(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 324 477**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/26 (2006.01)
C12Q 1/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04819231 .4**
(96) Fecha de presentación : **25.11.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1689880**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

(54) Título: **Detección de NO mediante el uso de la producción de guanilil ciclasa y de cGMP como sistema de lectura.**

(30) Prioridad: **26.11.2003 EP 03027159**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.08.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.08.2009

(73) Titular/es:
Boehringer Ingelheim International GmbH
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

(72) Inventor/es: **Büttner, Frank**

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

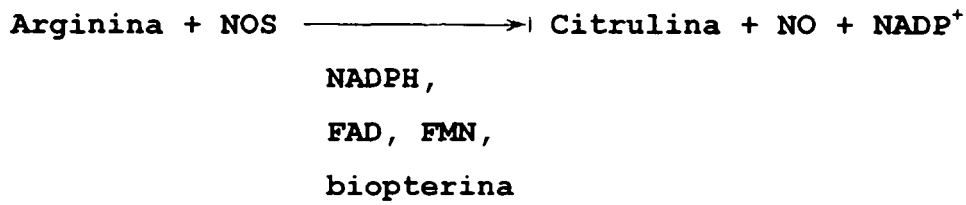
Detección de NO mediante el uso de la producción de guanilil ciclasa y de cGMP como sistema de lectura.

Introducción

La vía L-arginina-óxido nítrico interviene en una gran variedad de procesos fisiológicos (Mayer, B. y otros, 1997; Vallance, P. y otros, 2002; Wendy, K. y otros, 2001), como, por ejemplo, la regulación de la presión sanguínea, la agregación plaquetaria o la defensa del huésped contra agentes patógenos. El óxido nítrico (NO) puede ser producido, por ejemplo, por la sintasa de óxido nítrico (NOS), la cual comprende un grupo de enzimas que existen en tres isoformas distintas de NOS: eNOS, nNOS e iNOS (Janssens, S.P. y otros, 1992; Marsden, P.A. y otros, 1992; Nakane, M. y otros, 1993; Geller, D.A. y otros, 1993; Sherman, P.A. y otros, 1993; Charles, I.G. y otros, 1993; Maier, R. y otros, 1994; Chartrain, N.A. y otros, 1994).

Para influir en enfermedades relacionadas con la actividad de la NOS (p.ej. enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), arterioesclerosis, curación de heridas) es necesario modularla. Por tanto hacen falta sustancias capaces de modular la actividad de la NOS y para ello se necesita, p.ej., un ensayo compatible de máximo rendimiento que sea suficientemente sensible para determinar si una sustancia puede modular la actividad de la NOS.

A continuación se representa la conocida reacción de NOS con arginina, en presencia de NADPH, FAD, FMN y biopterina, que da citrulina, NO y $NADP^+$ (Griffith, O.W. y otros, 1995; Mayer, B. y otros, 1995; Stuehr, D.J. y otros, 1991; Klatt, P. y otros, 1993; Feldmann, P.L. y otros, 1993; Marletta, M.A., y otros, 1994; Pufahl, R.A. y otros, 1993; Clement, B. y otros, 1993;):



Para verificar si la actividad de la NOS ha sido realmente alterada es esencial medirla. Para medir la actividad de un enzima NOS hay que detectar el consumo de arginina, la producción de citrulina o la generación de NO.

Actualmente solo se conocen sistemas de ensayo que son incompatibles con los sistemas de cribado miniaturizados de gran rendimiento. Para la medición de arginina o citrulina solo se dispone de sistemas radiactivos (Mayer y otros, J. Biol. chem. 1998, vol. 273, nº 6, págs. 326A - 327O). Para colmo de males dichos sistemas solo son fidedignos cuando hay grandes dosis de arginina o citrulina y por eso su correspondiente miniaturización no puede dar resultados. Otros sistemas no pueden emplearse en una campaña de cribado, porque hay una sustancia objeto del ensayo que interactúa de forma no específica con sustancias del sistema (Powell D. y Williams D., 2002).

