uso de radioisótopos.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra que la luminiscencia emitida de células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecuatorina modificada depende de una concentración de AVP.

- [Figura 2] La Figura 2 muestra una cantidad de luminiscencia emitida de las células CHO que expresan un receptor de vasopresina humana (V2R humano), canal de CNG modificado y aecurina modificada, en presencia de una baja dosis de AVP.
- 5 [Figura 3] La Figura 3 muestra los efectos del tiempo de incubación sobre una cantidad de luminiscencia emitida de las células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada.
- [Figura 4] La Figura 4 muestra los efectos de una cantidad de plásmido de expresión de V2R introducido en una cantidad de luminiscencia emitida de las células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada.
- 10 [Figura 5] La Figura 5 muestra una relación entre una densidad de células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada, y una cantidad de luminiscencia de las células.
- [Figura 6] La Figura 6 muestra una relación entre una densidad de células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada, y una cantidad de luminiscencia de las células, donde la cantidad de luminiscencia se indica como un valor relativo que se calcula basándose en la suposición de que un valor relativo para cada blanco es 1.
- 15 [Figura 7] La Figura 7 muestra los efectos de una concentración de CaCl_2 añadido sobre una cantidad de luminiscencia emitida de las células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada.
- [Figura 8] La Figura 8 muestra que un kit proporcionado por la presente invención es capaz de cuantificar AVP.
- 20 [Figura 9] La Figura 9 muestra la comparación de los intervalos de medición entre un kit proporcionado por la presente invención y un kit de AVP usando radioinmunoensayo.
- [Figura 10] La Figura 10 muestra el ensayo de plasma individual normal y plasma con un alto nivel de AVP usando un kit proporcionado por la presente invención.
- 25 [Figura 11] La Figura 11 muestra la evolución temporal de una cantidad de luminiscencia emitida de las células CHO que expresan V2R humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada. Se muestra el cambio dependiente del tiempo en la cantidad de luminiscencia para 0 a 5 pg/ml AVP.
- [Figura 12] La Figura 12 muestra el plásmido pmCNG α 2.
- [Figura 13] La Figura 13 muestra el plásmido pcDNA mt s AEQ.
- 30 [Figura 14] La Figura 14 muestra la concentración de un compuesto y la cantidad de luminiscencia después del cultivo de células con un antagonista de la vasopresina (OPC-41061) en un medio que contiene calcio y la posterior adición de AVP 10^{-7} M.
- [Figura 15] La Figura 15 muestra la concentración de AVP y la cantidad de luminiscencia después del cultivo de células con cada concentración de AVP en un medio que contiene calcio y la posterior adición de AVP 10^{-7} M (concentración constante).
- 35 [Figura 16] La Figura 16 muestra la concentración de un compuesto y la cantidad de luminiscencia después del cultivo de células con un antagonista de la vasopresina (OPC-41061) en un medio que contiene calcio, la posterior adición de AVP 10^{-7} M y la adición adicional de forskolina 10^{-4} M.
- [Figura 17] La Figura 17 muestra que la luminiscencia emitida de líneas celulares CHO que expresan el receptor de GLP-1 humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada depende de la concentración de una forma activa de GLP-1.
- 40 [Figura 18] La Figura 18 muestra los efectos del tiempo de incubación sobre la cantidad de luminiscencia emitida de líneas celulares CHO que expresan receptor de GLP-1 humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada.
- 45 [Figura 19] La Figura 19 muestra los efectos de la cantidad de plásmido de expresión del receptor de GLP-1 introducido sobre la cantidad de luminiscencia emitida de líneas celulares CHO que expresan receptor de GLP-1 humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada.
- [Figura 20] La Figura 20 muestra una relación entre una densidad de líneas celulares CHO que expresan el receptor de GLP-1 humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada, y la cantidad de luminiscencia de las células.
- 50 [Figura 21] La Figura 21 muestra una relación entre la densidad de líneas celulares CHO que expresan receptor de GLP-1 humano, canal de CNG modificado y aecurina modificada, y la cantidad de luminiscencia

de las células, donde la cantidad de luminiscencia se indica como un valor relativo que se calcula basándose en la suposición de que un valor relativo para cada blanco es 1.

[Figura 22] La Figura 22 muestra que un kit proporcionado por la presente invención es capaz de cuantificar una forma activa de GLP-1.

5 [Figura 23] La Figura 23 muestra la comparación de los intervalos de medición entre un kit proporcionado por la presente invención y un kit existente para una forma activa de GLP-1 usando ensayo de EIA.

[Figura 24] La Figura 24 muestra un estudio sobre la especificidad de un kit proporcionado por la presente invención para una forma activa de GLP-1 entre péptidos relacionados con incretina.

10 [Figura 25] La Figura 25 muestra el ensayo de la degradación de una forma activa de GLP-1 por la enzima DPP-IV en plasma humano usando un kit proporcionado por la presente invención.

[Figura 26] La Figura 26 muestra concentraciones de exenatida y GLP-1 y la cantidad de luminiscencia cuando se añadieron un agonista de receptor de GLP-1 Byetta (exenatida), que es un fármaco terapéutico para la diabetes mellitus, y una forma activa de GLP-1 (7-36 amida) a las líneas celulares.

15 [Figura 27] La Figura 27 muestra la concentración de un fragmento de exendina de antagonista del receptor de GLP-1 (9-39) y la cantidad de luminiscencia después del cultivo de células con el fragmento de exendina (9-39) y la posterior adición de GLP-1 (7-36 amida) 10 pM (concentración final).

[Figura 28] La Figura 28 muestra el plásmido pmCNGα2.

[Figura 29] La Figura 29 muestra el plásmido pcDNA mt sAEQ.

Descripción detallada

20 1. Célula que expresa "receptor que altera la concentración de AMPc" a la que se une sustancia fisiológicamente activa, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula

En el presente documento se desvela una célula que expresa un "receptor que altera la concentración de AMPc" a la que se une una sustancia fisiológicamente activa, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, y una composición y un kit que comprende la célula.

La sustancia fisiológicamente activa es una sustancia que ejerce acción fisiológica o acción farmacológica sobre los organismos. Los ejemplos de la sustancia fisiológicamente activa incluyen aminos fisiológicamente activos, aminoácidos que actúan como neurotransmisores, péptidos fisiológicamente activos (por ejemplo, vasopresina e incretina), mediadores de lípidos y quimiocinas. Los ejemplos de la vasopresina incluyen AVP. Los ejemplos de la hormona incretina incluyen péptidos relacionados con GLP-1 (por ejemplo, GLP-1, productos de degradación de GLP-1, GLP-2, oxintomodulina y glucagón) y fármacos de péptido fisiológicamente activos de tipo GLP-1 (exenatida y liraglutida).

El "receptor que altera la concentración de AMPc" es un receptor que altera la concentración de AMPc en una célula que expresa el receptor por la unión de una sustancia fisiológicamente activa como su ligando al receptor. Los ejemplos del "receptor que altera la concentración de AMPc" incluyen receptores cuyo segundo mensajero es AMPc, por ejemplo, GPCR cuyo segundo mensajero es AMPc. Los ejemplos de GPCR cuyo segundo mensajero es AMPc incluyen GPCR acoplado a G.

Ejemplos de GPCR acoplado a G incluyen un receptor de vasopresina V2 y un receptor de GLP-1.

40 En una realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, para su uso en la medición de la cantidad de una forma activa de GLP1 o la cantidad de AVP en una muestra biológica.

Aparte de la realización, teóricamente, se puede cuantificar un ligando que se une a GPCR acoplado a Gq usando una célula que expresa GPCR acoplado a Gq y una proteína sensible al calcio. Específicamente, la entrada de ion de calcio desde el canal IP3 del retículo endoplásmico en el citoplasma estimulada por la unión del ligando a GPCR acoplado a Gq se puede detectar usando la proteína sensible al calcio para cuantificar el ligando. Sin embargo, el ligando se puede cuantificar con mayor sensibilidad usando la célula que expresa el GPCR acoplado a G, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendido en la realización. Por ejemplo, se puede detectar AVP con mayor sensibilidad por un sistema para detectar AVP usando una célula que expresa el GPCR acoplado a G V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio que por un sistema para detectar AVP usando una célula que expresa el GPCR acoplado a Gq V1a (o V1b) y una proteína sensible al calcio.

La sustancia fisiológicamente activa se puede asociar a una enfermedad. Como se usa en el presente documento, la enfermedad asociada a la sustancia fisiológicamente activa es una enfermedad en la que participa la sustancia fisiológicamente activa. Los ejemplos de la enfermedad asociada a la sustancia fisiológicamente activa incluyen una enfermedad que se desarrolla debido a una cantidad anormalmente grande o pequeña de la sustancia fisiológicamente activa, una enfermedad cuya afección patológica progresa debido a una cantidad anormalmente grande o pequeña de la sustancia fisiológicamente activa, una enfermedad que se desarrolla debido a una ausencia de funciones normales ejercidas por la sustancia fisiológicamente activa, y una enfermedad cuya afección patológica progresa debido a una ausencia de funciones normales ejercidas por la sustancia fisiológicamente activa. Los ejemplos de la enfermedad asociada a la sustancia fisiológicamente activa incluyen el síndrome de la secreción inapropiada de hormona antidiurética (en lo sucesivo, también denominado ADH), diabetes insípida y diabetes de mellitus de tipo 2.

En una realización, el kit que comprende la célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, proporcionado por la presente invención, puede ser un kit para diagnosticar una enfermedad asociada a la sustancia fisiológicamente activa.

2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula

En una realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio.

V2R es un tipo de receptor al que se une AVP. Este receptor aumenta AMPc activando la adenilato ciclasa. El origen de V2R es un mamífero. El origen puede ser, por ejemplo, un humano, un ratón, bovino o una rata. Además, V2R puede tener uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, delecionados) apropiadamente en la secuencia de aminoácidos, o V2R puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de V2R natural; se une a AVP; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa.

V2R puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 1. Además, V2R puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 1; se une a AVP; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa.

Como se usa en el presente documento, AVP deriva de un mamífero. AVP puede derivar de, por ejemplo, un humano, un ratón, bovino o una rata. AVP puede tener uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, delecionados) apropiadamente en la secuencia de aminoácidos, o puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de AVP natural; se une a V2R; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa.

El canal de calcio dependiente de AMPc es un canal que cambia la cantidad de entrada de ion de calcio en una célula en respuesta al cambio en la concentración de AMPc, e incluye canales que aumentan la cantidad de entrada de ion de calcio en una célula en respuesta al aumento en la concentración de AMPc. Los ejemplos del canal de calcio dependiente de AMPc incluyen un canal de calcio CNG (canal de iones regulado por nucleótidos cíclicos). El canal de iones CNG puede tener uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, delecionados) en la secuencia de aminoácidos y se puede modificar (incluyendo sustituir, añadir, o deleccionar) de forma que presente, por ejemplo, mayor sensibilidad a AMPc que GMPc. El canal de iones CNG puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos del canal de iones CNG natural y aumenta la cantidad de entrada de ion de calcio en una célula en respuesta al aumento en la concentración de AMPc. Los ejemplos de la modificación incluyen la sustitución de la 460^a cisteína en un canal de iones CNG de ratón con triptófano, la sustitución del 583^o ácido glutámico en un canal de iones CNG de ratón con metionina, la sustitución de la 537^a treonina en un canal de iones CNG bovino con serina, metionina, valina, o alanina, y sus combinaciones. Estas sustituciones ejemplificadas anteriormente también son aplicables a la sustitución de aminoácidos en sitios correspondientes en otras especies de animal. Por ejemplo, la treonina en un canal de iones CNG de ratón correspondiente a la 537^a treonina en el canal de iones CNG bovino se puede sustituir con serina, metionina, valina o alanina. Dicha sustitución se puede realizar en una o más posición (posiciones). Por ejemplo, se realiza la sustitución de la 460^a cisteína en el canal de iones CNG de ratón con triptófano, y también se puede realizar la sustitución del 583^o ácido glutámico con metionina.

El canal de iones CNG puede consistir en una subunidad α y/o una subunidad β . Puede ser de cualquier constitución, por ejemplo, consistir en al menos una subunidad seleccionada del grupo que consiste en una subunidad $\alpha 2$, una subunidad $\alpha 3$, una subunidad $\alpha 4$ y una subunidad $\beta 1b$. Además, la subunidad se puede modificar como se ha descrito anteriormente.

El canal de iones CNG es de origen mamífero. El origen puede ser, por ejemplo, un humano, un ratón, bovino, una rata o un cerdo. El canal de iones CNG puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2. Además, el canal de iones CNG puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2 y aumenta la cantidad de entrada de ion de calcio en una célula en respuesta al aumento en la concentración de AMPc.

La proteína sensible al calcio incluye proteínas cuya estructura cambia en respuesta al calcio, e incluye proteínas que emiten luminiscencia en respuesta al calcio y proteínas que actúan como un denominado sensor de calcio.

Los ejemplos de la proteína sensible al calcio incluyen aecuatorina, cameleon (Invitrogen Corp.), Case12 (Evrogen), una proteína que comprende dos GFP que se diferencian en color, unidos a calmodulina sensible al calcio y una secuencia parcial de cinasa de cadena ligera de miosina que se une a ella, una proteína sensible al calcio que comprende calmodulina unida a entre los restos 144° y 146° en la secuencia de aminoácidos de GFP, y una proteína de sonda N° G3-85 o A1-2 descrita en la publicación de solicitud de patente japonesa 2002-153279, y sus apoproteínas, si las hay, (por ejemplo, apoaecuatorina).

La secuencia de aminoácidos de la proteína sensible al calcio se puede modificar (añadir, sustituir, delecionar) apropiadamente según el fin o se puede modificar para aumentar la cantidad de luminiscencia y/o para mejorar una relación SN. La modificación incluye la adición, sustitución y delección de uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, y la modificación a una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína sensible al calcio natural y emite luminiscencia en respuesta al calcio. Por ejemplo, la proteína sensible al calcio se puede modificar de forma que su gen se optimice para uso de codones humanos y tenga una señal de direccionamiento mitocondrial.

La proteína sensible al calcio puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3. Además, la proteína sensible al calcio puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3 y emite luminiscencia en respuesta al calcio.

La célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, expresa transitoria o establemente cada uno de V2R, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio.

La célula puede ser una línea celular tal como una célula CHO, una célula HEK293 o una célula 3T3.

Por ejemplo, la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, puede ser una célula CHO que expresa establemente cada proteína, en la que V2R consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 1, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG modificado que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2 y la proteína sensible al calcio es apoaecuatorina modificada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3. Además, la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, puede ser, por ejemplo, una célula CHO que expresa establemente V2R, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio, cada uno de los cuales es una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 1-3 y mantiene las funciones de V2R, el canal de calcio dependiente de AMPc o la proteína sensible al calcio.

Además, se puede usar una célula que expresa naturalmente una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en V2R, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio. En este caso, la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, también se puede preparar forzando a la célula a expresar transitoria o establemente la(s) proteína(s) que no son expresadas en la célula. Los ejemplos de dicha célula incluyen una célula derivada de riñón que expresa endógenamente V2R que es forzado a expresar transitoria o establemente cada uno del canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio y una célula derivada de tejido olfativo que expresa endógenamente el canal de iones CNG que es forzado a expresar transitoria o establemente cada uno de V2R y la proteína sensible al calcio.

Se pueden crioconservar la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención. La crioconservación se puede realizar a -20 °C a -80 °C, por ejemplo -80 °C, en una disolución de crioconservación de células. La disolución de crioconservación de células incluye CELLBANKER (R) (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.), BAMBANKER (R) (Lymphotec Inc.), Cellvation (R) (CELOX LABORATORIES, Inc.), CryoStor (R) (BIOLIFE SOLUTIONS Ltd.). Las células se pueden crioconservar en un gran número del mismo lote de manera que se reduzca drásticamente un

- error de medición derivado de la célula entre las composiciones o kits. Como resultado, se puede mejorar la reproducibilidad de los resultados de medición. Además, la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, mantiene sensibilidad suficiente para detectar AVP presente en sangre humana, incluso después de que se crioconserva y descongele usando un baño caliente. Además, después de la descongelación, la célula se transfiere simplemente a un recipiente apropiado y se cultiva durante aproximadamente 3 horas en un medio apropiado, y el estado de la célula no se deteriora por un reactivo añadido para detectar AVP, o por componentes derivados de sangre humana.
- Se puede usar una composición que comprende la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como se ha descrito anteriormente, para medir la cantidad de AVP *in vitro*, para determinar cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar, para medir la actividad de un agonista o antagonista de V2R, para diagnosticar una enfermedad asociada a AVP, para determinar un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a AVP y/o para determinar el efecto terapéutico sobre un humano en tratamiento.
- Por consiguiente, en el presente documento se desvelan una composición y un kit para medir la cantidad de AVP *in vitro*, para determinar cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar, para medir la actividad de un agonista o antagonista de V2R, para diagnosticar una enfermedad asociada a AVP, para determinar un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a AVP o para determinar el efecto terapéutico sobre un humano en tratamiento de una enfermedad asociada a AVP, que comprende la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio.
- La célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio es como se ha descrito anteriormente.
- La enfermedad asociada a AVP incluye una enfermedad que implica la producción o acción anormal de AVP. Los ejemplos de la enfermedad asociada a AVP incluyen el síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética (en lo sucesivo, también denominada ADH) (en lo sucesivo, también denominado SIADH) y diabetes insípida.
- SIADH es una enfermedad que se desarrolla debido a la secreción inapropiadamente creciente de AVP o sensibilidad renal anormalmente elevada a AVP. Normalmente, SIADH no ocurre como una única enfermedad y se desarrolla como una complicación o síntoma parcial de una enfermedad diferente. Por ejemplo, SIADH se desarrolla en asociación con enfermedades tales como enfermedades pulmonares (por ejemplo, neumonía y tuberculosis pulmonar), enfermedades nerviosas centrales (por ejemplo, meningitis) y tumores productores de hormona antidiurética ectópica (por ejemplo, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas) y cáncer pancreático) o en asociación con tratamiento con fármacos (por ejemplo, tratamiento con vincristina y clofibrato). SIADH se diagnostica basándose en, por ejemplo, los siguientes criterios de diagnóstico (Tabla 1).

[Tabla 1]

Criterios para diagnosticar SIADH

Pasajes de la guía del diagnóstico de síndrome de secreción inapropiada de vasopresina (SIADH) ^(nota)	
I. Síntoma principal	
1. Síntomas de hiponatremia tales como fatiga, pérdida de apetito y alteración de la consciencia, que no son específicos	
2. No se encuentra deshidratación	
II. Resultados del examen	
1. Hiponatremia: concentración de sodio en suero que se encuentra por debajo de 135 meq/l	
2. Nivel de vasopresina en plasma: el nivel de sodio en suero es inferior a 135 meq/l y el nivel de vasopresina en plasma es igual a o superior a la sensibilidad de medición.	
**3. Baja osmolalidad en plasma: la osmolalidad en plasma se encuentra por debajo de 280 mOsm/kg	
4. Hiperestenuria: la osmolalidad en orina supera 300 mOsm/kg	
5. Sustentación de la natriuresis: la concentración de sodio en orina es 20 meq/l o mayor	
6. Función renal normal: el nivel de creatinina en suero es 1,2 mg/dl o inferior.	
7. Función adrenocortical normal: el nivel de cortisol en suero es 6 µg/dl o superior.	

[Criterios de diagnóstico]

El diagnóstico definitivo se hace cuando están presentes los resultados 1 a 7 de II y no se encuentra deshidratación.

[Diagnóstico diferencial] Se excluyen los siguientes que conducen a hiponatremia:

1. Hiponatremia con un exceso de un líquido extracelular: Insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática durante la retención ascítica y síndrome nefrótico
2. Hiponatremia con una sustancial fuga de sodio: pérdida de sodio renal, diarrea y vómitos

****Nota)** Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Measures for Intractable Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan Survey and Research on Diencephalic-Pituitary Dysfunction: 2008 Annual Report of Research: March 2009: p. 124

La diabetes insípida es una enfermedad que implica la excesiva micción resultante de la reducida síntesis o acción de AVP. La diabetes insípida incluye diabetes insípida central y diabetes insípida renal. La diabetes insípida central se diagnostica por, por ejemplo, 1. confirmación de la excesiva micción (3 l/día o más), 2. análisis de orina: negativo para glucosa en orina y bala osmolalidad de la orina, 3. confirmación de la disfunción secretora de AVP por un ensayo de carga con 5 % de solución salina hipertónica, 4. búsqueda de una lesión en una región del hipotálamo o la glándula pituitaria por obtención de imágenes de diagnóstico (MRI), y 5. confirmación de la capacidad para concentrar la orina por administración de desmoresina.

La cantidad de AVP se puede medir *in vitro* usando el siguiente evento:

Cuando está presente AVP en una muestra biológica, AVP aumenta AMPc actuando sobre el V2R expresado en la célula como está comprendido en el kit de la presente invención. Como resultado, el canal de iones CNG se activa de manera que aumenta la entrada de calcio en la célula. Así, la proteína sensible al calcio emite luminiscencia. Esto significa que la presencia de AVP en la muestra se representa por la luminiscencia de la proteína sensible al calcio como salida.

En una realización de la presente invención, el uso del kit proporcionado por la presente invención basado en el fenómeno descrito anteriormente puede medir la cantidad de AVP en una muestra biológica.

Como se usa en el presente documento, la muestra biológica incluye muestras derivadas de organismos tales como sangre, orina y una muestra preparada a partir de sangre o sangre e incluye, por ejemplo, sangre humana, una muestra preparada a partir de sangre humana, orina humana y una muestra preparada a partir de orina humana. La muestra biológica se puede diluir apropiadamente con una disolución acuosa apropiada. Por ejemplo, una muestra de orina humana se puede diluir 4 a 20 veces con solución salina fisiológica y usar con el kit proporcionado por la presente invención.

Usando el kit proporcionado por la presente invención, la cantidad de AVP en sangre humana u orina se puede medir usando el evento para diagnosticar que un sujeto de prueba tiene una enfermedad asociada a AVP (por ejemplo, diabetes insípida o SIADH) o no.

Por ejemplo, cuando se sospecha que un sujeto de prueba tiene SIADH, se puede diagnosticar que el sujeto de prueba tiene SIADH o no por uso del evento descrito en (1) usando el kit proporcionado por la presente invención midiendo la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula tratada con una muestra de sangre del sujeto de prueba y la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre de un individuo normal (estándar) que la de la muestra de sangre del sujeto de prueba. Por ejemplo, cuando la cantidad de luminiscencia emitida de la célula tratada con la muestra de sangre del sujeto de prueba es superior a la emitida de la célula tratada con la muestra de sangre del individuo normal (estándar), se puede determinar que la concentración en suero de AVP del sujeto de prueba es superior a la del individuo normal. Esto constituye motivos para el diagnóstico de SIADH del sujeto de prueba.

Además, por ejemplo, cuando se sospecha que un sujeto de prueba tiene diabetes insípida, se puede diagnosticar que el sujeto de prueba tiene diabetes insípida o no por uso del evento descrito en (1) usando el kit proporcionado por la presente invención midiendo la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula tratada con una muestra de sangre del sujeto de prueba y la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula tratada con la misma cantidad de una muestra de sangre de un individuo normal (estándar) que la de la muestra de sangre del sujeto de prueba. Por ejemplo, cuando la cantidad de luminiscencia emitida de la célula tratada con la muestra de sangre del sujeto de prueba es inferior a la emitida de la célula tratada con la muestra de sangre del individuo normal (estándar), se puede determinar que la concentración en suero de

AVP del sujeto de prueba es más baja que la del individuo normal. Esto constituye motivos para el diagnóstico de diabetes insípida del sujeto de prueba.

Para la medición de la cantidad de luminiscencia, se prefiere medir el valor integrado durante el tiempo dado. Por ejemplo, el valor integrado se puede medir durante 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos, o 1 minuto.

Cuando se administra una infusión de fluido a un paciente diagnosticado de SIADH usando el kit proporcionado por la presente invención, se selecciona una infusión de fluido hipertónico. Cuando se administra una infusión de fluido a un paciente diagnosticado de diabetes insípida usando el kit proporcionado por la presente invención, se selecciona una infusión de fluido hipotónico. Por consiguiente, el kit proporcionado por la presente invención se usa para determinar cualquiera de una infusión de fluido hipotónico o una infusión de fluido hipertónico a administrar a un paciente.

Además, la cantidad de AVP en sangre humana u orina se puede medir usando el kit proporcionado por la presente invención para determinar un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a AVP, por ejemplo, un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar SIADH o diabetes insípida.

Por ejemplo, cuando la concentración en suero de AVP medida usando el kit proporcionado por la presente invención en el examen médico es inferior al valor numérico de un paciente con SIADH y superior al valor numérico de un individuo normal, se puede determinar que esta persona es un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar SIADH. Cuando la concentración en suero de AVP es superior al valor numérico de un paciente con diabetes insípida e inferior al valor numérico de un individuo normal, se puede determinar que esta persona es un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar diabetes insípida. Además, cuando la concentración en suero de AVP aumenta gradualmente con el tiempo, se puede determinar que esta persona es un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar SIADH. Cuando la concentración en suero de AVP disminuye gradualmente con el tiempo, se puede determinar que esta persona es un humano que tiene un alto riesgo de desarrollar diabetes insípida.

Además, la cantidad de AVP en sangre humana u orina se puede medir usando el kit proporcionado por la presente invención para determinar la eficacia de tratamiento para un humano en tratamiento de una enfermedad asociada a AVP, por ejemplo, un humano con SIADH o diabetes insípida en tratamiento de la misma.

Por ejemplo, se pueden medir la concentración de AVP en muestras de sangre recogidas del mismo individuo tanto antes como después del tratamiento y el cambio dependiente del tiempo en la concentración usando el kit proporcionado por la presente invención para determinar la presencia o ausencia de eficacia del tratamiento. Por ejemplo, cuando la concentración en suero de AVP medida usando el kit proporcionado por la presente invención es inferior después del tratamiento que antes del tratamiento, se puede determinar que es eficaz el tratamiento de SIADH. Cuando la concentración en suero de AVP es superior después del tratamiento que antes del tratamiento, se puede determinar que es eficaz el tratamiento de diabetes insípida.

La actividad de un agonista o antagonista de V2R se puede medir usando el kit proporcionado por la presente invención. Por ejemplo, la actividad de un agonista de V2R se puede medir añadiendo el agonista de V2R a la composición como está comprendida en el kit de la presente invención en ausencia de AVP y cuantificando la luminiscencia de la proteína sensible al calcio. Además, por ejemplo, la actividad de un antagonista de V2R se puede medir añadiendo el antagonista de V2R a la composición como está comprendida en el kit de la presente invención en presencia de AVP y cuantificando la luminiscencia de la proteína sensible al calcio.

Un kit que comprende una composición que comprende la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio proporcionado por la presente invención puede comprender además al menos un seleccionado del grupo que consiste en un medio para cultivo celular, una disolución de detección, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio o una disolución acuosa del mismo, una placa para cultivo celular o un tubo de ensayo, AVP o una disolución acuosa del mismo y un suero de control humano normal.

El kit se puede preparar apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cada sustancia que constituye el kit y la composición se envasan individualmente, y estos envases se pueden poner juntos en un recipiente tal como una caja para preparar un kit.

La composición que comprende la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendidos en el kit de la presente invención, se puede preparar apropiadamente, y se prepara, por ejemplo, suspendiendo la célula a una densidad de 3×10^6 células/ml en una disolución acuosa.

El medio para cultivo celular es adecuado para mantener la célula proporcionada por la presente invención. El medio para cultivo celular puede ser sin Ca^{2+} o sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

La disolución de detección puede contener CaCl_2 , azul de tripano, un catión que es capaz de causar la luminiscencia de aeuorina y se puede sustituir por calcio (por ejemplo, un ion de cadmio o un ion de estroncio), un ion de magnesio, un ion de cinc, un ion de sulfato y/o un ion de carbonato. Las concentraciones de CaCl_2 y azul de tripano se pueden ajustar apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la concentración de CaCl_2 es 9 a 100

mM, y la concentración de azul de tripano es 0,001 a 0,010 %. La disolución de detección es, por ejemplo, una disolución acuosa que contiene CaCl_2 9 mM y 0,002 % de azul de tripano. La concentración final de CaCl_2 cuando se mide la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio se puede establecer a 3 a 33 mM. Además, la disolución de detección puede contener un catión que se puede sustituir por calcio, un ion de magnesio, un ion de cinc, un ion de sulfato y/o un ion de carbonato, por ejemplo, disolviendo el catión que se puede sustituir por calcio, el ion de magnesio, el ion de cinc, el ion de sulfato y/o el ion de carbonato en la disolución de detección.

El sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio incluye coelenteracina o un derivado de coelenteracina que sirve de sustrato luminiscente para aequorina. El derivado de coelenteracina incluye ViviRen (R), (Promega Corp.: éster 8-bencil-2-(4-hidroxibencil)-6-(4-hidroxifenil)imidazo[1,2-a]pirazin-3-butiloximetílico). Se puede establecer apropiadamente la concentración del sustrato luminiscente (por ejemplo, ViviRen) para la proteína sensible al calcio. La disolución acuosa del sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio es, por ejemplo, una disolución acuosa de ViviRen 4 mM (Promega Corp.).

Los ejemplos de la placa para cultivo celular incluyen los que permiten la medición de la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro, por ejemplo, una placa de 96 pocillos que permite el cultivo celular.

El tubo de ensayo se puede seleccionar apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un tubo de ensayo adecuado para un aparato para medir la luminiscencia emitida de la proteína sensible al calcio.

Se puede usar AVP como agonista de V2R. Se puede usar AVP como control positivo. AVP puede ser AVP humano. La concentración de AVP se puede preparar apropiadamente por los expertos en la técnica.

El suero de control humano normal se puede usar como control negativo y se puede preparar apropiadamente por los expertos en la técnica.

El kit proporcionado por la presente invención también es útil para ayuda de diagnóstico que ayuda a un médico a diferenciar una enfermedad asociada a AVP (por ejemplo, SIADH o diabetes insípida) de otras enfermedades en vista de los síntomas clínicos del paciente y/u otros resultados de exámenes. Por ejemplo, la medición de la cantidad de AVP en una muestra de sangre de un paciente que presenta síntomas de SIADH usando el kit proporcionado por la presente invención puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre SIADH e insuficiencia cardíaca. Además, la medición de la cantidad de AVP en una muestra de sangre de un paciente que presenta síntomas de diabetes insípida usando el kit proporcionado por la presente invención puede ser útil para el diagnóstico diferencial entre diabetes insípida y polidipsia primaria.

El kit que comprende la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, proporcionado por la presente invención, es capaz de detectar AVP, un agonista de V2R o un antagonista de V2R con alta sensibilidad.

Por consiguiente, el kit proporcionado por la presente invención no incluye preferentemente un instrumento o un aparato para concentrar AVP, un agonista de V2R o un antagonista de V2R de una muestra biológica (por ejemplo, columnas (por ejemplo, columnas C18 tales como columnas Sep-Pak C18) o un aparato de ultrafiltración).

3. Célula que expresa receptor de GLP-1, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula

En una realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio.

El receptor de GLP-1 es un tipo de receptor al que se une un péptido GLP-1. Este receptor aumenta AMPc, activando la adenilato ciclasa. El origen del receptor de GLP-1 es un mamífero. El origen puede ser, por ejemplo, un humano, un ratón, bovino o una rata. Además, el receptor de GLP-1 puede tener uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, deletados) apropiadamente en la secuencia de aminoácidos, o el receptor de GLP-1 puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos del receptor de GLP-1 natural; se une a GLP-1; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa.

El receptor de GLP-1 puede ser una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 8. Además, el receptor de GLP-1 puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 8; se une a GLP-1; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa.

Como se usa en el presente documento, el péptido relacionado con GLP-1 deriva de un mamífero. El péptido relacionado con GLP-1 puede derivar de, por ejemplo, un humano, un ratón, bovino, una rata o un conejo. GLP-1 puede tener uno o varios (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos modificados (añadidos, sustituidos, deletados) apropiadamente en la secuencia de aminoácidos o puede tener un grupo modificador tal como un

ácido graso introducido en un aminoácido en el péptido. Alternativamente, GLP-1 puede ser una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de GLP-1 natural; se une a un receptor de GLP-1; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa. Además, el fármaco de péptido fisiológicamente activo de tipo GLP-1 puede derivar de, por ejemplo, un lagarto o puede ser una proteína que tiene 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 98 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con GLP-1 natural; se une a un receptor de GLP-1; y tiene la función de aumentar AMPc mediante la activación de la adenilato ciclasa. Los ejemplos del fármaco de péptido fisiológicamente activo de tipo GLP-1 incluyen exenatida y liraglutida.

Se puede usar lo descrito anteriormente en "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula" como el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio.

La célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, expresa transitoria o establemente cada uno del receptor de GLP-1, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio. La célula puede ser una línea celular tal como una célula CHO, una célula HEK293 o una célula 3T3. Por ejemplo, la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, puede ser una célula CHO que expresa establemente cada proteína, en el que el receptor de GLP-1 consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 8, el canal de calcio dependiente de AMPc es el canal de iones CNG modificado que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2, y la proteína sensible al calcio es apoaequorina modificada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3. Además, la célula del receptor de GLP-1, como está comprendida en el kit de la presente invención, puede ser, por ejemplo, una célula CHO que expresa establemente el receptor de GLP-1, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio, cada uno de los cuales es una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene 70 % o más, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID N°: 8, 2 y 3 y mantiene las funciones del receptor de GLP-1, el canal de calcio dependiente de AMPc o la proteína sensible al calcio.

Además, se puede usar una célula que expresa naturalmente una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en el receptor de GLP-1, el canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio. En este caso, la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, también se puede preparar forzando a la célula a expresar transitoria o establemente la(s) proteína(s) que no son expresadas en la célula. Los ejemplos de dicha célula incluyen una célula derivada de páncreas que expresa endógenamente el receptor de GLP-1 que es forzado a expresar transitoria o establemente cada uno del canal de calcio dependiente de AMPc y la proteína sensible al calcio y una célula derivada de tejido olfativo que expresa endógenamente el canal de iones CNG que es forzada a expresar transitoria o establemente cada uno del receptor de GLP-1 y la proteína sensible al calcio.

Se puede crioconservar la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención. La crioconservación se puede llevar a cabo similarmente a la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio como se ha descrito anteriormente en "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula".

La célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit de la presente invención, mantiene sensibilidad suficiente para detectar GLP-1 presente en sangre humana, incluso después de que se crioconserva y descongele usando un baño caliente. Además, después de descongelar, la célula se transfiere simplemente a un recipiente apropiado y se cultiva durante varias horas en un medio apropiado, y el estado de la célula no se deteriora por un reactivo añadido para detectar GLP-1, o por componentes derivados de sangre humana.

En el presente documento se desvelan una composición y un kit para medir la cantidad de una forma activa de GLP-1 *in vitro*, para medir la actividad de un agonista o antagonista de receptor de GLP-1 o para determinar el efecto terapéutico sobre un humano en el tratamiento de una enfermedad asociada a GLP-1, que comprende la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio.

La célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio es como se ha descrito anteriormente.

La enfermedad asociada a GLP-1 incluye una enfermedad que se trata deseablemente por potenciamiento en la acción de GLP-1, tal como diabetes mellitus de tipo 2.

En el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2, se usa un inhibidor de DPP-IV, que es una enzima degradadora de GLP-1, con el fin de potenciar la acción de GLP-1. Alternativamente, se usa un análogo de GLP-1 que tiene resistencia a la degradación por DPP-IV en el tratamiento de la misma.

La cantidad de GLP-1 se puede medir *in vitro* usando el siguiente evento:

Quando la forma activa de GLP-1 está presente en una muestra biológica, la forma activa de GLP-1 aumenta AMPc actuando sobre el receptor de GLP-1 expresado en la célula como está comprendida en el kit de la presente invención. Como resultado, el canal de iones CNG se activa de manera que aumenta la entrada de calcio en la célula. Así, la proteína sensible al calcio emite luminiscencia. Esto significa que la presencia de la forma activa de GLP-1 en la muestra se representa por la luminiscencia de la proteína sensible al calcio como salida.

La cantidad de la forma activa de GLP-1 en una muestra biológica se puede medir por el uso del evento usando el kit proporcionado por la presente invención.

La muestra biológica es como se ha descrito anteriormente en "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula".

Además, se puede ensayar la forma activa de GLP-1 en sangre humana u orina usando el kit proporcionado por la presente invención para determinar la eficacia de tratamiento para un humano en tratamiento de una enfermedad asociada a GLP-1, por ejemplo, un humano con diabetes mellitus de tipo 2 en tratamiento que aumenta la cantidad de una forma activa de GLP-1.

Por ejemplo, se pueden medir la concentración de la forma activa de GLP-1 en muestras de sangre recogidas del mismo individuo tanto antes como después del tratamiento, y el cambio dependiente del tiempo en la concentración usando el kit proporcionado por la presente invención para determinar la presencia o ausencia de eficacia del tratamiento. Por ejemplo, cuando la concentración en suero de la forma activa de GLP-1 medida usando la composición como está comprendida en el kit de la presente invención es mayor después del tratamiento que antes del tratamiento, se puede determinar que es eficaz un fármaco terapéutico que aumenta la cantidad de una forma activa de GLP-1 (por ejemplo, un inhibidor de DPP-IV).

Se puede medir la actividad de un agonista o antagonista de GLP-1 usando el kit proporcionado por la presente invención. Por ejemplo, se puede medir la actividad de un agonista de GLP-1 añadiendo el agonista de GLP-1 a la composición como está comprendida en el kit de la presente invención en ausencia de GLP-1 y cuantificando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio. Además, por ejemplo, se puede medir la actividad de un antagonista de GLP-1 añadiendo el antagonista de GLP-1 a la composición como está comprendida en el kit de la presente invención en presencia de GLP-1 y cuantificando la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio.

Un kit que comprende una composición que comprende la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio puede comprender además al menos uno seleccionado de un medio para cultivo celular, una disolución de detección, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio o una disolución acuosa del mismo, una placa para cultivo celular o un tubo de ensayo, GLP-1 o una disolución acuosa del mismo y un plasma de control humano normal.

El kit se puede preparar apropiadamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se envasan individualmente cada sustancia que constituye el kit y la composición, y estos envases se pueden poner juntos en un recipiente tal como una caja para preparar un kit.

Se puede usar GLP-1 como un agonista de receptor de GLP-1. Se puede usar GLP-1 como control positivo. GLP-1 puede ser GLP-1 derivado de humano. La concentración de GLP-1 se puede ajustar apropiadamente por los expertos en la técnica.

Las otras sustancias contenidas en el kit se pueden preparar con referencia a la descripción de "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula".

El kit que comprende la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, proporcionado por la presente invención, es capaz de detectar GLP-1, un agonista de receptor de GLP-1 o un antagonista de receptor de GLP-1 con alta sensibilidad.

Por consiguiente, el kit proporcionado por la presente invención no incluye preferentemente un instrumento o un aparato para concentrar GLP-1, un agonista de receptor de GLP-1 o un antagonista de receptor de GLP-1 de una muestra biológica (por ejemplo, columnas (por ejemplo, columnas C18 tales como columnas Sep-Pak C18) o un aparato de ultrafiltración).

Además, el kit proporcionado por la presente invención puede ser capaz de medir la cantidad total de tanto la forma activa de GLP-1 (7-36) como la forma activa de GLP-1 (7-37) por una única operación.

4. Método de bioensayo que usa célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio

En una realización, la presente invención también proporciona un método de diagnóstico de diabetes insípida o SIADH, un método de determinación de cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar o un método de determinación del efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1, que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

(A) preparar una mezcla que contiene una célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} y una muestra biológica derivada de la sangre de un sujeto de prueba;

(B) añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (A); y

(C) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

Los materiales usados en las etapas tales como reactivos, aparatos o muestras biológicas y las condiciones para las etapas se pueden preparar o establecer apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia a la descripción de "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula".

Ejemplos de la disolución que contiene Ca^{2+} incluyen una disolución de CaCl_2 .

El orden de adición de las sustancias descritas en la etapa (A) del método se puede establecer apropiadamente por los expertos en la técnica.

Un método de medición de la cantidad de AVP en una muestra biológica, un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a AVP, un método de determinación de un riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a AVP y un método de determinación de la eficacia de tratamiento de una enfermedad asociada a AVP puede comprender las siguientes etapas:

(1) sembrar, en una placa para cultivo celular, una célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, suspendiéndose la célula en un medio sin Ca^{2+} complementado con un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio;

(2) añadir una muestra biológica derivada de un sujeto de prueba a la célula y cultivar la célula; y

(3) añadir una disolución de CaCl_2 a la célula cultivada y medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

El cultivo de la célula puede ser cultivo estéril, pero no tiene que ser estéril. Por ejemplo, cuando el tiempo de incubación de la célula está dentro de 4 horas, no se requiere cultivo estéril para dicho corto tiempo.

La luminiscencia se emite por la proteína sensible al calcio, tal como aecuatorina, inmediatamente después de la adición de la disolución de CaCl_2 y se puede medir por un método que se conoce bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se usa un luminómetro capaz de realizar automática y continuamente la agitación y medición (PerkinElmer Inc., ARVO-Sx), y se puede medir la cantidad de luminiscencia integrando los valores de luminiscencia durante 15-30 segundos después de la agitación. El aparato que se puede usar en la medición de la cantidad de luminiscencia se puede seleccionar apropiadamente por los expertos en la técnica.

La cantidad de AVP en la muestra biológica se mide basándose en la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio obtenida como resultado de llevar a cabo el método. Basándose en la cantidad medida de AVP, se diagnostica una enfermedad asociada a AVP, se determina un riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a AVP o se determina la eficacia del tratamiento de una enfermedad asociada a AVP. Por ejemplo, cuando la cantidad de luminiscencia emitida de la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de prueba que se sospecha que tiene SIADH es superior a la emitida de la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal (estándar), se puede determinar que la concentración en suero de AVP del sujeto de prueba es superior a la del individuo normal. Así, al sujeto de prueba se le diagnostica SIADH. Además, cuando la cantidad de luminiscencia emitida de la célula tratada con una muestra de sangre de un sujeto de prueba que se sospecha que tiene diabetes insípida es inferior a la emitida de la célula tratada con una muestra de sangre de un individuo normal (estándar), se puede determinar que la concentración en suero de AVP del sujeto de prueba es inferior a la del individuo normal. Así, al sujeto de prueba se le diagnostica diabetes insípida.

La composición que comprende la célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, como está comprendida en el kit proporcionado por la presente invención, es capaz de detectar AVP, un agonista de V2R o un antagonista de V2R con alta sensibilidad.

Por consiguiente, el método proporcionado por la presente invención no incluye preferentemente la etapa de concentrar AVP, un agonista de V2R o un antagonista de V2R de una muestra biológica (por ejemplo, la etapa de

uso de columnas (por ejemplo, columnas C18 tales como columnas Sep-Pak C18), la etapa de uso de un aparato de ultrafiltración o la etapa de uso de un aparato de concentración por centrifugación).

En una realización alternativa, la presente invención también proporciona un método de cribado de un antagonista de V2R, que comprende las siguientes etapas (A') a (C'):

- 5 (A') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} , un agonista de V2R expresado en la célula y un compuesto de prueba;
- (B') añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (A'); y
- (C') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

- 10 Los materiales usados en las etapas tales como reactivos o aparatos y las condiciones para las etapas se pueden preparar o establecer apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia a la descripción de "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula" y el método proporcionado por la presente invención, que comprende las etapas (A)-(C).

- 15 Basándose en la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio obtenida como resultado de llevar a cabo el método, los expertos en la técnica pueden determinar que el compuesto de prueba es o no un antagonista de V2R.

En una realización alternativa, la presente invención también proporciona un método de cribado de un antagonista de V2R, que comprende las siguientes etapas (A'') a (C''):

- 20 (A'') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene Ca^{2+} , un agonista de V2R expresado en la célula y un compuesto de prueba;
- (B'') añadir forskolina a la mezcla preparada en (A''); y
- (C'') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

- 25 Los materiales usados en las etapas tales como reactivos o aparatos y las condiciones para las etapas se pueden preparar o establecer apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia a la descripción de "2. Célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula" y el método proporcionado por la presente invención, que comprende las etapas (A)-(C).