Como el NO solo permanece estable durante pocos segundos no se considera una lectura idónea. Los sistemas de detección de NO comercialmente disponibles han fallado como técnica de lectura en el cribado de alto rendimiento (Misko T.P. y otros 1993).

Para comprobar la actividad de NOS mediante una campaña de alto rendimiento de cribado de fármacos hace falta un formato de ensayo sensible y miniaturizable.

Descripción de la presente invención

Hasta la fecha el óxido nítrico (NO) se consideraba una lectura inadecuada, porque solo es estable durante unos pocos segundos. La presente invención ofrece un método para detectar NO, que es sorprendentemente factible con un nuevo método de detección de la presente invención.

La guanilil ciclasa es una diana fisiológica del NO. La guanilil ciclasa es activada por NO varios cientos de veces. En presencia de GTP una guanilil ciclasa activada de tal modo cataliza la generación de cGMP. Por lo tanto el NO provoca la generación de cGMP. Como se revela en la presente invención, esta transducción de señal puede utilizase sorprendentemente en dirección inversa para la detección cuantitativa de NO.

Hemos establecido un formato de ensayo, compatible con el cribado de alto rendimiento, para detectar la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS), usando guanilil ciclasa y cGMP como sistema de amplificación y lectura en la detección de NO. Nuestro plan de ensayo es el siguiente: para generar NO se utiliza enzima NOS obtenida por expresión recombinante, enzima NOS purificada a partir de una fuente natural o bien se trabaja con un sistema de ensayo de base celular que contenga NOS. La adición de guanilil ciclasa soluble al sistema incrementa la activación del enzima guanilil ciclasa, lo cual provoca la generación de GMP cíclico, que después se detecta con un sistema de detección de cGMP. Como sistemas de detección de cGMP se pueden usar p.ej. los que hay disponibles en el comercio.

Este sistema de detección es absolutamente sensible para el NO, porque la activación de la guanilil ciclasa produce un aumento de cGMP. Como una guanilil ciclasa activada es capaz de generar varias moléculas de cGMP tenemos un efecto amplificador que puede solventar la cuestión de la sensibilidad.

Por lo tanto la presente invención proporciona una base técnica para remediar una carencia que existía hace mucho tiempo: un ensayo para determinar si una sustancia es capaz de modular la actividad de la NOS. Así pues la presente invención también ofrece un ensayo de la actividad de la NOS, que es compatible con un cribado de alto rendimiento (HTS) y que sirve para una campaña de cribado de fármacos.

Según la presente invención, *sintasa de óxido nítrico (NOS)* es un enzima seleccionado de un grupo formado por i-NOS (NO sintasa inducible, II), e-NOS (NO sintasa endotelial, III) y n-NOS (NO sintasa neuronal, I).

Según la presente invención, *actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS)* es la que cataliza la formación de NO por conversión de arginina en citrulina, acompañada del desprendimiento de NO. Según la presente invención, la actividad de la NOS incluye cualquier otro tipo de conversión de cualquier otra sustancia, que genere NO.

Un substrato según la presente invención es cualquier sustancia que puede transformarse mediante NOS en cualquier otra sustancia, siempre que se produzca NO. Una sustancia preferida de la presente invención es la arginina.

Una sustancia sometida a ensayo para comprobar si es un modulador de NOS, según la presente invención, es cualquier molécula química pequeña, péptido o anticuerpo.

Según la presente invención, *un modulador* es un inhibidor o un activador conforme a la presente invención.

Según la presente invención, *un inhibidor* de la actividad de la sintasa de óxido nítrico puede identificarse en un método conforme a la presente invención por un nivel reducido de cGMP, que puede medirse en la solución a la cual se añadió la sustancia sometida a ensayo (en la etapa (c)).

Según la presente invención, *un activador* de la actividad de la sintasa de óxido nítrico puede identificarse en un método conforme a la presente invención por un mayor nivel de cGMP, que puede medirse en la solución a la cual se añadió la sustancia sometida a ensayo (en la etapa (c)).