- 30 Este método utiliza la desensibilización del canal de calcio dependiente de AMPc para detectar la actividad de un antagonista de V2R. Específicamente, cuando el compuesto de prueba es un antagonista de V2R, se inhibe la unión del agonista de V2R a V2R. En este estado, la adición de forskolina que activa la adenilato ciclasa forma AMPc, que a su vez activa el canal de calcio dependiente de AMPc (por ejemplo, CNG calcio). Así, la proteína sensible al calcio emite luminiscencia. Sin embargo, si el compuesto de prueba no es un antagonista de V2R, el agonista de V2R se une a V2R para formar AMPc antes de la adición de forskolina, de manera que se activa el canal de calcio dependiente de AMPc (por ejemplo, CNG calcio). En este estado, la posterior adición de forskolina desensibiliza el
- 35 canal de calcio dependiente de AMPc una vez activado, que ya no se activa mediante la adición de forskolina. Así, la proteína sensible al calcio no emite luminiscencia.

El método proporcionado por la presente invención, que comprende las etapas (A'') a (C''), puede ser capaz de cuantificar con exactitud la actividad inhibidora de un antagonista de V2R en un alto intervalo de concentración.

- 40 Basándose en la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio obtenida como resultado de llevar a cabo el método, los expertos en la técnica pueden determinar que el compuesto de prueba es o no un antagonista de V2R.

- 45 Puesto que el antagonista de V2R se puede utilizar como fármaco hipotensor, fármaco terapéutico para hiponatremia, fármaco terapéutico para SIADH, una composición que comprende el compuesto determinado como antagonista de V2R se puede preparar como resultado de llevar a cabo el método como agente hipotensor, agente terapéutico para hiponatremia o agente terapéutico para SIADH.

5. Método de bioensayo usando célula que expresa receptor de GLP-1, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio

- 50 En una realización, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de diabetes insípida o SIADH, un método de determinación de cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar o un método de determinación del efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1 que comprende las siguientes etapas (A) a (C):

(A) preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de prueba;

(B) añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (A); y

5 (C) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

Los materiales usados en las etapas tales como reactivos, aparatos o muestras biológicas y las condiciones para las etapas se pueden preparar o establecer apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia a la descripción de "3. Célula que expresa receptor de GLP-1, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula" y "4. Método de bioensayo usando célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio".

El orden de adición de las sustancias descritas en la etapa (A) del método se puede establecer apropiadamente por los expertos en la técnica.

Un método de medición de la cantidad de una forma activa de GLP-1 en una muestra biológica o un método de determinación de la eficacia de tratamiento de una enfermedad asociada a GLP-1 puede comprender las siguientes etapas:

(1) sembrar, en una placa para cultivo celular, una célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, suspendiéndose la célula en un medio sin Ca^{2+} complementado con un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio;

(2) añadir una muestra biológica derivada de un sujeto de prueba a la célula y cultivar la célula; y

(3) añadir una disolución de CaCl_2 a la célula cultivada y medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

El cultivo de la etapa (2) puede ser cultivo estéril, pero no tiene que ser estéril. Por ejemplo, cuando el tiempo de incubación de la etapa (2) está dentro de 4 horas, no se requiere cultivo estéril para dicho corto tiempo.

En la etapa (3), la luminiscencia se emite por la proteína sensible al calcio, tal como aecurina, inmediatamente después de la adición de la disolución de CaCl_2 y se puede medir por un método que se conoce bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se usa un luminómetro capaz de realizar automática y continuamente la agitación y medición (PerkinElmer Inc., ARVO-Sx), y se puede medir la cantidad de luminiscencia integrando los valores de luminiscencia durante 15-30 segundos después de la agitación. El aparato que se puede usar en la medición de la cantidad de luminiscencia se puede seleccionar apropiadamente por los expertos en la técnica.

El kit que comprende la célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, proporcionado por la presente invención, es capaz de detectar GLP-1, un agonista de receptor de GLP-1 o un antagonista de receptor de GLP-1 con alta sensibilidad.

Por consiguiente, el método proporcionado por la presente invención no incluye preferentemente la etapa de concentrar GLP-1, un agonista de receptor de GLP-1 o un antagonista de receptor de GLP-1 de una muestra biológica (por ejemplo, la etapa de uso de columnas (por ejemplo, columnas C18 tales como columnas Sep-Pak C18), la etapa de uso de un aparato de ultrafiltración o la etapa de uso de un aparato de concentración por centrifugación).

Además, la presente invención proporciona un método de cribado de un antagonista de receptor de GLP-1, que comprende las siguientes etapas (A') a (C'):

(A') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin calcio, un agonista de receptor de GLP-1 expresado en la célula y un compuesto de prueba;

(B') añadir una disolución de calcio que contiene a la mezcla preparada en (A'); y

(C') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

Los materiales usados en las etapas tales como reactivos o aparatos y las condiciones para las etapas se pueden preparar o establecer apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia a la descripción de "3. Célula que expresa receptor de GLP-1, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula", "4. Método de bioensayo usando célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio" y el método proporcionado por la presente invención, que comprende las etapas (A)-(C).

Basándose en la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio obtenida como resultado de llevar a cabo el método, los expertos en la técnica pueden determinar que el compuesto de prueba es o no un antagonista de receptor de GLP-1.

5 En una realización, un método de cribado de un antagonista de receptor de GLP-1, que comprende las siguientes etapas (A") a (C"):

(A") preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un receptor de GLP-1, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene Ca^{2+} , un agonista de receptor de GLP-1 expresado en la célula y un compuesto de prueba;

10 (B") añadir forskolina a la mezcla preparada en (A"); y

(C") medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

15 Los materiales usados en las etapas tales como reactivos o aparatos y las condiciones para las etapas se pueden preparar o establecer apropiadamente por los expertos en la técnica con referencia a la descripción de "3. Célula que expresa receptor de GLP-1, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio, y composición y kit que comprende la célula", "4. Método de bioensayo usando célula que expresa V2R, canal de calcio dependiente de AMPc y proteína sensible al calcio" y el método proporcionado por la presente invención, que comprende las etapas (A)-(C).

20 Basándose en la cantidad de luminiscencia de la proteína sensible al calcio obtenida como resultado de llevar a cabo el método, los expertos en la técnica pueden determinar que el compuesto de prueba es o no un antagonista de receptor de GLP-1.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los ejemplos. Los ejemplos que no se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

Ejemplos

A. Experimento en célula que expresa V2R

25 1. Detalles del método para la construcción de célula congelada

Se amplificó la secuencia de ADNc de V2R humano (Genbank N° NM_001146151.1) (SEQ ID N°: 5) por el método de PCR de una biblioteca de ADNc derivado de humano y se clonó en pUC18. El ADNc de la isoforma 2 del receptor de vasopresina humana (V2R) clonado en pUC18 se reclonó en un vector pEF2 para preparar pEFhV2R.

30 Se amplificó la secuencia de ADNc de un canal de calcio dependiente de nucleótido cíclico (Genbank N° BC048775) (SEQ ID N°: 4) por el método de PCR a partir de una biblioteca de ADNc derivado de células epiteliales olfativas de ratón (1994 pb) y se clonó en un vector de expresión (pCMVSPORT, Invitrogen Corp.) para preparar pmCNG α 2 (Figura 18). Además, para potenciar la selectividad de AMPc y la sensibilidad al mismo, se preparó una construcción pmCNG α 2MW que expresa un canal de calcio dependiente de nucleótido cíclico modificado (SEQ ID N°: 6) en el que la 460^a cisteína (C) se sustituye con triptófano (W) y el 583^o ácido glutámico (E) se sustituye con metionina (M) por el método de PCR de mutación puntual. Además, se trató una secuencia de ADNc de apoaeuorina sintética (676 pb) (SEQ ID N°: 7) que se optimizó para uso de codones humanos por el método de extensión de ADN de oligonucleótidos, y que tiene una señal de direccionamiento mitocondrial, con las enzimas de restricción KpnI y NheI y se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.) tratado con KpnI y NheI para preparar un vector de expresión de aeucorina pcDNA mt sAEQ (Figura 13).

40 Se sembraron células CHO a una densidad celular de $1,0 \times 10^5$ células/ml en una placa de Petri de 10 cm². Al día siguiente, las células se transfectaron con 1 μ g de V2R de pEF2, 2 μ g de pmCNG α 2MW y 2 μ g de pcDNA mt sAEQ por placa de Petri usando FuGENE6 (TM) (Roche Applied Science). Al día siguiente, las células se disociaron de la placa de Petri mediante la adición de 400 μ l de una disolución de Versene (EDTA) a la placa de Petri y se suspendieron en un medio de DMEM/F12 que contenía 10 ml de 5 % de FCS. La suspensión obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Entonces, el sedimento se disolvió a una densidad de $2-5 \times 10^6$ células/ml en 1 ml de CELLBANKER y se almacenó a -80 °C.

2. Curva dependiente de la concentración y sensibilidad de detección más baja de AVP obtenida usando célula congelada

50 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado (medio independiente de CO₂ sin calcio, Invitrogen Corp.). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo (5 % de PEG6000, medio independiente de CO₂ sin calcio) al precipitado obtenido, y se añadieron 6 μ l de ViviRen 4 mM (Promega Corp.) al mismo. La mezcla se sembró a 50 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió adicionalmente a la misma (n = 3) a 50 μ l/pocillo AVP diluida en serie con un tampón de muestra, y las células se cultivaron a

temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 3 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro (PerkinElmer Inc., ARVO-Sx; en lo sucesivo, se usó el mismo modelo en los ejemplos). Se muestra en la Figura 1 una curva dependiente de la concentración de AVP.

- 5 Como se muestra en la Figura 2 (vista ampliada del intervalo de baja concentración), la cantidad detectable mínima para AVP fue 0,63 pg/ml, de manera que el valor detectado fue capaz de ser significativamente discriminado del valor que se calcula por el valor del blanco + 3 DE. Además, puesto que la aequorina realiza reacción luminiscente, se obtuvo por este método una alta relación entre señal y blanco (relación S/N) (es decir, a 80 pg/ml de AVP, relación S/N de aproximadamente 56 veces (3194263/56805)).

4. Estudio del tiempo de incubación después de la adición de sustrato (ViviRen) para la luminiscencia de aequorina

- 10 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 12 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo AVP diluida en serie con un tampón de cultivo. Después de 1, 2, 3, 4 o 5 h, se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 3 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro. Se demostró que la cantidad de luminiscencia alcanzó una meseta 4 h después de la adición de ViviRen (véase la Figura 3).

5. Estudio de la cantidad de plásmido de receptor usada en la transfección

- 20 Se sembraron 10 ml de células CHO que tienen una densidad de 1×10^5 células/ml en una placa de Petri de 10 cm² y se cultivaron durante 1 d. Entonces, se mezclaron 3 µg de pcDNA mt sAEQ, 1 µg de pmCNGα2MW y 0 a 1 µg de plásmido de V2R de pEF2 y se mezclaron adicionalmente con 600 µl de DMEM/F12 y 18 µl de FuGENE6 (Roche Applied Science), y se realizó la transfección. Después del cultivo adicional durante la noche, el medio se retiró, y las células se lavaron con 10 ml de PBS. Entonces, se añadió a las mismas 800 µl de Versene, y las células se cultivaron a 37 °C durante 5 min y luego se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, el precipitado se disolvió en 12 ml de un cultivo tampón, y se añadió al mismo 6,5 µl de ViviRen 4 mM. La suspensión de células se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos complementada con 50 µl/pocillo de una serie de concentración de AVP. Después del cultivo a temperatura ambiente durante 3 h, se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 3 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

- 30 Se demostró que se requirió el plásmido de receptor en una cantidad de 1 µg/placa en la transfección para obtener la cantidad óptima de luminiscencia (véase la Figura 4).

6. Optimización de la densidad celular

- 35 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de muestra. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido. Se preparó una serie de células cuya densidad celular se ajustó a las densidades $1,0 \times 10^5$ células/ml a 2×10^6 células/ml. Las células se suspendieron mediante la adición de 6 µl de ViviRen 4 mM. La suspensión de células se sembró en una placa de 96 pocillos complementada con 50 µl/pocillo de AVP diluida en serie con un tampón de cultivo. Después del cultivo durante 3 h, se añadió a la misma disolución 3 mM de CaCl₂ a 100 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

- 40 Como se muestra en las Figuras 5 y 6, la cantidad de luminiscencia aumentó en un modo dependiente de la densidad celular.

7. Estudio de la concentración de disolución de detección de CaCl₂ añadida

- 45 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo AVP diluida en serie con un tampón de cultivo, y las células se cultivaron durante 3 h. Entonces, se añadió a la misma a 100 µl/pocillo una disolución de detección de CaCl₂ (concentraciones finales: 0 a 30 mM), y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

- 50 Se demostró que las concentraciones óptimas de CaCl₂ fueron 30 mM a las que se obtuvieron un bajo valor en el fondo (0) y la alta cantidad de luminiscencia en la muestra (véase la Figura 7).

8. Estudio de la linealidad de la dilución usando disolución de AVP

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La

mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 h con una disolución de AVP diluida 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32 veces con un tampón de muestra.

Después del cultivo durante 3 horas, se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 3 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

5 Como se muestra en la Figura 8, se confirmó que la cantidad de luminiscencia aumentó con la linealidad.

11. Comparación de sensibilidad con el kit existente que usa disolución de AVP

10 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 h con una disolución de AVP diluida 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32 veces con un tampón de muestra.

15 También se muestran valores por separado medidos usando el kit existente Mitsubishi Chemical Medience AVP-RIA. Los valores obtenidos usando el kit de RIA se indican por una tasa de inhibición competitiva (% de B/B0) contra AVP radiomarcada. Así, para la comparación, se muestran valores calculados según la ecuación $100 - (\text{cantidad de luminiscencia a cada concentración} / \text{la máxima cantidad de luminiscencia}) \times 100$. Se confirmó que el kit de la presente invención mantenía la linealidad incluso a una dosis de 20 pg/ml o superior y tenía excelente sensibilidad, en comparación con el kit de RIA existente (véase la Figura 9).

12. Estudio usando muestra clínica humana

20 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se usaron una serie de dilución de AVP que sirvió de disolución patrón, plasma individual normal y plasma con un alto nivel de AVP preparado mediante la adición de AVP. Se diluyeron 80 µl de una muestra mediante la adición de 320 µl de un tampón de cultivo y se añadieron a la placa a 50 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 3 h. Se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 3 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

13. Estudio del cambio dependiente del tiempo en la luminiscencia usando el kit que usa célula congelada

30 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo AVP diluida en serie con un tampón de cultivo, y las células se cultivaron durante 3 h. Se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 3 mM de CaCl₂ y se agitó durante 3 s. Entonces, se midió la cantidad de luminiscencia con el tiempo durante 12 s usando un luminómetro. Como resultado, como se muestra en la Figura 11, se observó luminiscencia relativamente estable tan pronto como se añadió la disolución de CaCl₂.

14. Estudio de la detección de AVP y antagonista de V2R por desensibilización

40 Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. La suspensión se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron a la misma AVP diluida en serie con un tampón de cultivo que contenía calcio, y OPC-41061 a 50 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 3 h. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo AVP 10^{-7} M, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro (Figuras 14 y 15). El antagonista de la vasopresina OPC-41061 inhibió la acción de AVP añadida en un modo dependiente de la concentración (Figura 14). Además, cuando se hicieron reaccionar AVP y las células en un medio que contenía calcio, la re-adición de AVP no causó la luminiscencia debido a la reacción que una vez ocurrió en presencia de una alta concentración de AVP. La desensibilización disminuyó la cantidad de luminiscencia en un modo dependiente de la concentración de AVP añadida (Figura 15). Se demostró que AVP también se puede cuantificar por desensibilización. Posteriormente, se añadió adicionalmente forskolina 10^{-4} M a la misma a 50 µl/pocillo, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro (Figura 16). Solo cuando el antagonista de la vasopresina inhibió la acción de AVP añadida, se detectó la luminiscencia de forskolina en un modo dependiente de la concentración. Así, se demostró que se puede detectar por desensibilización un antagonista de la vasopresina.

B. Experimento en célula que expresa receptor de GLP-1

1. Detalles del método de construcción de célula congelada

Se amplificó la secuencia de ADNc del receptor de GLP-1 humano (Genbank N° BC113493) (SEQ ID N°: 9) por el método de PCR de una biblioteca de ADNc derivado de humano y se clonó en pUC18. El ADNc de receptor de GLP-1 humano (GLP-1R) clonado en pUC18 se reclonó en un vector pCIneo para preparar pCIneoGLP-1R.

Se amplificó la secuencia de ADNc de un canal de calcio dependiente de nucleótido cíclico (Genbank N° BC048775) por el método de PCR a partir de una biblioteca de ADNc derivado de células epiteliales olfativas de ratón (1994 pb) y se clonó en un vector de expresión (pCMVSPORT, Invitrogen Corp.) para preparar pmCNGα2. Además, para potenciar la selectividad de AMPc y la sensibilidad al mismo, se preparó una construcción pmCNGα2MW que expresa un canal de calcio dependiente de nucleótido cíclico modificado en el que la 460^a cisteína (C) se sustituye con triptófano (W) y el 583^o ácido glutámico (E) se sustituye con metionina (M) por el punto-mutación método de PCR. Además, se trató una secuencia de ADNc de apoaeuorina sintética (676 pb) que se optimizó para uso de codones humanos por el método de extensión de ADN de oligonucleótidos, y que tiene una señal de direccionamiento mitocondrial, con enzimas de restricción KpnI y NheI y se clonó en pcDNA3.1 (Invitrogen Corp.) tratado con KpnI y NheI para preparar un vector de expresión de aeucorina pcDNA mt sAEQ.

Se sembraron líneas celulares CHO a una densidad celular de $1,0 \times 10^5$ células/ml en una placa de Petri de 10 cm². Al día siguiente, las células se transfectaron con 0,1 µg de pCIneoGLP-1R, 1 µg de pmCNGα2MW y 4 µg de pcDNA mt sAEQ por placa de Petri usando FuGENE6 (TM) (Roche Applied Science). Al día siguiente, las células se disociaron de la placa de Petri mediante la adición de 400 µl de una disolución de Versene (EDTA) a la placa de Petri y se suspendieron en un medio de DMEM/F12 que contenía 10 ml de 5 % de FCS. La suspensión obtenida se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Entonces, el sedimento se disolvió a una densidad de $2-5 \times 10^6$ células/ml en 1 ml de CELLBANKER y se almacenó a -80 °C.

2. Curva dependiente de la concentración y sensibilidad de detección más baja de GLP-1 obtenida usando célula congelada

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado (medio independiente de CO₂ sin calcio, Invitrogen Corp.). Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo (5 % de PEG6000, medio independiente de CO₂ sin calcio) al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de 4 mM ViviRen (Promega Corp.) al mismo. La mezcla se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió adicionalmente a la misma (n = 3) a 10 µl/pocillo la forma activa de GLP-1 (7-36 amida) diluida en serie con un tampón de muestra, y las células se cultivaron a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo disolución 100 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro (PerkinElmer Inc., ARVO-Sx; en lo sucesivo, se usó el mismo modelo en los ejemplos). Se muestra en la Figura 17 una curva dependiente de la concentración de la forma activa de GLP-1.

La cantidad detectable mínima para la forma activa de GLP-1 fue 0,078 pg/ml de manera que el valor detectado fue capaz de ser significativamente discriminado del valor que se calcula por el valor del blanco + 3 DE. Además, puesto que la aeucorina realiza reacción luminiscente, se obtuvo por este método una alta relación entre señal y blanco (relación S/N) (es decir, a 33 pg/ml de forma activa de GLP-1, relación S/N de aproximadamente 9,3 veces (902623 / 96686)).

3. Estudio del tiempo de incubación después de la adición de sustrato (ViviRen) para la luminiscencia de aeucorina

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 12 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió a la misma a 10 µl/pocillo la forma activa de GLP-1 diluida en serie con un tampón de cultivo. Después de 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 7 h, se añadió a la misma a 50 µl/pocillo la disolución 100 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro. Se demostró que la cantidad de luminiscencia alcanzó una meseta 3 h después de la adición de ViviRen (véase la Figura 18).

4. Estudio de la cantidad de plásmido de receptor usada en la transfección

Se sembraron 10 ml de células CHO que tienen una densidad de $0,7 \times 10^5$ células/ml en una placa de Petri de 10 cm² y se cultivaron durante 1 d. Entonces, se mezclaron 4 µg de pcDNA mt sAEQ, 1 µg de pmCNGα2MW y 0 a 1 µg de plásmido de receptor de pCIneoGLP-1 y se mezclaron adicionalmente con 600 µl de DMEM/F12 y 18 µl de FuGENE6 (Roche Applied Science), y se realizó la transfección. Después del cultivo adicional durante la noche, el medio se retiró, y las células se lavaron con 10 ml de PBS. Entonces, se añadió a las mismas 800 µl de Versene, y las células se cultivaron a 37 °C durante 5 min y entonces se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, el precipitado se disolvió en 12 ml de un cultivo tampón, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La suspensión de células se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96

pocillos complementada con 10 µl/pocillo de una serie de concentración de GLP-1. Después del cultivo a temperatura ambiente durante 3 h, se añadió a la misma a 50 µl/pocillo disolución 100 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

Se demostró que el plásmido de receptor se requirió en una cantidad de 0,1 µg/placa en transfección para obtener la cantidad óptima de luminiscencia (véase la Figura 19).

5. Optimización de la densidad celular

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de muestra. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 10 ml de un tampón de muestra al precipitado obtenido. Se preparó una serie de células cuya densidad celular se ajustó a las densidades $1,25 \times 10^5$ células/ml a 1×10^6 células/ml. Las células se suspendieron mediante la adición de 6 µl de 4 mM ViviRen. La suspensión de células se sembró en una placa de 96 pocillos complementada con 50 µl/pocillo de GLP-1 diluido en serie con un tampón de cultivo. Después del cultivo durante 3 h, se añadió a la misma a 100 µl/pocillo disolución 100 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

Como se muestra en las Figuras 20 y 21, la cantidad de luminiscencia aumentó en un modo dependiente de la densidad celular.

6. Estudio de la linealidad de la dilución usando disolución de GLP-1

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 h con una disolución de GLP-1 diluido 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32 veces con un tampón de muestra.

Después del cultivo durante 3 h, se añadió a la misma a 50 µl/pocillo disolución 100 mM de CaCl₂, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 22, se confirmó que la cantidad de luminiscencia aumentó con la linealidad.

7. Comparación de sensibilidad con el kit existente que usa disolución de GLP-1

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 4 h con una disolución de AVP diluida 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 o 1/32 veces con un tampón de muestra.

También se muestran valores por separado medidos usando el kit existente Millipore GLP-1 (Active)-ELISA (EGLP-35K). El kit de ELISA mide la intensidad de fluorescencia mientras que el kit de la presente invención mide la intensidad de quimioluminiscencia. Así, para la comparación, se muestra un valor relativo (%) con respecto a la máxima cantidad de luz (fluorescencia o luminiscencia) emitida de cada muestra. Se confirmó que el kit de la presente invención mantenía la linealidad incluso a una dosis de 1 pg/ml o inferior y tenía excelente sensibilidad, en comparación con el kit de ELISA existente (véase la Figura 23). La sensibilidad de detección más baja fue 3,73 pg/ml para el kit de ELISA existente y 0,078 pg/ml para el kit de la presente invención.

Además, se demostró que el kit proporcionado por la presente invención puede medir la forma activa de GLP-1 en un intervalo de concentración más amplio que el del kit de ELISA existente (véase la Figura 23).

8. Estudio de la especificidad del kit usando péptido de tipo GLP-1

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 h con una disolución de péptido de tipo GLP-1 diluida 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 o 1/10⁵ veces con un tampón de muestra. La sensibilidad de la medición del péptido de tipo GLP-1 del kit de la presente invención se indica por el valor de CE50 (pM) de cada péptido (véase la Figura 24). El kit presentó reactividad por el precursor GLP-1 (1-37), oxintomodulina y glucagón, que son agonistas débiles contra el receptor de GLP-1, a una concentración 10000 veces superior en comparación con las formas activas (GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36 amida)) de GLP-1. Además, el kit reaccionó difícilmente con GLP-1 (9-36 amida), que se forma por la degradación *in vivo* de la forma activa de GLP-1, o GIP o GLP-2, que es incretina que actúa sobre otros receptores, incluso a una concentración 1 millón de veces superior en comparación con las formas activas de GLP-1. Se demostró que el kit de la presente invención es capaz de ensayar las formas activas de GLP-1, es decir, GLP-1 (7-36 amida) y GLP-1 (7-37), con sensibilidad y especificidad extremadamente altas.

9. Ensayo de la forma activa de GLP-1 en plasma humano

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. Después de la centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 50 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se usaron muestras que contenían GLP-1 preparadas añadiendo la forma activa de GLP-1 (7-36 amida) a una concentración final de 16,5 pg/ml (5 pM) a plasma individual normal o una disolución de tampón. Se añadió inhibidor de DPP-IV de Millipore (DPP44-010) a una concentración de 20 µl por ml de plasma con el fin de inhibir la actividad de la peptidasa DPP-IV en plasma. La mezcla se añadió a la placa a 10 µl/pocillo, y las células se cultivaron durante 4 h. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo disolución 100 mM de CaCl_2 , y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro. Los resultados se muestran en la Figura 25.

La actividad de GLP-1 desapareció con el tiempo en el plasma humano en comparación con la disolución de tampón, y la desaparición se inhibió por el inhibidor de DPP-IV. Se pudo monitorizar la degradación de GLP-1 por la actividad de la enzima DPP-IV usando el kit de la presente invención.

10. Detección de agonista de GLP-1 y antagonista de GLP-1

Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. La suspensión se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió a la misma exenatida diluida en serie con un tampón de cultivo que contenía calcio, y las células se cultivaron durante 3 h. Se añadió a la misma a 50 µl/pocillo disolución 100 mM de CaCl_2 , y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro (Figura 26). La exenatida es un péptido de tipo GLP-1 contenido en la glándula salival del lagarto el monstruo de Gila y tiene una larga semivida debido a su resistencia a DPP-IV. La exenatida ya ha sido lanzada como un fármaco terapéutico para la diabetes mellitus de tipo 2. Se demostró que el kit de la presente invención puede ensayar no solo GLP-1 natural, sino también un análogo que tiene actividad agonista de receptor de GLP-1 con alta sensibilidad.

A continuación, se midió la actividad de un antagonista de GLP-1. Se descongeló en un baño caliente 1 ml (3×10^6 células/ml) de las células congeladas preparadas en 1 y se suspendieron en 10 ml de un tampón de lavado. La suspensión se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Se añadieron 12 ml de un tampón de cultivo al precipitado obtenido, y se añadieron 6 µl de ViviRen 4 mM al mismo. La mezcla se sembró a 90 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos.

Se añadió a la misma a 10 µl/pocillo exendina-4 (9-39), y las células se cultivaron durante 3 h. se añadió a la misma a 10 µl/pocillo GLP-1 10^{-11} M, y se midió la cantidad de luminiscencia usando un luminómetro. El antagonista de GLP-1 exendina-4 (9-39) inhibió la acción agonista de GLP-1 añadido en un modo dependiente de la concentración (Figura 27).

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar un método y un kit para diagnosticar diabetes insípida o SIADH, para determinar cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar y para determinar el efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Un método de bioensayo para la detección de una sustancia fisiológicamente activa

<130> 670631

<150> JP 2010-288305

<151> 24-12-2010

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 309

5

<212> PRT

<213> Humana

<400> 1

```

Met Leu Met Ala Ser Thr Thr Ser Ala Val Pro Gly His Pro Ser Leu
1          5          10          15

Pro Ser Leu Pro Ser Asn Ser Ser Gln Glu Arg Pro Leu Asp Thr Arg
          20          25          30

Asp Pro Leu Leu Ala Arg Ala Glu Leu Ala Leu Leu Ser Ile Val Phe
          35          40          45

Val Ala Val Ala Leu Ser Asn Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu Ala Arg
          50          55          60

Arg Gly Arg Arg Gly His Trp Ala Pro Ile His Val Phe Ile Gly His
65          70          75          80

Leu Cys Leu Ala Asp Leu Ala Val Ala Leu Phe Gln Val Leu Pro Gln
          85          90          95

Leu Ala Trp Lys Ala Thr Asp Arg Phe Arg Gly Pro Asp Ala Leu Cys
          100          105          110

Arg Ala Val Lys Tyr Leu Gln Met Val Gly Met Tyr Ala Ser Ser Tyr
          115          120          125

Met Ile Leu Ala Met Thr Leu Asp Arg His Arg Ala Ile Cys Arg Pro
          130          135          140

Met Leu Ala Tyr Arg His Gly Ser Gly Ala His Trp Asn Arg Pro Val
145          150          155          160

```

10

ES 2 687 050 T3

Leu Val Ala Trp Ala Phe Ser Leu Leu Leu Ser Leu Pro Gln Leu Phe
 165 170 175
 Ile Phe Ala Gln Arg Asn Val Glu Gly Gly Ser Gly Val Thr Asp Cys
 180 185 190
 Trp Ala Cys Phe Ala Glu Pro Trp Gly Arg Arg Thr Tyr Val Thr Trp
 195 200 205
 Ile Ala Leu Met Val Phe Val Ala Pro Thr Leu Gly Ile Ala Ala Cys
 210 215 220
 Gln Val Leu Ile Phe Arg Glu Ile His Ala Ser Leu Val Pro Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Glu Arg Pro Gly Gly Arg Arg Arg Gly Arg Arg Thr Gly Ser Pro
 245 250 255
 Gly Glu Gly Ala His Val Ser Ala Ala Val Ala Lys Thr Val Arg Met
 260 265 270
 Thr Leu Val Ile Val Val Val Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Phe
 275 280 285
 Leu Val Gln Leu Trp Ala Ala Trp Asp Pro Glu Ala Pro Leu Glu Gly
 290 295 300
 Gly Cys Ser Arg Gly
 305

<210> 2

<211> 664

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CNG alfa2 modificado

10

<400> 2

ES 2 687 050 T3

Met	Met	Thr	Glu	Lys	Ser	Asn	Gly	Val	Lys	Ser	Ser	Pro	Ala	Asn	Asn
1				5					10					15	
His	Asn	His	His	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Lys	Ala	Asn	Gly	Lys	Asp	Asp
			20					25					30		
His	Arg	Ala	Gly	Ser	Arg	Pro	Gln	Ser	Val	Ala	Ala	Asp	Asp	Asp	Thr
		35					40					45			
Ser	Ser	Glu	Leu	Gln	Arg	Leu	Ala	Glu	Met	Asp	Thr	Pro	Arg	Arg	Gly
	50					55					60				

ES 2 687 050 T3

Arg Gly Gly Phe Arg Arg Ile Val Arg Leu Val Gly Ile Ile Arg Asp
 65 70 75 80
 Trp Ala Asn Lys Asn Phe Arg Glu Glu Glu Pro Arg Pro Asp Ser Phe
 85 90 95
 Leu Glu Arg Phe Arg Gly Pro Glu Leu Gln Thr Val Thr Thr His Gln
 100 105 110
 Gly Asp Gly Lys Gly Asp Lys Asp Gly Glu Gly Lys Gly Thr Lys Lys
 115 120 125
 Lys Phe Glu Leu Phe Val Leu Asp Pro Ala Gly Asp Trp Tyr Tyr Arg
 130 135 140
 Trp Leu Phe Val Ile Ala Met Pro Val Leu Tyr Asn Trp Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Arg Ala Cys Phe Ser Asp Leu Gln Arg Asn Tyr Phe Val Val
 165 170 175
 Trp Leu Val Leu Asp Tyr Phe Ser Asp Thr Val Tyr Ile Ala Asp Leu
 180 185 190
 Ile Ile Arg Leu Arg Thr Gly Phe Leu Glu Gln Gly Leu Leu Val Lys
 195 200 205
 Asp Pro Lys Lys Leu Arg Asp Asn Tyr Ile His Thr Leu Gln Phe Lys
 210 215 220
 Leu Asp Val Ala Ser Ile Ile Pro Thr Asp Leu Ile Tyr Phe Ala Val
 225 230 235 240
 Gly Ile His Ser Pro Glu Val Arg Phe Asn Arg Leu Leu His Phe Ala
 245 250 255
 Arg Met Phe Glu Phe Phe Asp Arg Thr Glu Thr Arg Thr Ser Tyr Pro
 260 265 270
 Asn Ile Phe Arg Ile Ser Asn Leu Val Leu Tyr Ile Leu Val Ile Ile
 275 280 285
 His Trp Asn Ala Cys Ile Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Ser Ile Gly Phe
 290 295 300
 Gly Val Asp Thr Trp Val Tyr Pro Asn Ile Thr Asp Pro Glu Tyr Gly

ES 2 687 050 T3

305		310		315		320									
Tyr	Leu	Ala	Arg	Glu	Tyr	Ile	Tyr	Cys	Leu	Tyr	Trp	Ser	Thr	Leu	Thr
				325					330					335	
Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Glu	Thr	Pro	Pro	Pro	Val	Lys	Asp	Glu	Glu	Tyr
				340				345					350		
Leu	Phe	Val	Ile	Phe	Asp	Phe	Leu	Ile	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Ala	Thr
		355					360					365			
Ile	Val	Gly	Asn	Val	Gly	Ser	Met	Ile	Ser	Asn	Met	Asn	Ala	Thr	Arg
	370					375					380				
Ala	Glu	Phe	Gln	Ala	Lys	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	Tyr	Met	Gln	Phe
385					390					395				400	
Arg	Lys	Val	Ser	Lys	Asp	Met	Glu	Ala	Lys	Val	Ile	Lys	Trp	Phe	Asp
				405					410					415	
Tyr	Leu	Trp	Thr	Asn	Lys	Lys	Thr	Val	Asp	Glu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys
			420					425					430		
Asn	Leu	Pro	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Ala	Ile	Asn	Val	His	Leu
		435					440					445			
Ser	Thr	Leu	Lys	Lys	Val	Arg	Ile	Phe	Gln	Asp	Trp	Glu	Ala	Gly	Leu
	450					455					460				
Leu	Val	Glu	Leu	Val	Leu	Lys	Leu	Arg	Pro	Gln	Val	Phe	Ser	Pro	Gly
465					470					475					480
Asp	Tyr	Ile	Cys	Arg	Lys	Gly	Asp	Ile	Gly	Lys	Glu	Met	Tyr	Ile	Ile
				485					490					495	
Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Ala	Val	Val	Ala	Asp	Asp	Gly	Val	Thr	Gln	Tyr
			500					505					510		
Ala	Leu	Leu	Ser	Ala	Gly	Ser	Cys	Phe	Gly	Glu	Ile	Ser	Ile	Leu	Asn
		515					520					525			
Ile	Lys	Gly	Ser	Lys	Met	Gly	Asn	Arg	Arg	Thr	Ala	Asn	Ile	Arg	Ser
	530					535					540				
Leu	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Phe	Cys	Leu	Ser	Lys	Asp	Asp	Leu	Met	Glu
545					550					555				560	

ES 2 687 050 T3

Ala Val Thr Glu Tyr Pro Asp Ala Lys Lys Val Leu Glu Glu Arg Gly
565 570 575

Arg Glu Ile Leu Met Lys Met Gly Leu Leu Asp Glu Asn Glu Val Ala
580 585 590

Ala Ser Met Glu Val Asp Val Gln Glu Lys Leu Glu Gln Leu Glu Thr
595 600 605

Asn Met Glu Thr Leu Tyr Thr Arg Phe Ala Arg Leu Leu Ala Glu Tyr
610 615 620

Thr Gly Ala Gln Gln Lys Leu Lys Gln Arg Ile Thr Val Leu Glu Thr
625 630 635 640

Lys Met Lys Gln Asn His Glu Asp Asp Tyr Leu Ser Asp Gly Ile Asn
645 650 655

Thr Pro Glu Pro Ala Val Ala Glu
660

<210> 3

<211> 228

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> aecuorina modificada

10 <400> 3

Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala
1 5 10 15

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu Pro Pro Glu
20 25 30

Gly Lys Leu Gly Ile Met Lys Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn
35 40 45

Pro Lys Trp Ile Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val
50 55 60

Asn His Asn Gly Arg Ile Ser Leu Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser
65 70 75 80

Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu Gln Ala Lys Arg
85 90 95

His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr

ES 2 687 050 T3

	100		105		110
Gly Val	Glu Thr Glu Trp Pro Glu Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Arg Leu				
	115		120		125
Ala Thr	Glu Glu Leu Glu Arg Tyr Ser Lys Asn Gln Ile Thr Leu Ile				
	130		135		140
Arg Leu	Trp Gly Asp Ala Leu Phe Asp Ile Ile Asp Lys Asp Gln Asn				
	145		150		155
Gly Ala	Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr Lys Ser Ala Gly				
	165		170		175
Ile Ile	Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp				
	180		185		190
Ile Asp	Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His				
	195		200		205
Leu Gly	Phe Trp Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly				
	210		215		220
Gly Ala	Val Pro				
	225				

<210> 4

<211> 1995

5

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 4

atgatgaccg	aaaaatccaa	cggtgtgaag	agctctccag	ctaataacca	taaccatcat	60
cctcctcctt	ctatcaaggc	caatggcaaa	gatgaccaca	gggcaggtag	cagaccacag	120
tctgtggcag	ctgatgatga	cacttcctca	gaactgcaaa	ggttggcaga	gatggatact	180
ccacgcaggg	gaaggggtgg	cttccgaagg	attgtccgcc	tgggtgggat	catcagagac	240
tgggccaaca	aaaatttccg	tgaggaggaa	ccaagacctg	actccttcct	agagcgtttc	300
cgtgggcctg	agctccagac	tgtgacaacc	catcaggggg	atggcaaagg	cgacaaggac	360
ggcgagggaa	agggcaccaa	aaagaaattt	gaactgtttg	ttttggaccc	agctggagac	420
tggattacc	gttggttggt	tgtcattgcc	atgcctgttc	tttacaactg	gtgtctgttg	480
gtagccagag	cctgcttcag	tgatctacag	agaaactatt	ttgtggtatg	gctgggtgctg	540
gattacttct	cagacactgt	ttatattgca	gacctcatca	ttcggctgcg	cacaggcttc	600
ctagaacaag	ggctcctggt	caaagacccc	aagaaattgc	gagacaacta	tatccacact	660

10

ES 2 687 050 T3

ttgcagttca aattggatgt ggctttatc atccccactg acctcattta ttttgctgtg 720
 ggtatccaca gccctgaggt acgttttaac cgtctgttac actttgccg tatgtttgag 780
 ttctttgacc gcaactgagac acgtacaagc taccccaaca tcttccgaat cagcaacctg 840
 gtcctctaca tcttggatcat catccactgg aatgcttgta tttactatgc tatctctaag 900
 tccattggct ttgggggtga cacctgggtt taccccaaca ttactgacct tgaatatggc 960
 tacctggcta gggagtacat ttactgocct tactgggtcca cactgacct caccaccatt 1020
 ggagagacac caccctgt aaaggatgag gagtacctat ttgtcatctt tgacttcctg 1080
 attggtgtcc tcatctttgc cactattgtg ggaaatgtgg gctccatgat ctccaacatg 1140
 aatgccacac gagcagagtt ccaggccaag attgatgctg tcaaacta catgcagttc 1200
 cgaaaggta gtaaagacat ggaagccaag gtcataaat ggtttgacta cttgtggacc 1260
 aataagaaga cagtagatga acgagaagtc cttaaagaacc tgctgcaaa gcttagggca 1320
 gagatagcca ttaatgttca tttgtccact ctgaagaaag tgcgcatatt ccaggattgt 1380
 gaagctggcc tgctgggtga actgggtactg aagcttcgtc ctgaggtctt tagtcctgga 1440
 gattatattt gccgtaaggg ggacattggc aaggaaatgt acatcatcaa ggagggcaaa 1500
 ttggcagtg tagctgatga tgggtgtgact cagtatgcct tgctgtcagc tgggagctgc 1560
 tttggtgaga ttagtatcct taacattaag ggtagcaaaa tgggcaatcg gcgcaactgc 1620
 aatatccgta gtctgggcta ctgagatctc ttctgcttgt ccaaggatga tcttatggaa 1680
 gctgtgactg agtatcctga tgccaagaaa gtcctggaag aacggggtag ggagatcctg 1740
 atgaaggaag gtctactgga tgagaatgaa gtggcagcta gtatggaggt agatgttcag 1800
 gagaagctgg agcagctgga gacaaacatg gagacctgt acactcgttt tgcccgctg 1860
 ctggctgagt acactggagc ccagcagaag ctcaaacagc gcatcacagt gctggagacc 1920
 aagatgaaac agaaccatga ggatgattac ctatcagatg ggataaacac ccctgagcca 1980
 gctgttgctg aatag 1995

<210> 5

<211> 1740

5

<212> ADN

<213> Humana

<400> 5

cttgctcctc aggcagaggc tgagtccgca catcacctcc aggcctcag aacacctgcc 60
 ccagccccac catgctcatg gcgtccacca ctccgctgt gcctgggcat ccctctctgc 120
 ccagcctgcc cagcaacagc agccaggaga ggccactgga caccgggac ccgctgctag 180
 cccggggcga gctggcgctg ctctccatag tctttgtggc tgtggccctg agcaatggcc 240
 tgggtgctggc ggccctagct cggcgggggc ggcggggcca ctgggcaccc atacacgtct 300

10

ES 2 687 050 T3

```

tcattggcca cttgtgcctg gccgacctgg ccgtggctct gttccaagtg ctgcccagc 360
tgccctggaa ggccaccgac cgcttccgtg ggccagatgc cctgtgtcgg gccgtgaagt 420
atctgcagat ggtgggcatg tatgcctcct cctacatgat cctggccatg acgctggacc 480
gccaccgtgc catctgccgt cccatgctgg cgtaccgcca tgggaagtggg gctcactgga 540
accggccggg gctagtggct tgggccttct cgctccttct cagcctgcc cagctcttca 600
tcttcgcca gcgcaacgtg gaaggtggca gcggggtcac tgactgctgg gcctgctttg 660
cggagccctg gggccgtcgc acctatgtca cctggattgc cctgatggg ttcgtggcac 720
ctaccctggg tatcgccgcc tgccaggtgc tcatcttccg ggagattcat gccagtctgg 780
tgccagggcc atcagagagg cctggggggc gccgcagggg acgccggaca ggcagcccg 840
gtgagggagc ccacgtgtca gcagctgtgg ccaagactgt gaggatgacg ctagtgattg 900
tggtcgtcta tgtgctgtgc tgggcaccct tcttcctggg gcagctgtgg gccgcgtggg 960
accgggaggc acctctggaa ggtgggtgta gccgtggcta gggctgacgg ggcacttgg 1020
gcttggccgc atgcccctgt gcccaccag ccatactgaa cccaacctag atcctccacc 1080
tccacagggg cgcccttgt gctactcatg ttgctggcca gcctcaacag ctgcaccaac 1140
ccctggatct atgcatcttt cagcagcagc gtgtcctcag agctgcgaag cttgctctgc 1200
tgtccccggg gacgcacccc acccagcctg ggtccccaag atgagtcctg caccaccgcc 1260
agctcctccc tggccaagga cacttcacg tgaggagctg ttgggtgtct tgctctaga 1320
ggctttgaga agctcagctg ccttcctggg gctggctcctg ggagccactg ggagggggac 1380
ccgtggagaa ttggccagag cctgtggccc cgaggctggg aactgtgtg gccctggaca 1440
agccacagcc cctgcctggg tctccacatc ccagctgta tgaggagagc ttcaggcccc 1500
aggactgtgg gggccctca ggtcagctca ctgagctggg tgtaggaggg gctgcagcag 1560
aggcctgagg agtggcagga aagaggagc aggtgcccc aggtgagaca gcggtccag 1620
gggcctgaaa aggaaggacc aggtggggc caggggacct tcctgtctcc gcctttctaa 1680
tccctccctc ctcatctct ccctaataaa aattggagct cattttccac aaaaaaaaaa 1740