Un método conforme a la presente invención se caracteriza por las siguientes etapas:

- proporcionar una solución que contenga NO;
- añadir guanilil ciclasa y guanosin trifosfato (GTP) en unas condiciones que permitan la síntesis de guanosin monofosfato cíclico (cGMP);
- medir el cGMP con un anticuerpo capaz de fijarse a cGMP.

Dicho método puede emplearse para detectar NO en solución. Además dicho método puede usarse en un cribado de alto rendimiento. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para detectar óxido nítrico (NO) en un formato de alto rendimiento (HTS) caracterizado por la realización de dicho método. Este método puede llevarse a cabo empleando una placa que tenga como mínimo 96 pocillos, con mayor preferencia una placa de 384 o de 1536 pocillos. También se prefiere el uso de un chip como plataforma de reacción y/o de lectura.

En una forma de ejecución, la presente invención proporciona un método para medir actividad de la sintasa de óxido nítrico, que se caracteriza las siguientes etapas:

(a) proporcionar una solución que contenga una sintasa de óxido nítrico y un substrato adecuado en las condiciones que permitan la síntesis de óxido nítrico;

(b) añadir guanilil ciclasa y GTP en las condiciones que permitan la síntesis de cGMP;

(c) medir el cGMP con un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

Dicho método puede usarse en un cribado de alto rendimiento. Por lo tanto la presente invención proporciona un método para medir la actividad de sintasa de óxido nítrico (NOS) en un formato de alto rendimiento (HTS) caracterizado por la realización de dicho método. Este método puede realizarse usando una placa que tenga como mínimo 96 pocillos, con mayor preferencia una placa de 384 o de 1536 pocillos. También se prefiere el empleo de un chip como plataforma de reacción y/o de lectura.

En otra forma de ejecución, la presente invención proporciona un método para determinar si una sustancia es moduladora de la actividad de sintasa de óxido nítrico conforme a la presente invención, el cual se caracteriza las siguientes etapas:

(a) proporcionar una primera solución que contenga una sintasa de óxido nítrico y un substrato adecuado en las condiciones que permitan la síntesis de óxido nítrico;

(b) proporcionar una segunda solución que contenga una sintasa de óxido nítrico y un substrato adecuado en las condiciones que permitan la síntesis de óxido nítrico;

(c) añadir una sustancia objeto de ensayo a la primera o a la segunda solución;

(d) añadir guanilil ciclasa y GTP en las condiciones que permitan la síntesis de cGMP a la primera y a la segunda solución;

(e) medir cGMP en la primera y en la segunda solución;

(f) comparar los niveles de cGMP de la primera y de la segunda solución, donde un modulador de la actividad de una sintasa de óxido nítrico se identifica por distintos niveles de cGMP.

El método para medir cGMP, según la presente invención, usa un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

Dicho método puede usarse en un cribado de alto rendimiento. Por tanto la presente invención proporciona un método para determinar si una sustancia es un modulador de la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS) en un formato de alto rendimiento (HTS) caracterizado por la realización de dicho método. Este método puede realizarse utilizando una placa que tenga al menos 96 pocillos, con mayor preferencia una placa de 384 o de 1536 pocillos. También se prefiere el empleo de un chip como plataforma de reacción y/o de lectura.

En otra forma de ejecución todos los métodos anteriormente mencionados de la presente invención comprenden además superóxido dismutasa (SOD), que puede añadirse junto con la guanilil ciclasa y el GTP.

Todos los métodos de la presente invención se pueden usar en ensayos de cribado de alto rendimiento.

El método de la presente invención también proporciona un kit para determinar si una sustancia es un modulador -es decir, un activador o un inhibidor- de la actividad de NOS, y lleva:

guanilil ciclasa, GTP y un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

En una forma de ejecución más preferida dicho kit de la presente invención comprende además superóxido dismutasa (SOD).