```

<210> 6

<211> 1995

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CNG alfa2 modificado

10

<400> 6

ES 2 687 050 T3

atgatgaccg aaaaatccaa cgggtgtgaag agctctccag ctaataacca taaccatcat 60
 cctcctcctt ctatcaaggc caatggcaaa gatgaccaca gggcaggtag cagaccacag 120
 tctgtggcag ctgatgatga cacttctca gaactgcaaa ggttggcaga gatggatact 180
 ccacgcaggg gaaggggtgg cttccgaagg attgtccgcc tgggtgggat catcagagac 240
 tgggccaaca aaaatttccg tgaggaggaa ccaagacctg actccttctt agagcgtttc 300
 cgtgggcctg agctccagac tgtgacaacc catcaggggg atggcaaagg cgacaaggac 360
 ggcgagggaa agggcaccaa aaagaaattt gaactgtttg ttttggaccc agctggagac 420
 tggattacc gttggttgtt tgtcattgcc atgcctgttc tttacaactg gtgtctgttg 480
 gtagccagag cctgcttcag tgatctacag agaaactatt ttgtggtatg gctgggtctg 540
 gattacttct cagacactgt ttatatgca gacctcatca ttcggctgcg cacaggcttc 600
 ctagaacaag ggctcctggt caaagacccc aagaaattgc gagacaacta tatccacact 660
 ttgcagttca aattggatgt ggcttctatc atccccactg acctcattta ttttgctgtg 720
 ggtatccaca gccttgaggt acgctttaat cgtctgttac actttgcccg tatgtttgag 780
 ttctttgacc gactgagac acgtacaagc taccccaaca tcttccgaat cagcaacctg 840
 gtctctaca tcttggtcat catccactgg aatgcttgta tttactatgc tatctctaag 900
 tccattggct ttggggttga cacctgggtt taccccaaca ttactgaccc tgaatatggc 960
 tacctggcta gggagtacat ttactgcctt tactggtcca cactgacctt caccaccatt 1020
 ggagagacac caccocctgt aaaggatgag gagtacctat ttgtcatctt tgacttctctg 1080
 attggtgtcc tcatctttgc cactattgtg ggaaatgtgg gctccatgat ctccaacatg 1140
 aatgccacac gagcagagtt ccaggccaag attgatgctg tcaaacacta catgcagttc 1200
 cgaaaggtca gtaaagacat ggaagccaag gtcataaat ggtttgacta cttgtggacc 1260
 aataagaaga cagtagatga acgagaagtc ctaaagaacc tgcctgcaaa gcttagggca 1320
 gagatagcca ttaatgttca tttgtccact ctgaagaaag tgcgcatatt ccaggattgg 1380
 gaagctggcc tgctggtgga actggtactg aagcttcgtc ctcaggctctt tagtcctgga 1440
 gattatattt gccgtaaggg ggacattggc aaggaaatgt acatcatcaa ggagggcaaa 1500
 ttggcagtggt tagctgatga tgggtgtgact cagtatgcct tgctgtcagc tgggagctgc 1560
 tttggtgaga ttagtatcct taacattaag ggtagcaaaa tgggcaatcg gcgcactgcc 1620
 aatatccgta gtctgggcta ctcagatctc ttctgcttgt ccaaggatga tcttatggaa 1680
 gctgtgactg agtatcctga tgccaagaaa gtccctggaag aacggggtag ggagatcctg 1740
 atgaagatgg gtctactgga tgagaatgaa gtggcagcta gtatggaggt agatgttcag 1800
 gagaagctgg agcagctgga gacaaacatg gagacctgtt acactcgttt tgcccgcctg 1860
 ctggctgagt aactggagc ccagcagaag ctcaaacagc gcatcacagt gctggagacc 1920
 aagatgaaac agaaccatga ggatgattac ctatcagatg ggataaacac ccctgagcca 1980
 gctgttgctg aatag 1995

<210> 7

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5

<223> aecurina modificada

<400> 7

```

atgagcgtgc tgacccccct gctgctgctg gccctgaccg gcagcgcccg ccgcctgccc    60
gtgccccgcg ccaagatcca cagcctgccc cccgagggca agctgggcat catgaagggtg    120
aagctgacca gcgacttcga caacccaagc tggatcgccc gccacaagca catgttcaac    180
ttcctggacg tgaaccacaa cggccgcctc agcctggacg agatggtgta caaggccagc    240
gacatcgtga tcaacaacct gggcgccacc cccgagcagg ccaagcgcca caaggacgcc    300
gtggaggcct tcttcggcgg cgcggcctat aagtacggcg tggagaccga gtggcccag    360
tacatcgagg gctggaagcg cctggccacc gaggagctgg agcgctacag caagaaccag    420
atcacccctg tccgcctgtg gggcgacgcc ctgttcgaca tcatcgacaa ggaccagaac    480
ggcgccatca ccctggacga gtggaaggcc tacaccaaga gcgccggcat catccagagc    540
agcgaggact gcgaggagac cttccgcgtg tgcgacatcg acgagagcgg ccagctggac    600
gtggacgaga tgacccgcca gcacctgggc ttctggtaca ccatggaccc cgcctgcgag    660
aagctgtacg gcggcgccgt gccctaa                                         687

```

10

<210> 8

<211> 463

<212> PRT

<213> Humana

15

<400> 8

ES 2 687 050 T3

Met Ala Gly Ala Pro Gly Pro Leu Arg Leu Ala Leu Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Met Val Gly Arg Ala Gly Pro Arg Pro Gln Gly Ala Thr Val Ser Leu
20 25 30

Trp Glu Thr Val Gln Lys Trp Arg Glu Tyr Arg Arg Gln Cys Gln Arg
35 40 45

Ser Leu Thr Glu Asp Pro Pro Pro Ala Thr Asp Leu Phe Cys Asn Arg
50 55 60

Thr Phe Asp Glu Tyr Ala Cys Trp Pro Asp Gly Glu Pro Gly Ser Phe
65 70 75 80

Val Asn Val Ser Cys Pro Trp Tyr Leu Pro Trp Ala Ser Ser Val Pro

ES 2 687 050 T3

85										90					95				
Gln	Gly	His	Val	Tyr	Arg	Phe	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Leu	Trp	Leu	Gln				
			100					105					110						
Lys	Asp	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro	Trp	Arg	Asp	Leu	Ser	Glu	Cys	Glu	Glu				
		115					120					125							
Ser	Lys	Arg	Gly	Glu	Arg	Ser	Ser	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu				
	130					135					140								
Tyr	Ile	Ile	Tyr	Thr	Val	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ser	Phe	Ser	Ala	Leu	Val				
145					150					155					160				
Ile	Ala	Ser	Ala	Ile	Leu	Leu	Gly	Phe	Arg	His	Leu	His	Cys	Thr	Arg				
				165					170					175					
Asn	Tyr	Ile	His	Leu	Asn	Leu	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Leu	Arg	Ala	Leu				
			180					185					190						
Ser	Val	Phe	Ile	Lys	Asp	Ala	Ala	Leu	Lys	Trp	Met	Tyr	Ser	Thr	Ala				
		195					200					205							
Ala	Gln	Gln	His	Gln	Trp	Asp	Gly	Leu	Leu	Ser	Tyr	Gln	Asp	Ser	Leu				
	210					215					220								
Ser	Cys	Arg	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Met	Gln	Tyr	Cys	Val	Ala	Ala	Asn				
225					230					235					240				
Tyr	Tyr	Trp	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala				
			245						250					255					
Phe	Ser	Val	Leu	Ser	Glu	Gln	Trp	Ile	Phe	Arg	Leu	Tyr	Val	Ser	Ile				
		260						265					270						
Gly	Trp	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Phe	Val	Val	Pro	Trp	Gly	Ile	Val	Lys				
		275					280					285							
Tyr	Leu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Gly	Cys	Trp	Thr	Arg	Asn	Ser	Asn	Met	Asn				
	290					295					300								
Tyr	Trp	Leu	Ile	Ile	Arg	Leu	Pro	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile	Gly	Val	Asn				
305					310					315					320				
Phe	Leu	Ile	Phe	Val	Arg	Val	Ile	Cys	Ile	Val	Val	Ser	Lys	Leu	Lys				
				325					330					335					

ES 2 687 050 T3

Ala Asn Leu Met Cys Lys Thr Asp Ile Lys Cys Arg Leu Ala Lys Ser
340 345 350

Thr Leu Thr Leu Ile Pro Leu Leu Gly Thr His Glu Val Ile Phe Ala
355 360 365

Phe Val Met Asp Glu His Ala Arg Gly Thr Leu Arg Phe Ile Lys Leu
370 375 380

Phe Thr Glu Leu Ser Phe Thr Ser Phe Gln Gly Leu Met Val Ala Ile
385 390 395 400

Leu Tyr Cys Phe Val Asn Asn Glu Val Gln Leu Glu Phe Arg Lys Ser
405 410 415

Trp Glu Arg Trp Arg Leu Glu His Leu His Ile Gln Arg Asp Ser Ser
420 425 430

Met Lys Pro Leu Lys Cys Pro Thr Ser Ser Leu Ser Ser Gly Ala Thr
435 440 445

Ala Gly Ser Ser Met Tyr Thr Ala Thr Cys Gln Ala Ser Cys Ser
450 455 460

<210> 9

<211> 1392

5

<212> ADN

<213> Humana

<400> 9

```
atggccggcg cccccggccc gctgcgcctt gcgctgctgc tgctcgggat ggtgggcagg 60
gccggccccc gccccagggt tgccactgtg tccctctggg agacgggtgca gaaatggcga 120
gaataccgac gccagtgccg gcgctccctg actgaggatc cacctcctgc cacagacttg 180
ttctgcaacc ggaccttcga tgaatacgcc tgctggccag atggggagcc aggtctgttc 240
gtgaatgtca gctgcccctg gtacctgccc tgggccagca gtgtgccgca gggccacgtg 300
taccggttct gcacagctga aggcctctgg ctgcagaagg acaactccag cctgccctgg 360
agggacttgt cggagtgcga ggagtccaag cgaggggaga gaagctcccc ggaggagcag 420
ctcctgttcc tctacatcat ctacacggtg ggctacgcac tctccttctc tgctctggtt 480
atcgccctctg cgatcctcct cggcttcaga cacctgcact gcaccggaa ctacatccac 540
ctgaacctgt ttgcatcctt catcctgcga gcattgtccg tcttcatcaa ggaacgcagc 600
ctgaagtgga tgtatagcac agccgcccag cagcaccagt gggatgggct cctctcctac 660
caggactctc tgagctgccg cctggtgttt ctgctcatgc agtactgtgt ggcggccaat 720
tactactggc tcttggtgga gggcgtgtac ctgtacacac tgctggcctt ctcggtcttc 780
```

10

ES 2 687 050 T3

tctgagcaat ggatcttcag gctctacgtg agcataggct ggggtgttcc cctgctgttt	840
gttgtccctt ggggcattgt caagtacctc tatgaggacg agggctgctg gaccaggaac	900
tccaacatga actactggct cattatccgg ctgccattc tctttgccaat tggggtgaac	960
ttcctcatct ttgttcgggt catctgcacg gtggtatcca aactgaaggc caatctcatg	1020
tgcaagacag acatcaaatg cagacttgcc aagtccacgc tgacactcat cccctgctg	1080
gggactcatg aggtcatctt tgcctttgtg atggacgagc acgccggggg gacctgctg	1140
ttcatcaagc tgtttacaga gctctccttc acctccttcc aggggctgat ggtggccatc	1200
ttatactgct ttgtcaacaa tgaggtcacg ctggaatttc ggaagagctg ggagcgctgg	1260
cggcttgagc acttgacat ccagagggac agcagcatga agccctcaa gtgtcccacc	1320
agcagcctga gcagtggagc cacggcgggc agcagcatgt acacagccac ttgccaggcc	1380
tcctgcagct ga	1392

REIVINDICACIONES

1. Un kit para su uso en la medición de la cantidad de una forma activa de GLP-1 o la cantidad de AVP en una muestra biológica, que comprende una célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio.
- 5 2. El kit según la reivindicación 1, en el que V2R tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 1, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2 y la proteína sensible al calcio es apoaeuorina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3.
- 10 3. El kit según la reivindicación 1, en el que el receptor de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 8, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2 y la proteína sensible al calcio es apoaeuorina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3.
4. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG.
- 15 5. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína sensible al calcio es apoaeuorina.
6. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el kit es para diagnosticar diabetes insípida o SIADH, para determinar cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar o para determinar el efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1.
7. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la célula es una célula congelada.
- 20 8. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio.
9. El kit según la reivindicación 8, en el que el sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio es coelenteracina o un derivado de coelenteracina.
- 25 10. Un método de diagnóstico de diabetes insípida o SIADH, un método de determinación de cualquiera de una infusión de líquido hipotónico o hipertónico a seleccionar o un método de determinación del efecto de un fármaco terapéutico relacionado con GLP-1, que comprende las siguientes etapas (1) a (3):
 - (1) preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} y una muestra derivada de la sangre de un sujeto de prueba;
 - 30 (2) añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (1); y
 - (3) medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.
11. Un método de cribado de un antagonista de GPCR acoplado a G, que comprende las siguientes etapas (A') a (C'):
- 35 (A') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio sin Ca^{2+} , un agonista de GPCR expresado en la célula y un compuesto de prueba;
- (B') añadir una disolución que contiene Ca^{2+} a la mezcla preparada en (A'); y
- 40 (C') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.
12. Un método de cribado de un antagonista de GPCR acoplado a G, que comprende las siguientes etapas (A'') a (C''):
- (A'') preparar una mezcla que contiene una célula que expresa un GPCR acoplado a G que es un receptor de GLP-1 o V2R, un canal de calcio dependiente de AMPc y una proteína sensible al calcio, un sustrato luminiscente para la proteína sensible al calcio, un medio que contiene Ca^{2+} , un agonista de GPCR expresado en la célula y un compuesto de prueba;
- 45 (B'') añadir forskolina a la mezcla preparada en (A''); y
- (C'') medir la luminiscencia de la proteína sensible al calcio emitida de la célula.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que V2R tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 1, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2 y la proteína sensible al calcio es apoaecurina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3.
- 5 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el receptor de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 8, el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG modificado que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 2 y la proteína sensible al calcio es apoaecurina modificada que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID N°: 3.
- 10 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el canal de calcio dependiente de AMPc es un canal de iones CNG.
16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que la proteína sensible al calcio es apoaecurina.

Figura 1

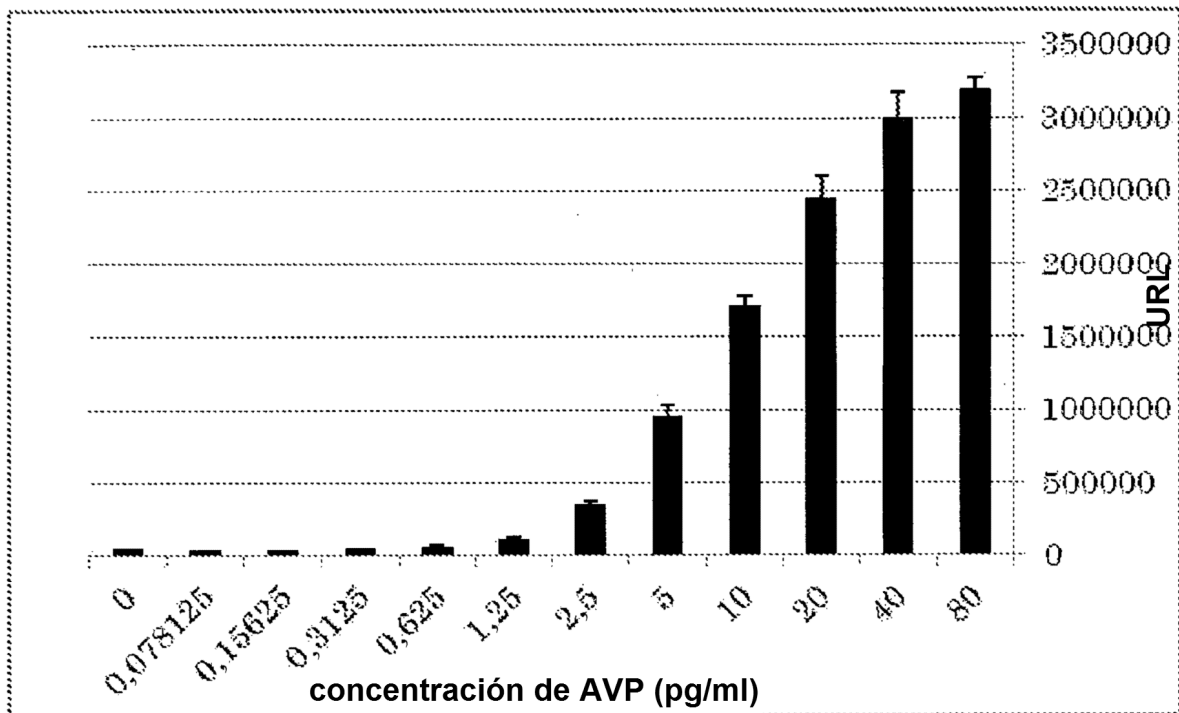


Figura 2

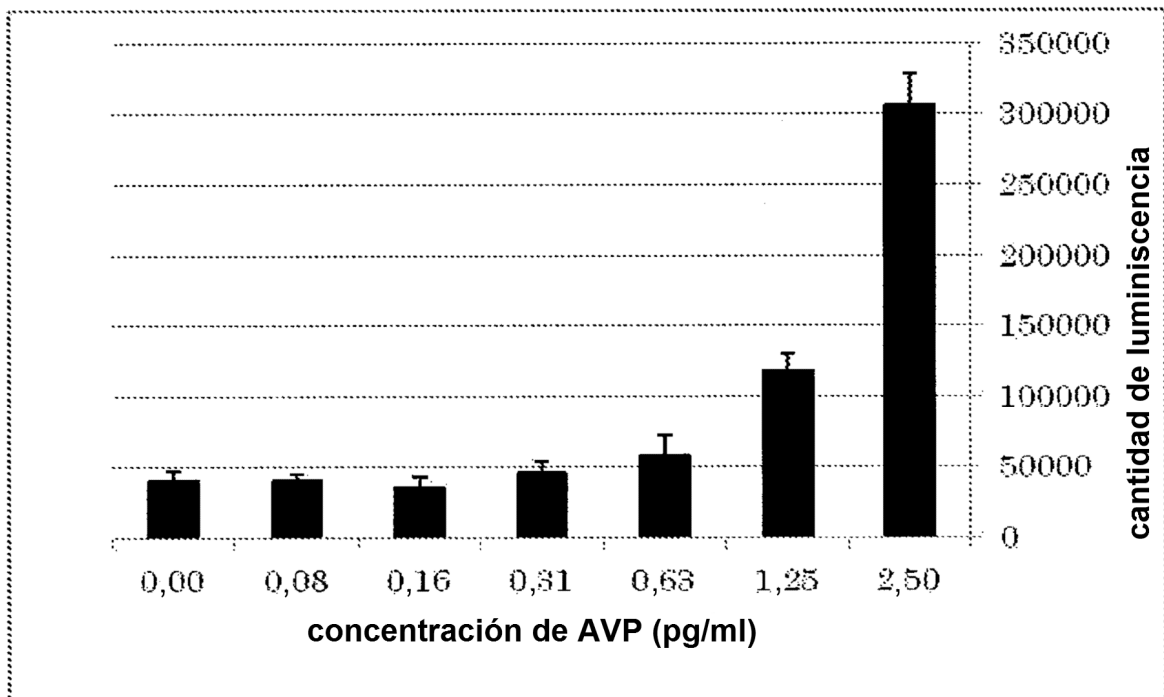


Figura 3

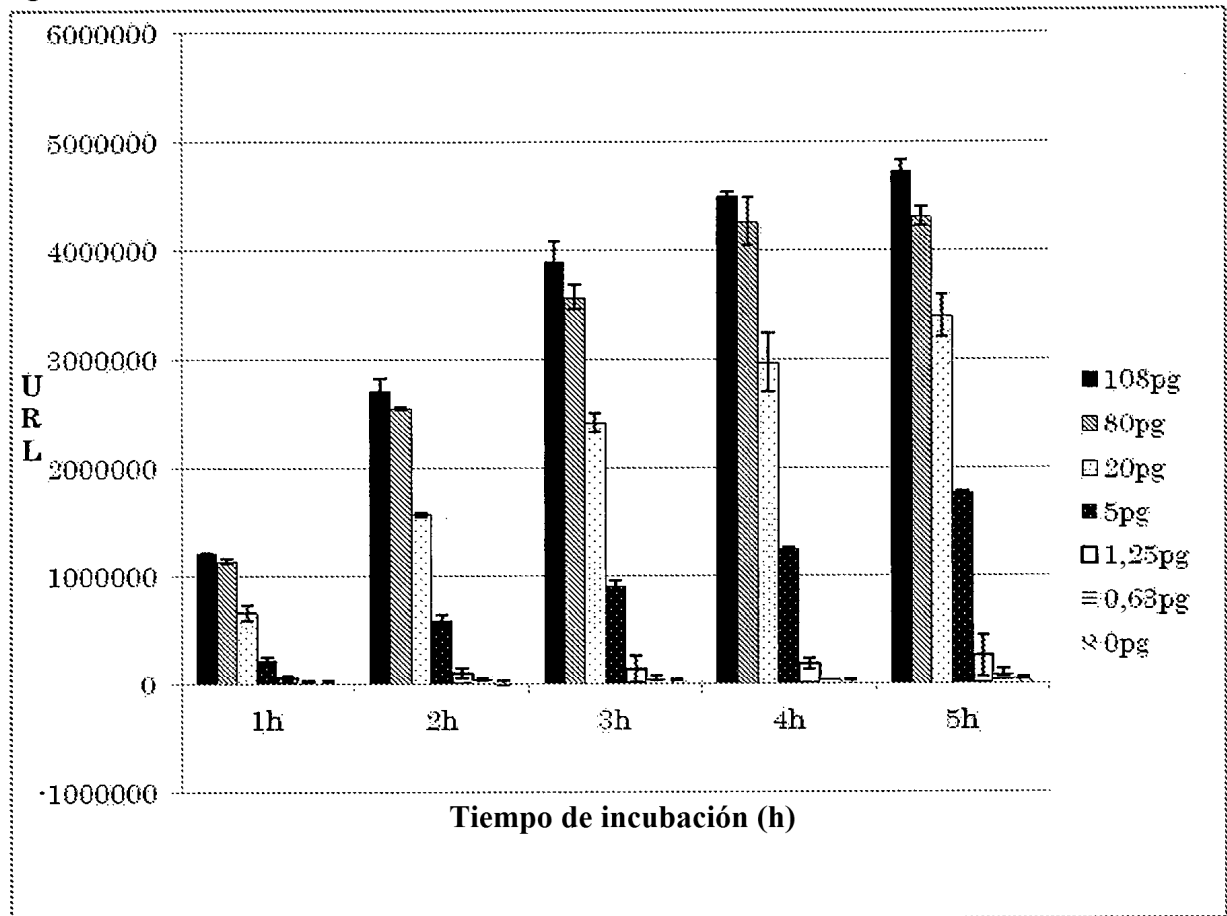


Figura 4

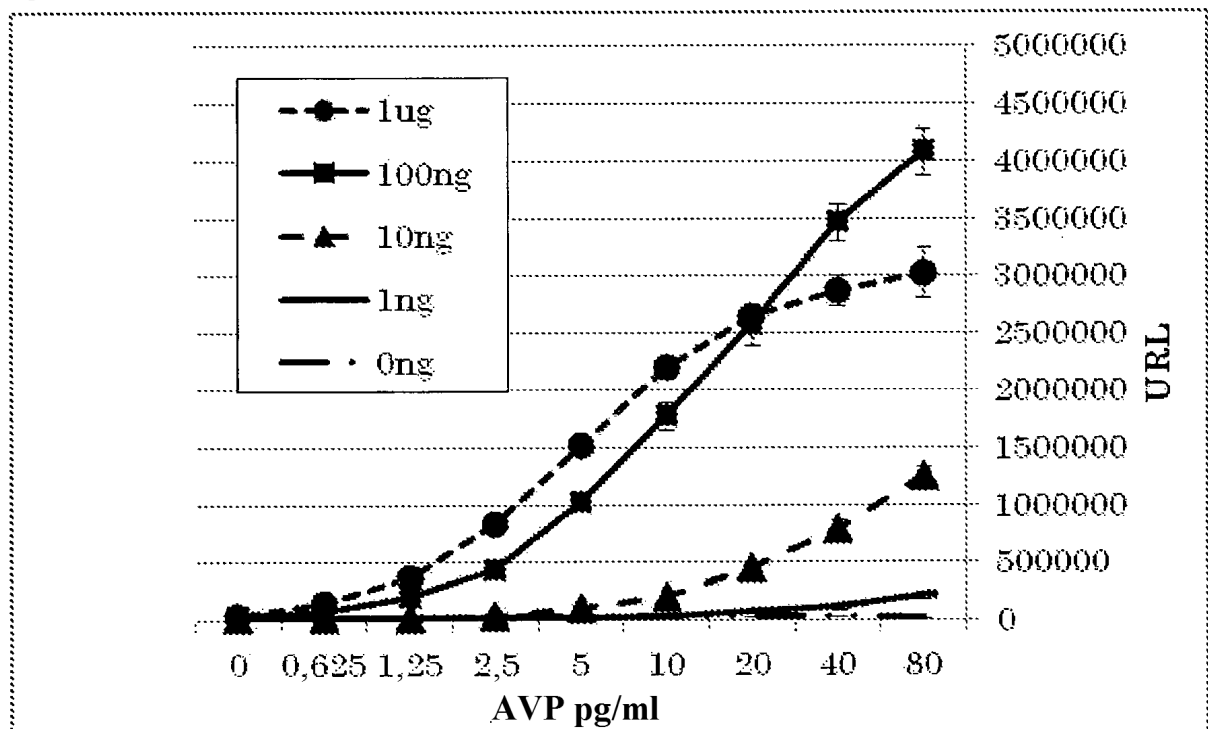


Figura 5

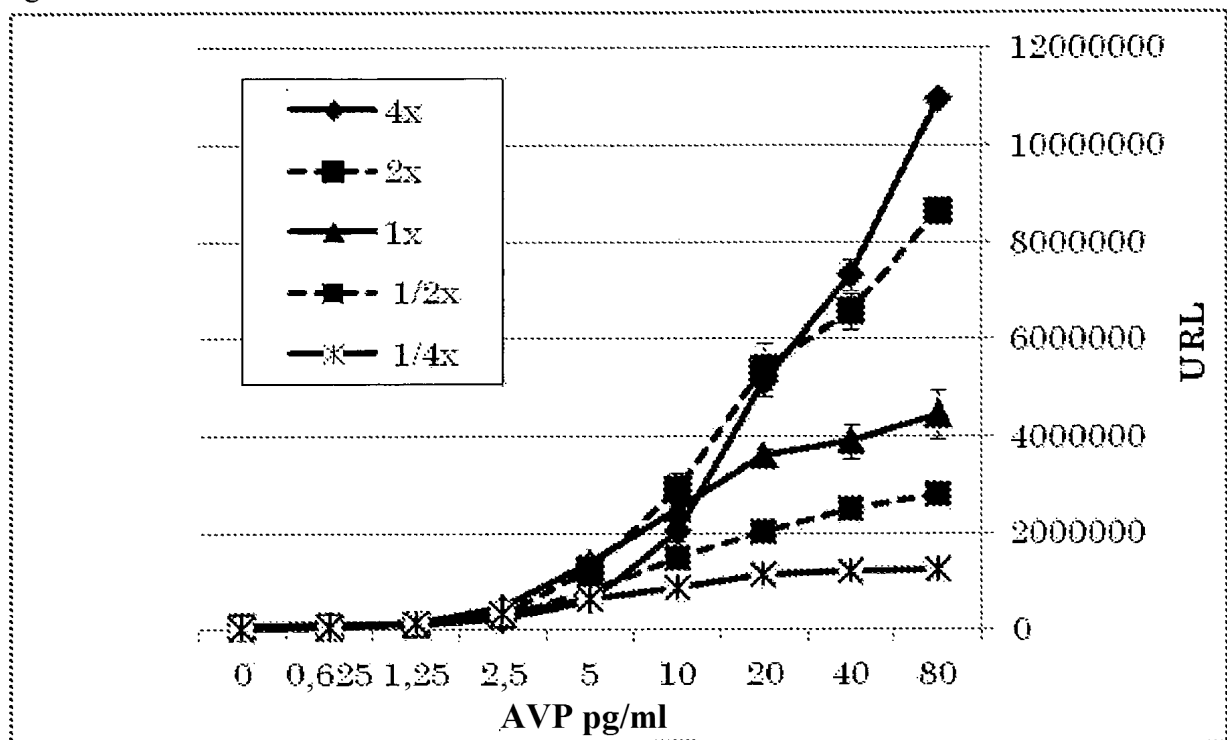


Figura 6

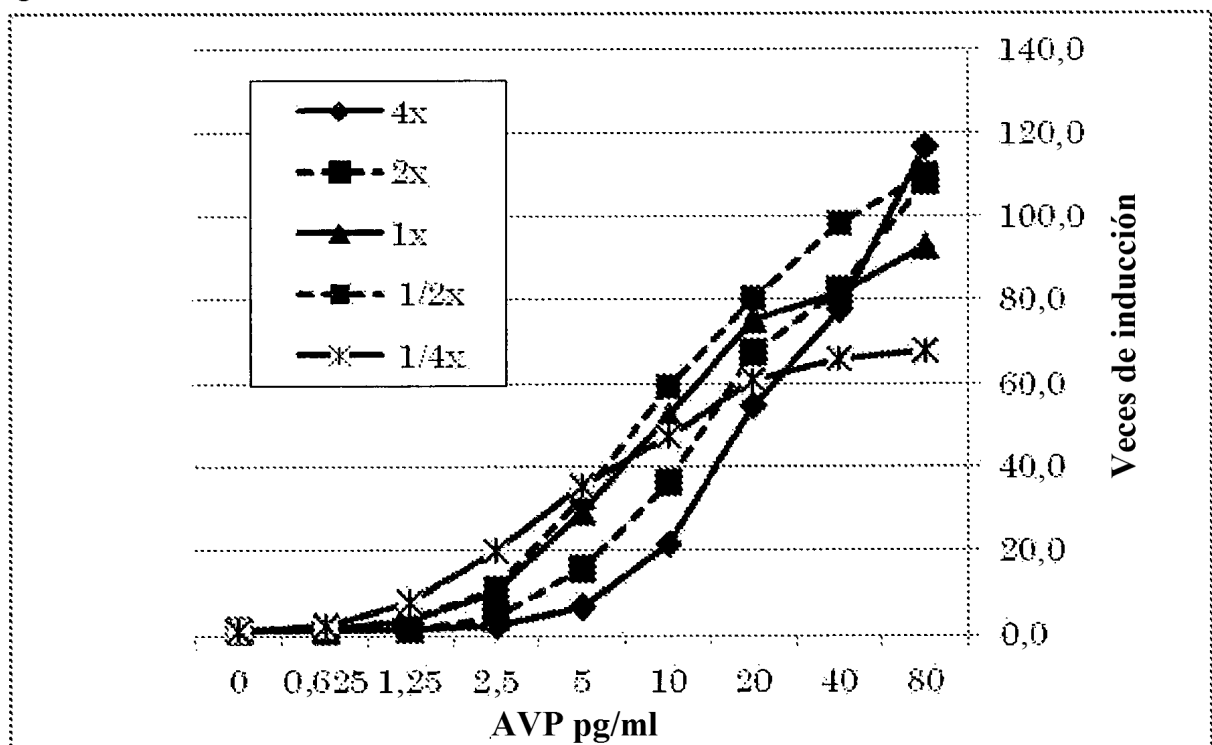


Figura 7

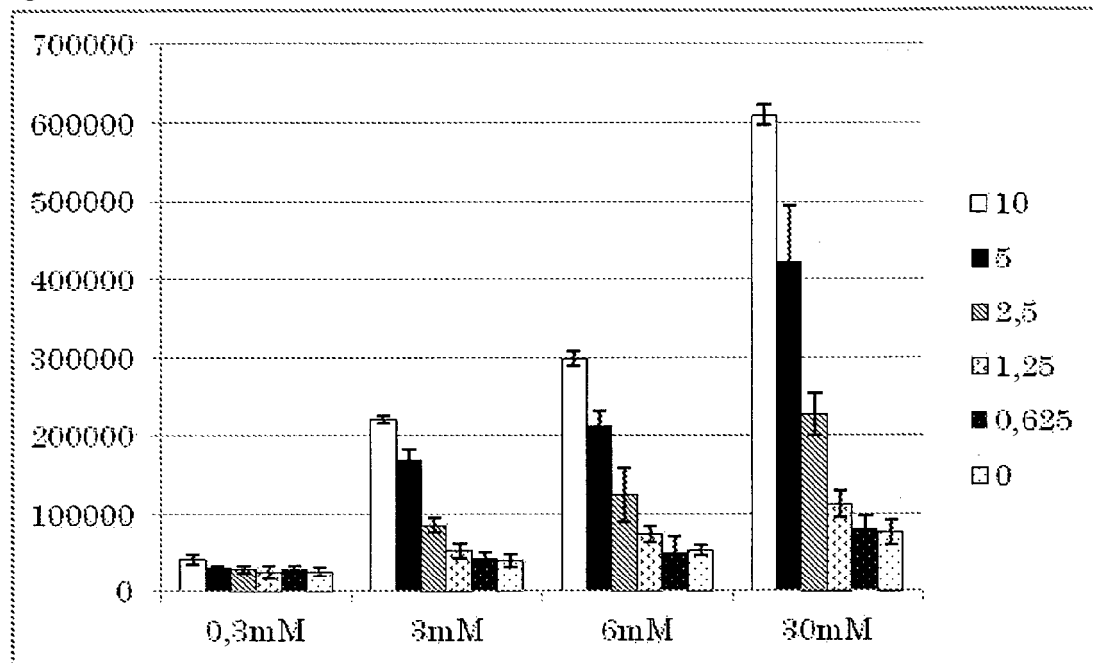


Figura 8

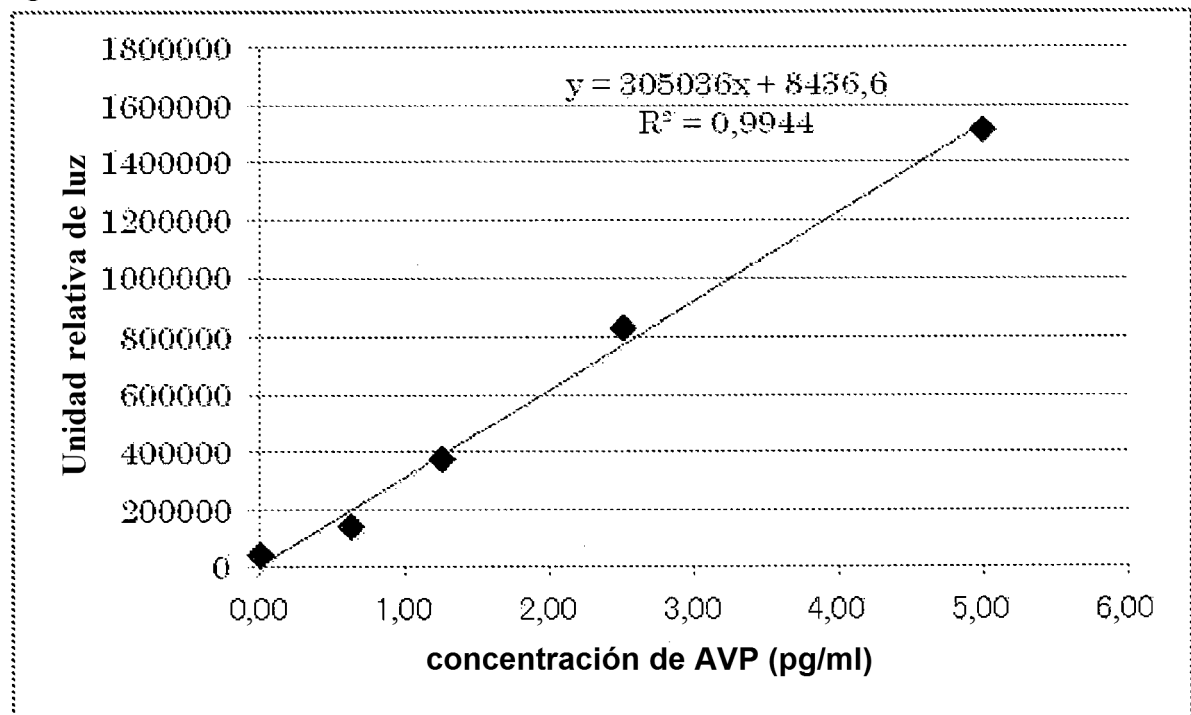


Figura 9

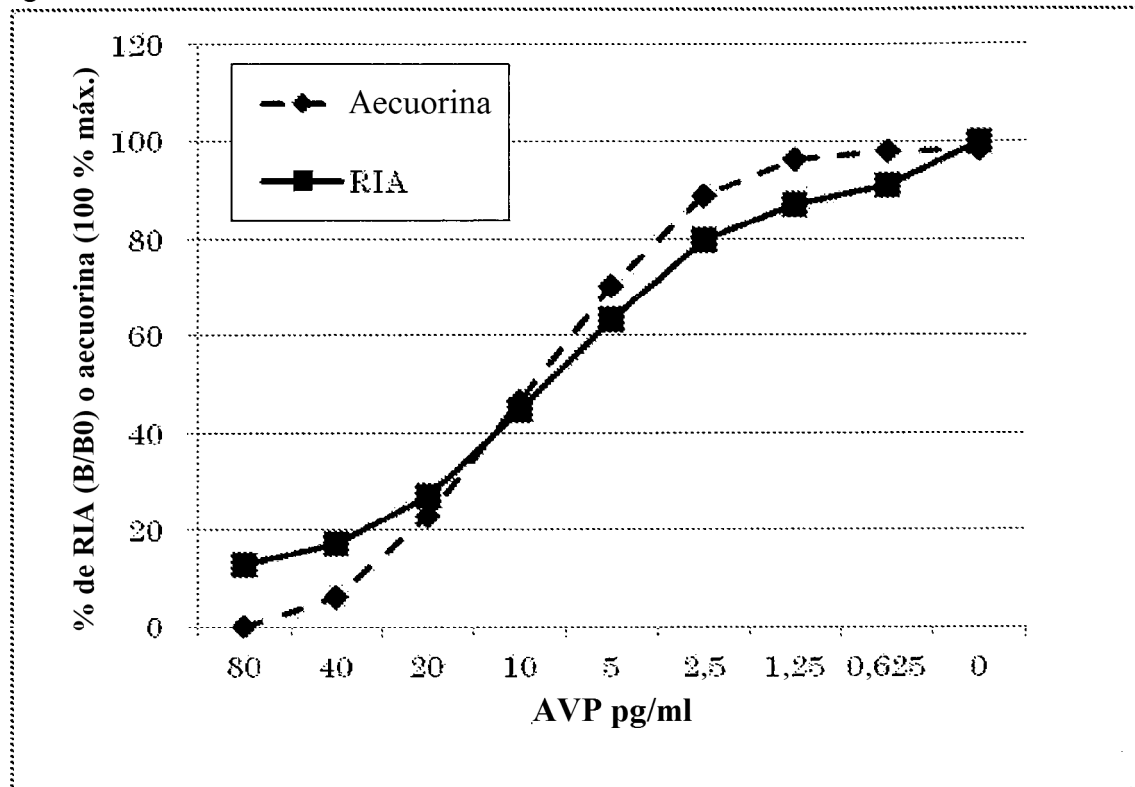


Figura 10

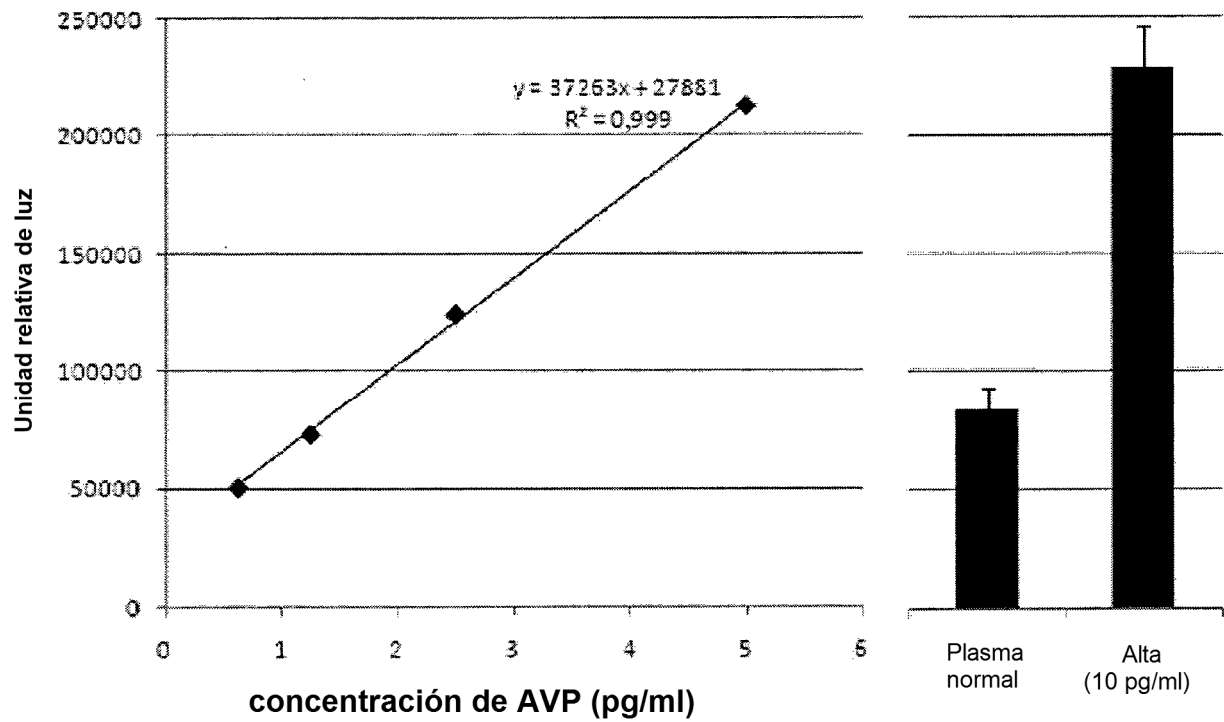


Figura 11

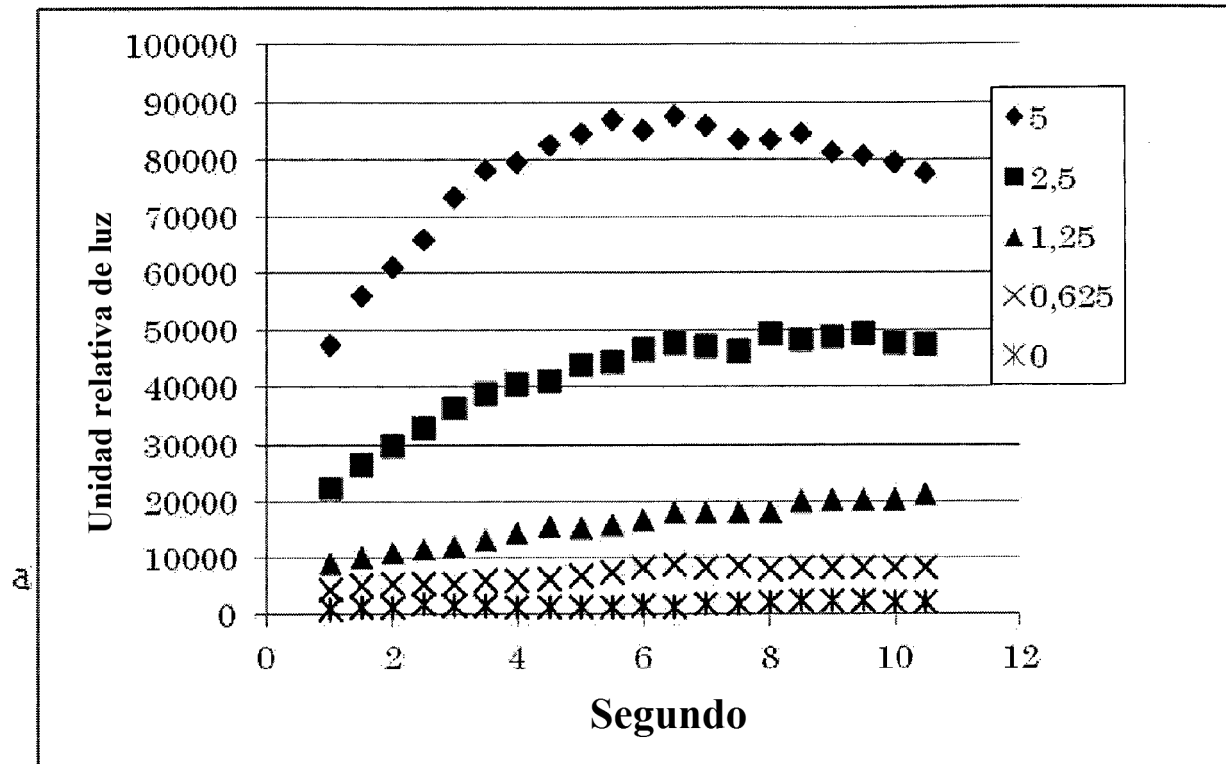


Figura 12

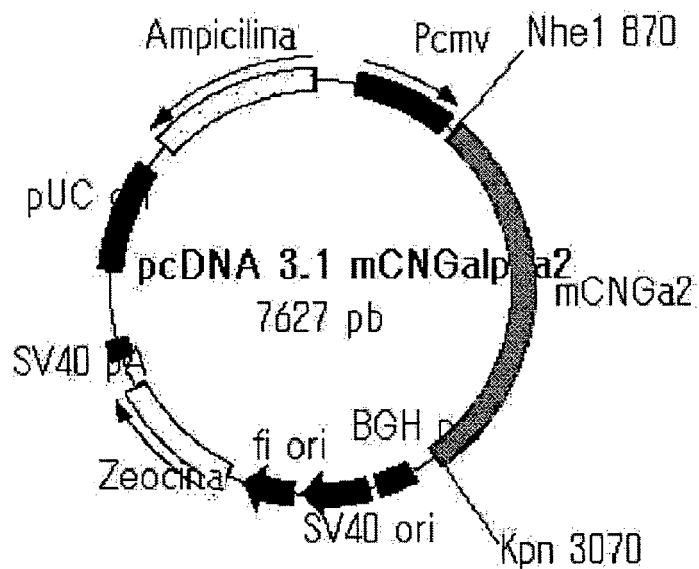


Figura 13

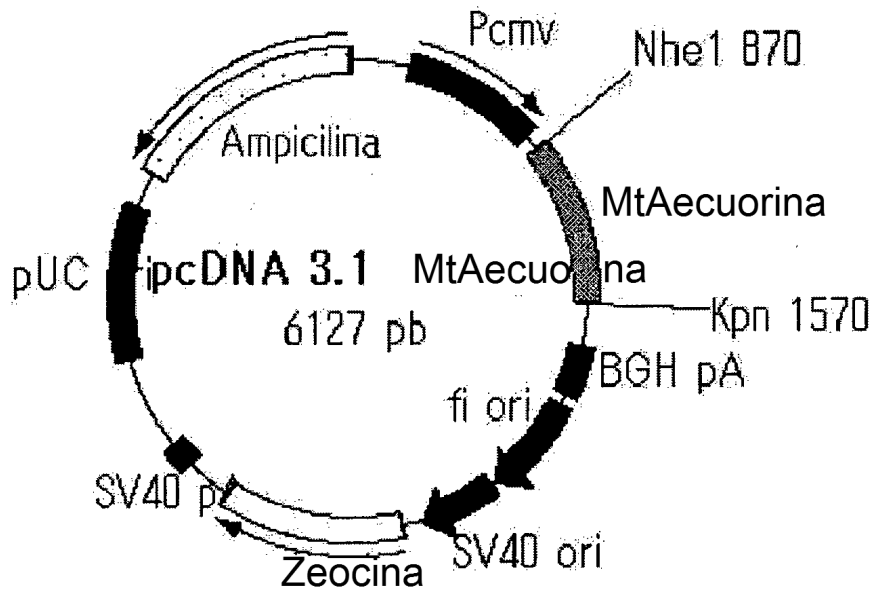


Figura 14

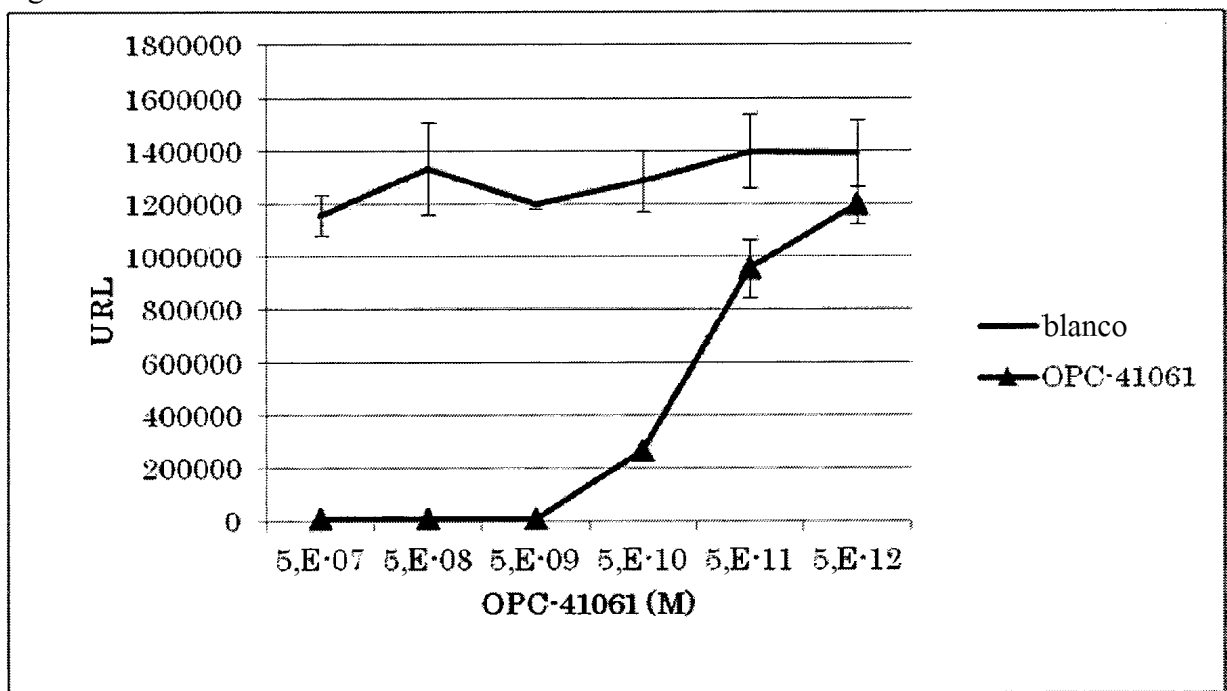


Figura 15

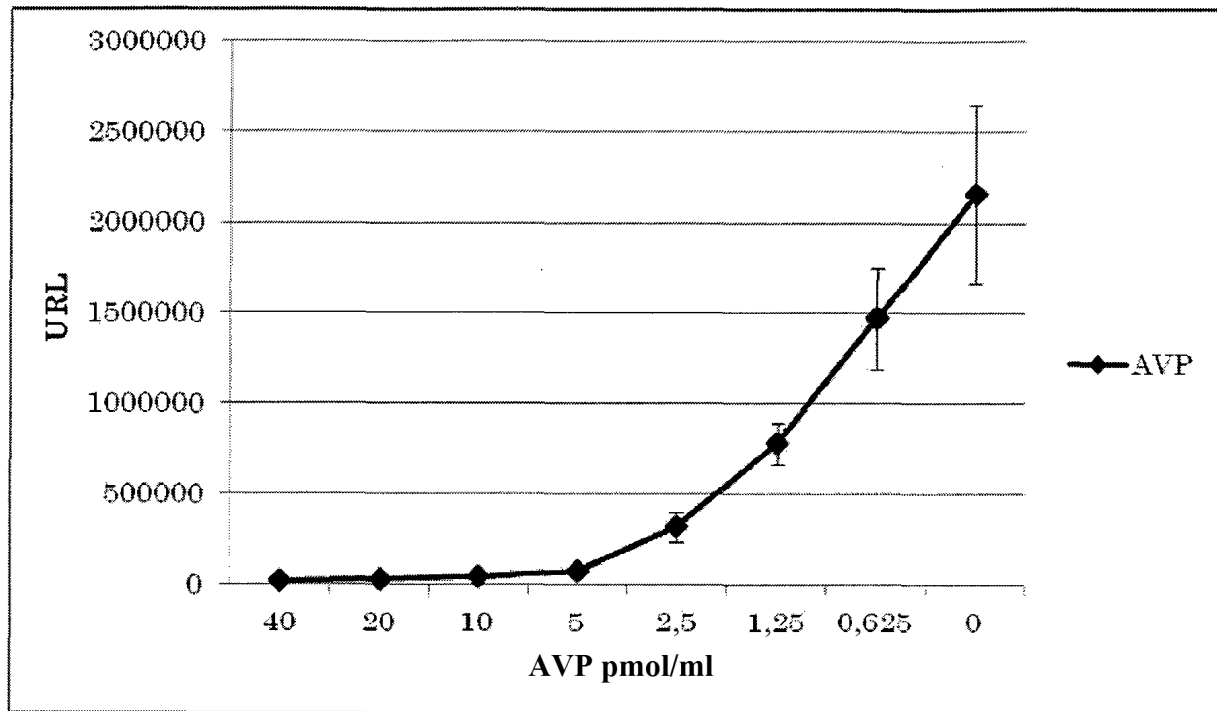


Figura 16

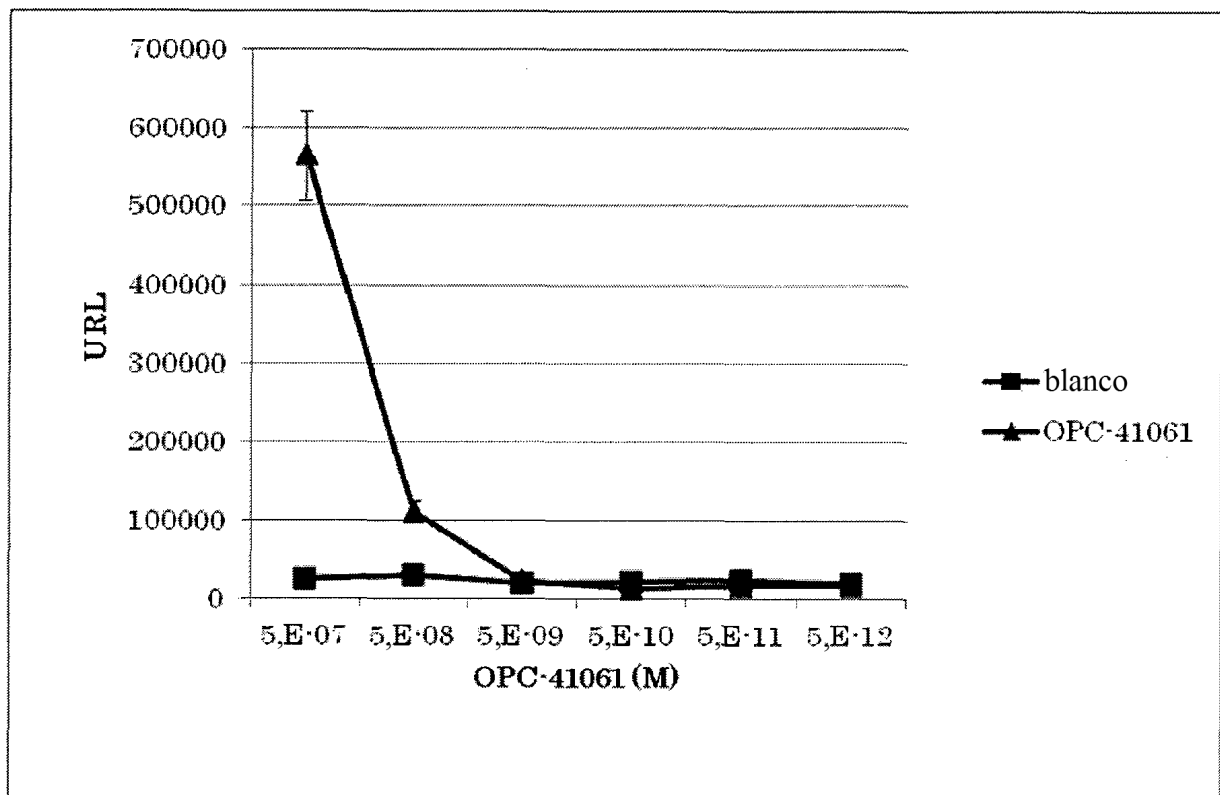


Figura 17

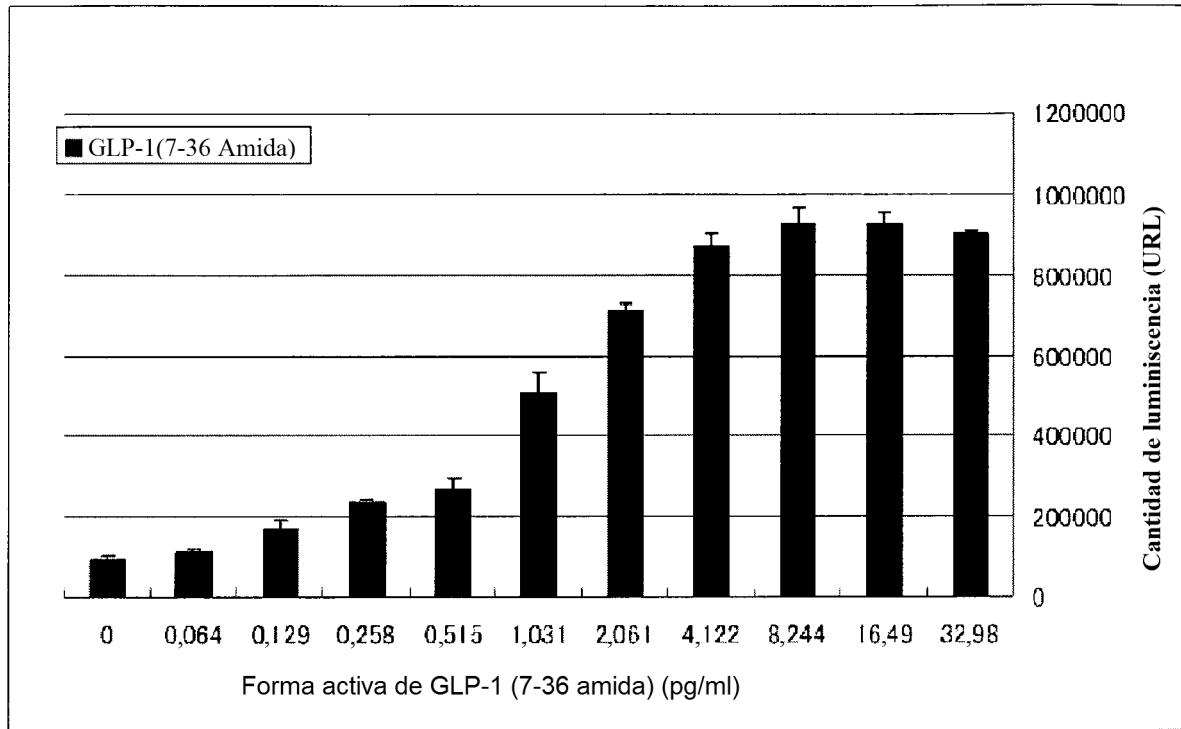


Figura 18

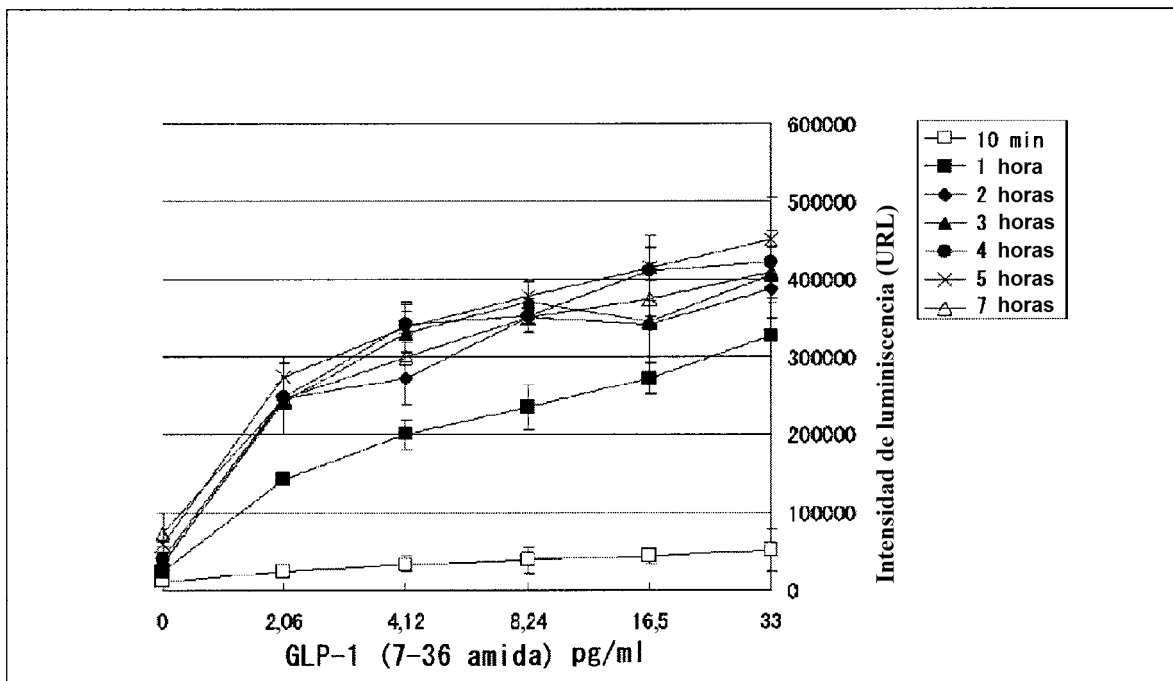


Figura 19

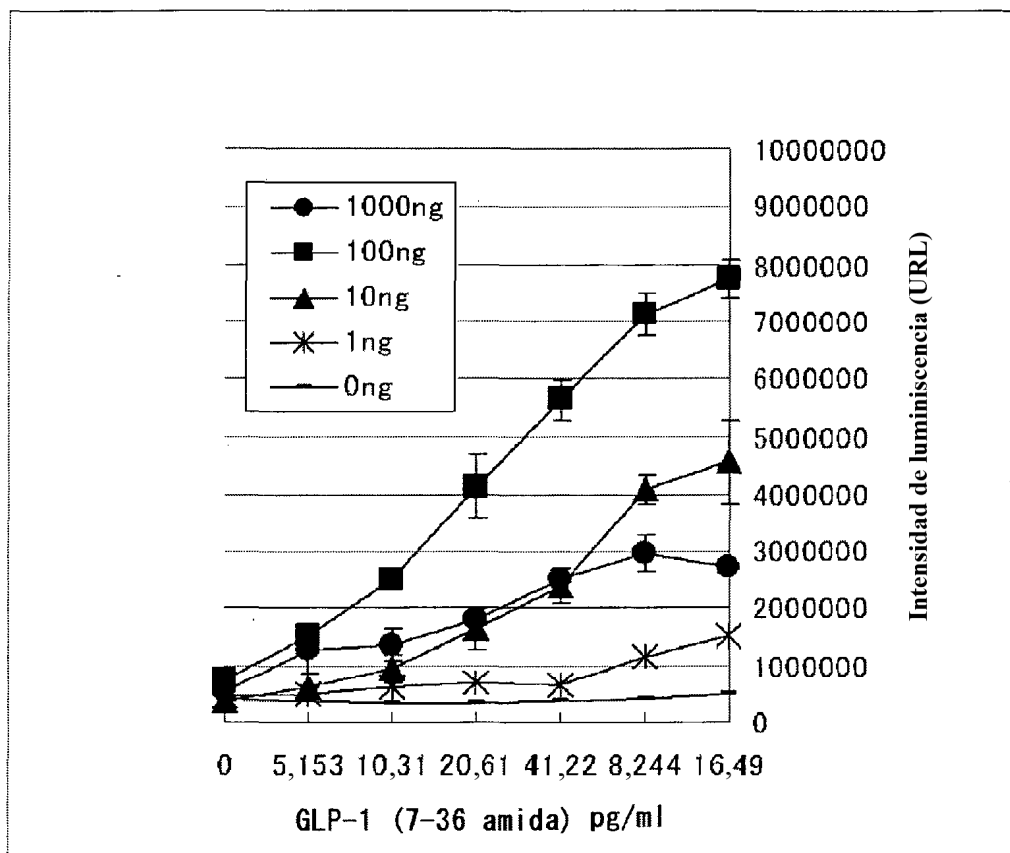


Figura 20

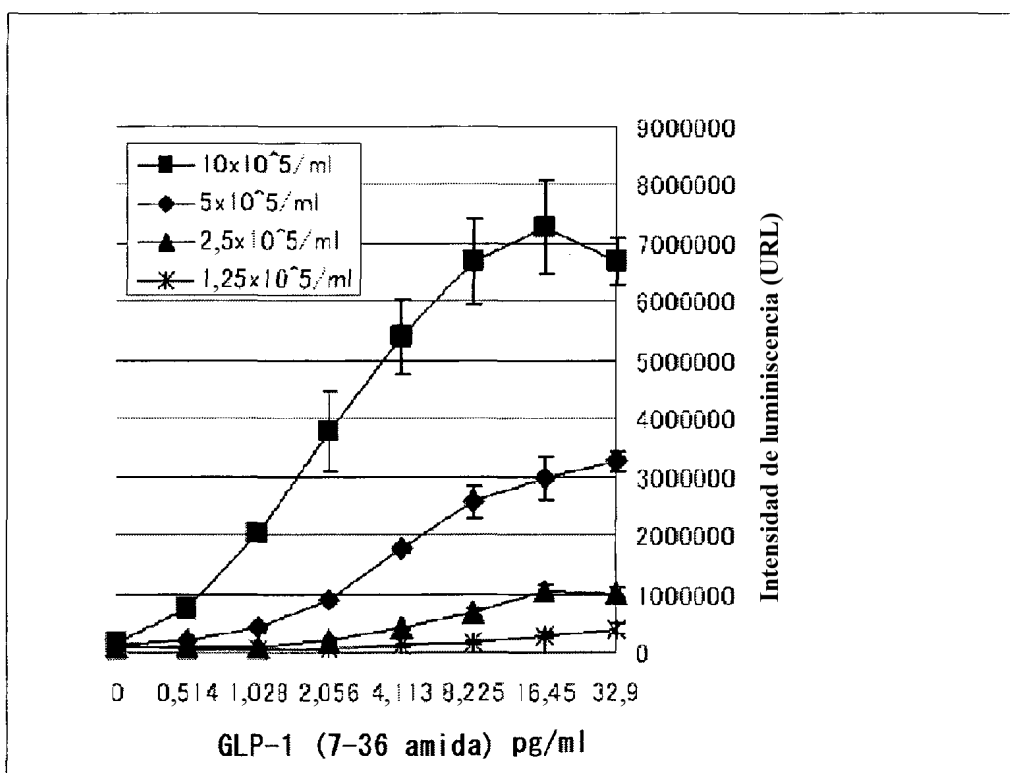


Figura 21

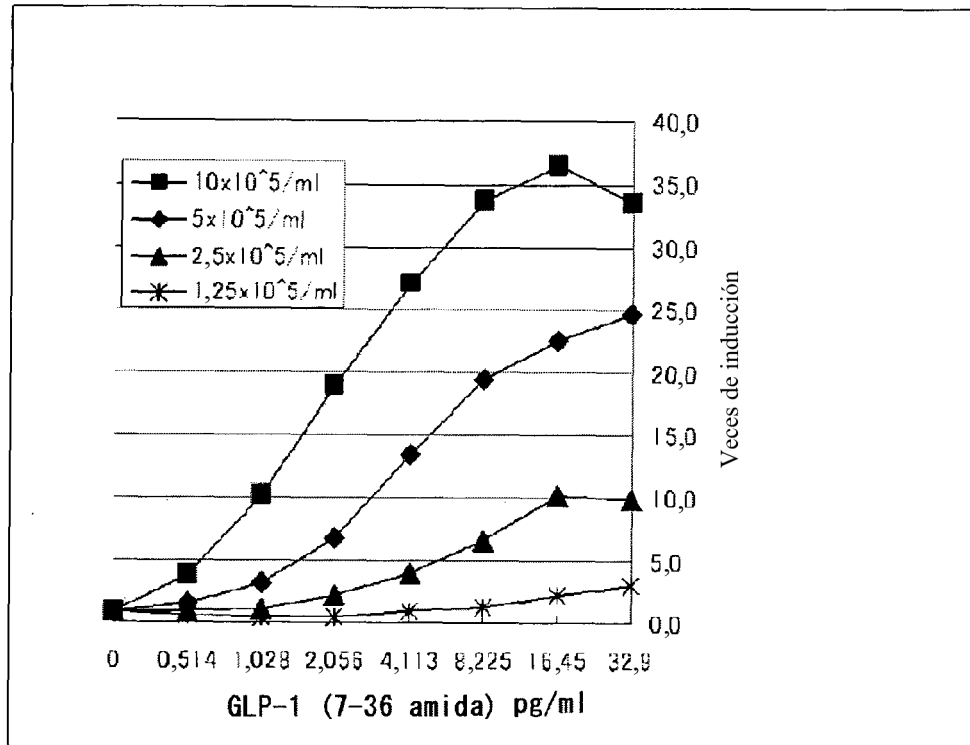


Figura 22

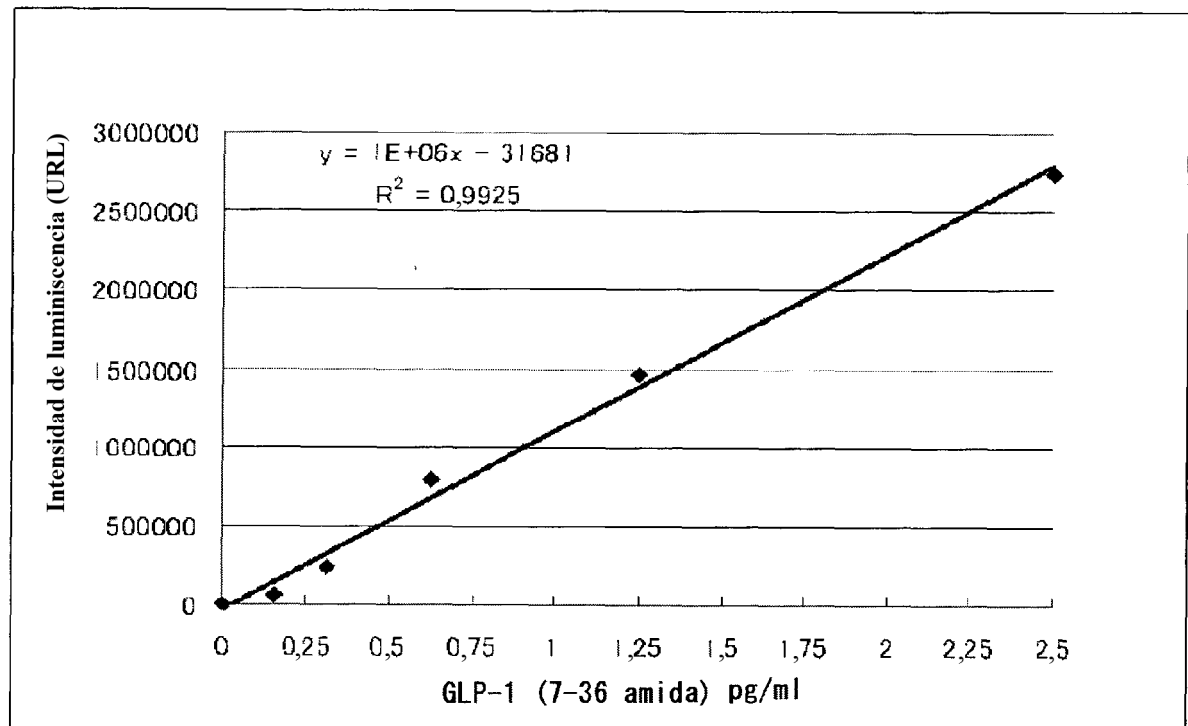


Figura 23

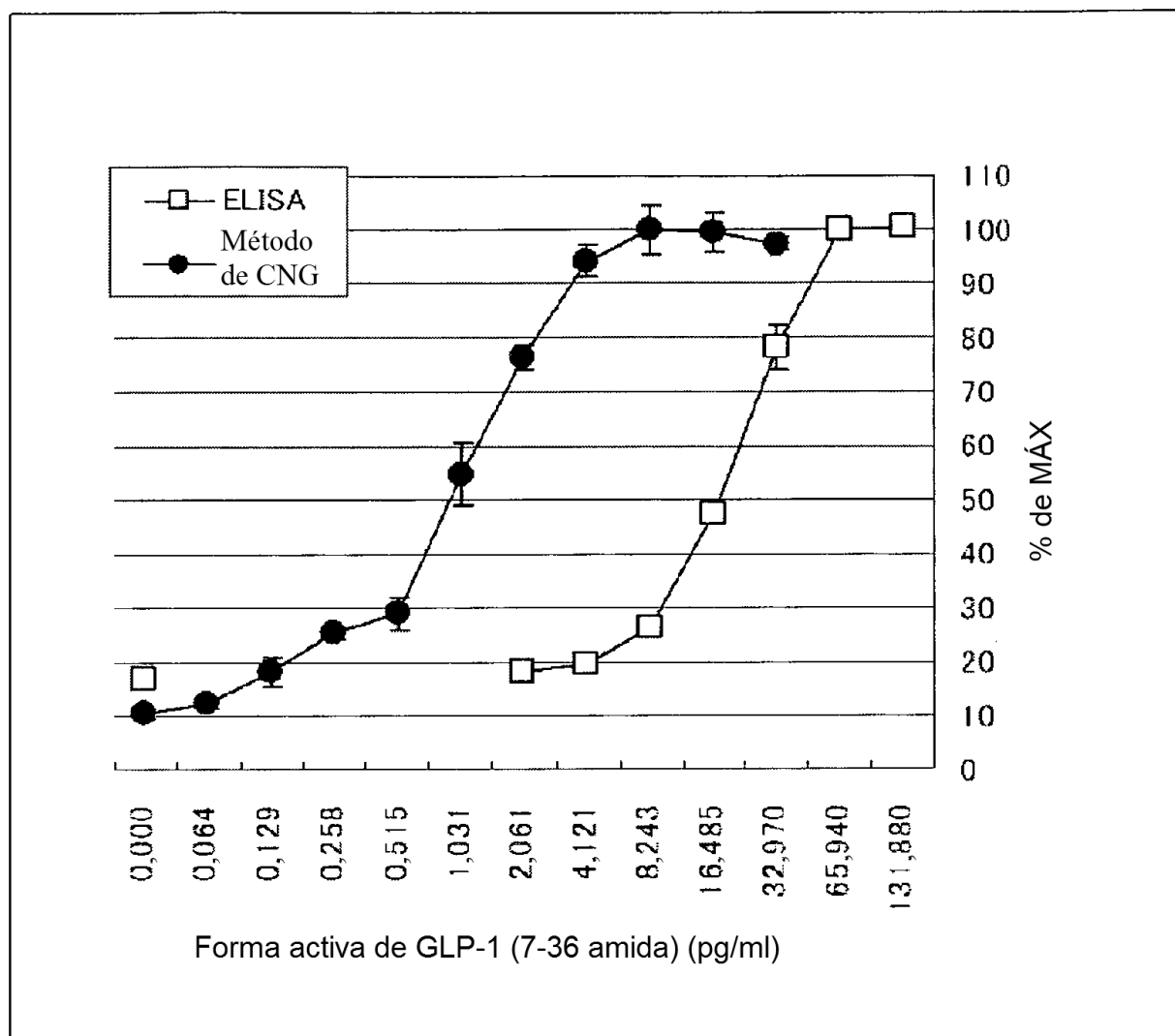
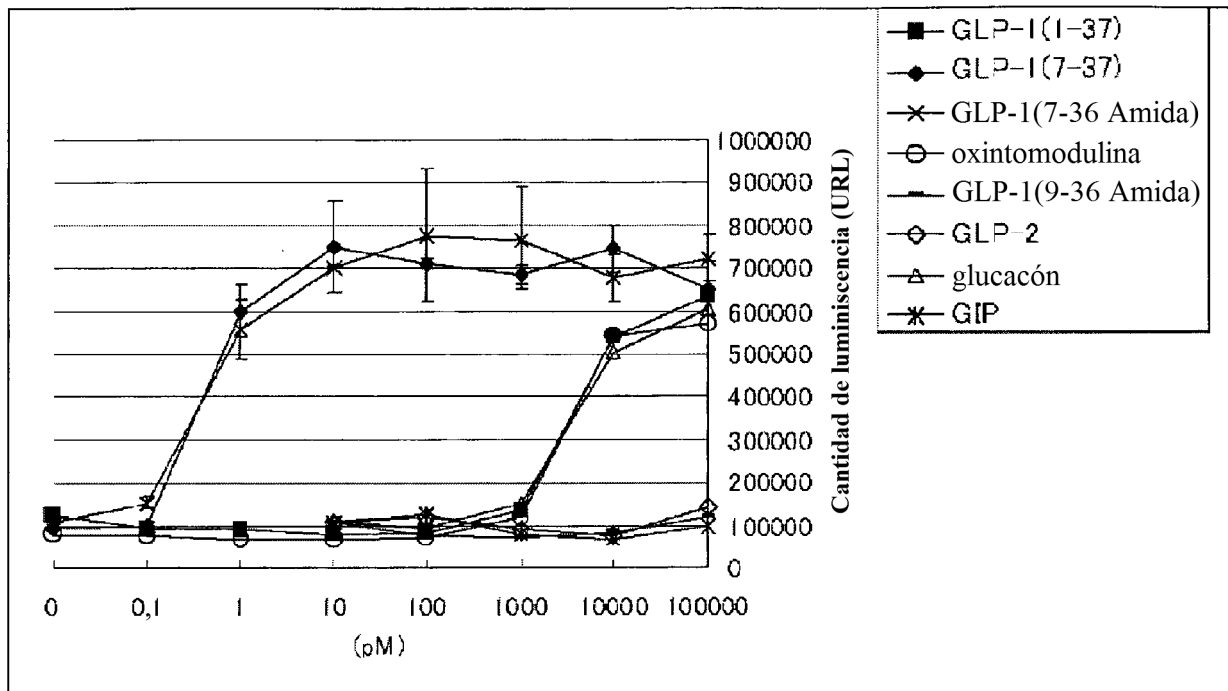


Figura 24



incretinas	CE ₅₀ (pM)
GLP-1(1-37)	4378
GLP-1(7-37)	0,49
GLP-1(7-36amida)	0,61
GLP-1(9-36amida)	100000<
oxintomodulina	3085
GLP-2	100000<
glucagón	4087
GIP	100000<

Figura 25

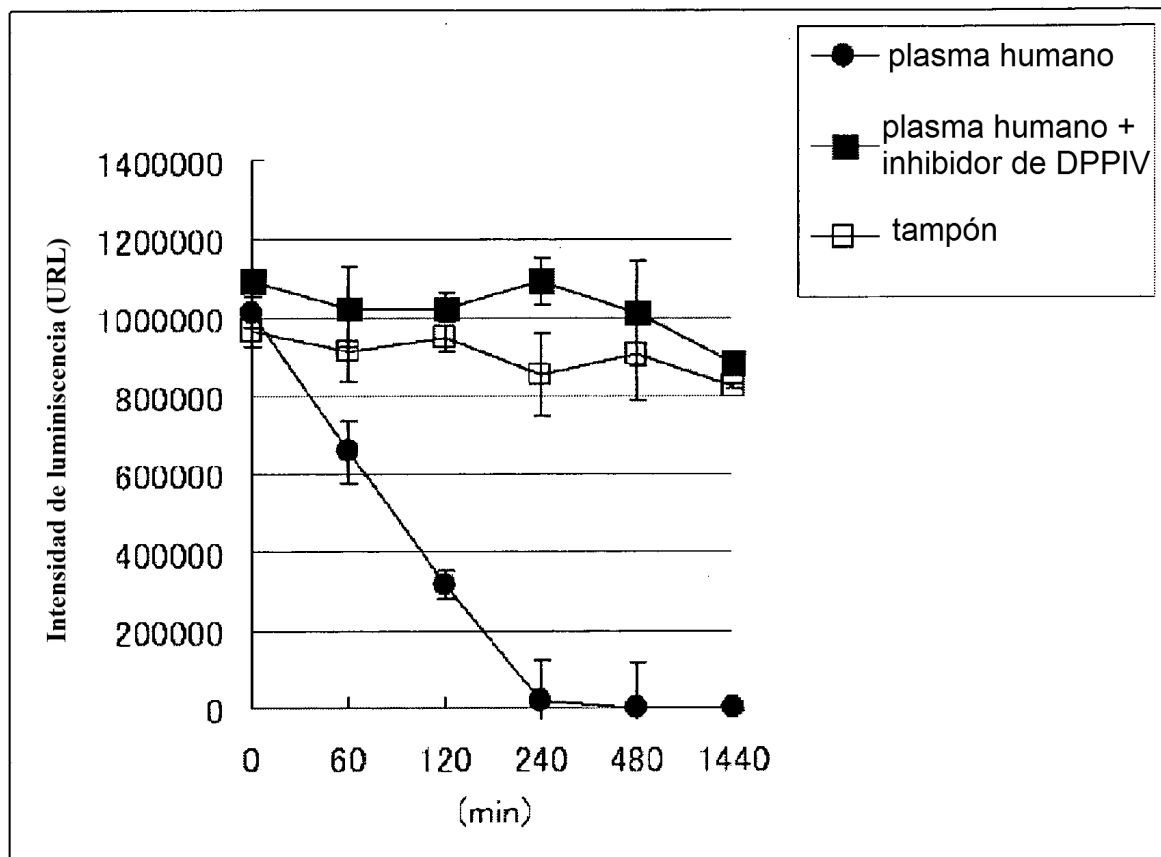


Figura 26

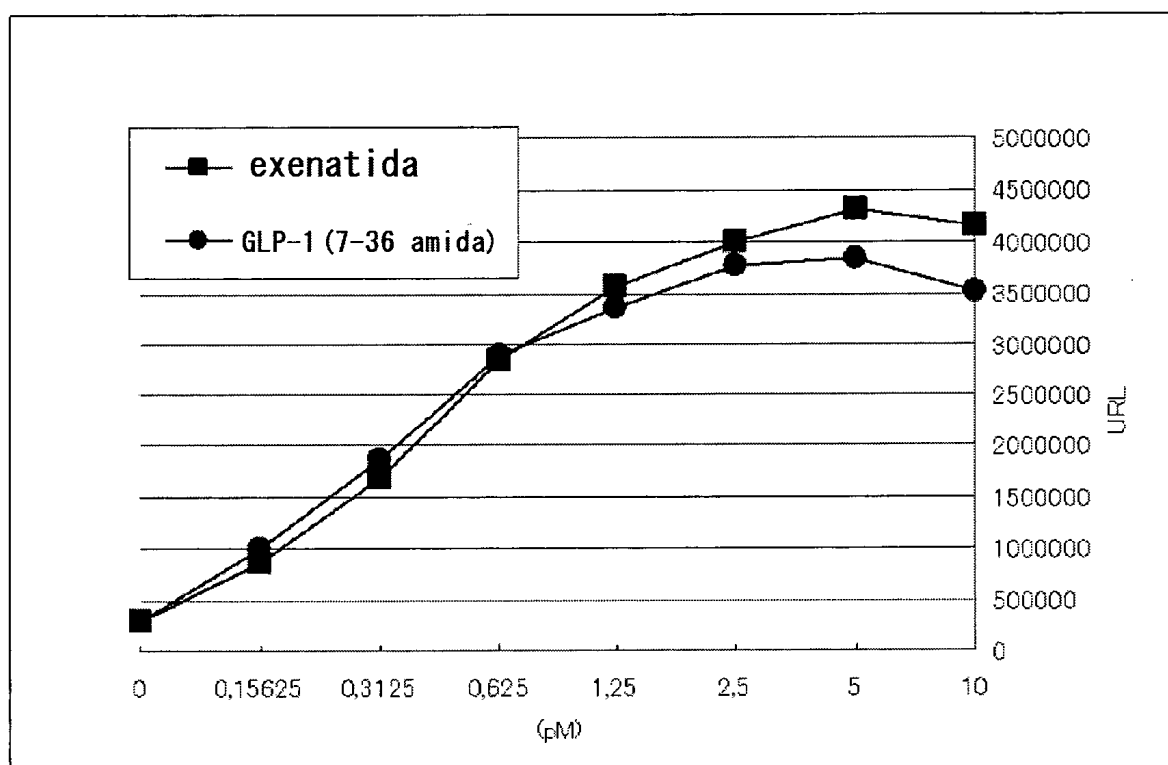


Figura 27

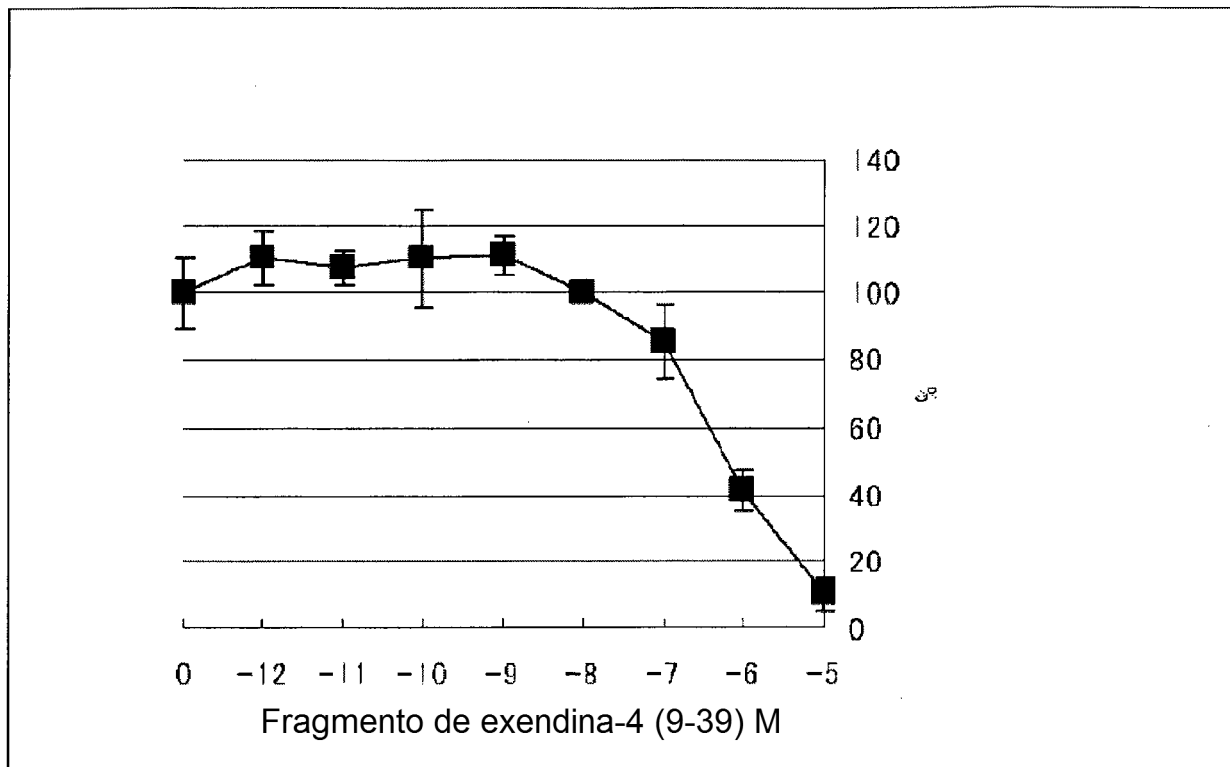


Figura 28

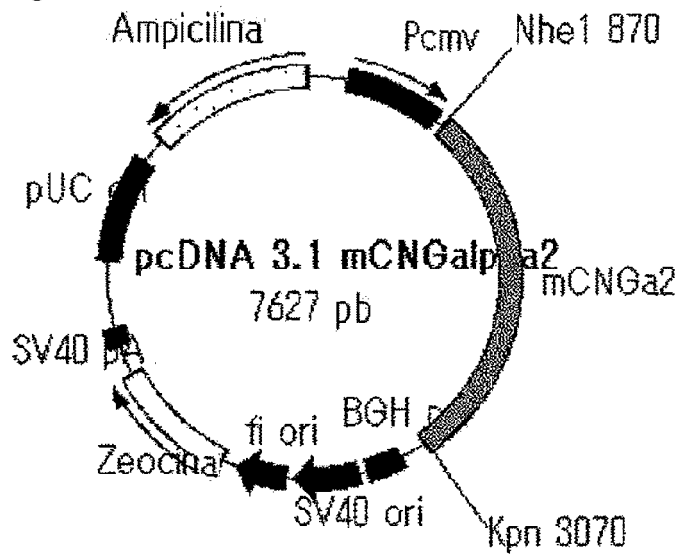


Figura 29