En una forma de ejecución de máxima preferencia dicho kit de la presente invención lleva además sintasa de óxido nítrico (NOS) escogida de un grupo formado por i-NOS, e-NOS y n-NOS. Este kit puede llevar además superóxido dismutasa (SOD).

En otra forma de ejecución la presente invención también proporciona un kit para medir actividad de sintasa de óxido nítrico (NOS) que comprende: guanilil ciclasa, GTP y un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

En una forma de ejecución más preferida dicho kit de la presente invención comprende además superóxido dismutasa (SOD).

En una forma de ejecución de máxima preferencia dicho kit de la presente invención lleva además sintasa de óxido nítrico (NOS) escogida de un grupo formado por i-NOS, e-NOS y n-NOS. Este kit puede llevar además superóxido dismutasa (SOD).

La presente invención proporciona además otro kit para detectar óxido nítrico (NO), que comprende: guanilil ciclasa, GTP y un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP. En una forma de ejecución más preferida dicho kit de la presente invención comprende además superóxido dismutasa (SOD).

Los siguientes ejemplos están pensados para ilustrar la presente invención, pero no deben interpretarse como limitación. No obstante los ejemplos describen las formas de ejecución más preferidas de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Descripción del ensayo

Detección de la actividad de la NOS mediante el uso de la guanilil ciclasa soluble, un enzima bien conocido desde hace años (Gerzer R. y otros, 1981; Zabel U. y otros, 1998; Hoenicka, M. y otros, 1999; Lee, Y.C. y otros, 2000; Kosarikov, D.N. y otros; 2001). El NO producido por los diferentes enzimas NOS puede activar la guanilil ciclasa

soluble y también su homólogo fijo de membrana. En este tipo de ensayos se puede usar NOS obtenida por expresión recombinante, un lisado celular que contenga NOS, así como NOS purificada a partir de una fuente natural (Janssens, S.P. y otros, 1992; Marsden, P.A. y otros, 1992; Nakane, M. y otros, 1993; Geller, D.A. y otros, 1993; Sherman, P.A. y otros 1993; Charles, I.G. y otros, 1993; Maier, R. y otros, 1994; Chartrain, N.A. y otros, 1994).

Aquí describimos un formato de ensayo no radiactivo y compatible con HTS, que puede emplearse para la detección del NO producido por la acción de la NOS mediante la activación de la guanilil ciclasa y para la detección subsiguiente del cGMP producido, usando la tecnología "AlphaScreen" en un modo de mezcla y medición.

La arginina, como substrato, es convertida en citrulina por cada uno de los tres distintos enzimas NOS. Durante este proceso también se produce NO. Por tanto la detección de NO se puede utilizar para controlar directamente la actividad de los enzimas NOS. Es sabido que el NO puede estimular directamente la guanilil ciclasa soluble. Esta activación provoca un incremento de la producción de cGMP por medio de la guanilil ciclasa activada. El cGMP producido se puede detectar y cuantificar. Para detectar y cuantificar el cGMP recién producido pueden emplearse varias tecnologías diferentes. Estas tecnologías pueden estar basadas, p.ej., en HTRF (Claret E.J. y otros, 2004), en radiactividad (kit de ensayo Flashplate cGMP cíclico-[I^{125}], producto nº SMP002J001PK, de Perkin Elmer), o tal como se indica aquí, en la tecnología "AlphaScreen". En el ensayo de competición de cGMP AlphaScreen se usa un cGMP biotinilado para generar una señal fluorescente. El cGMP biotinilado se fija a la nanosfera AlphaScreen donante mediante estreptavidina y a la nanosfera AlphaScreen aceptora mediante un anticuerpo específico anti-cGMP unido a la superficie de la nanosfera. Si el cGMP está recién producido por la guanilil ciclasa estimulada, compite con la fijación al anticuerpo anti-cGMP. Por tanto la señal fluorescente estándar será atenuada por el cGMP recién producido, que no está biotinilado.

Ejemplo 2

Procedimiento operativo estándar para realizar un ensayo de actividad de la NOS compatible con un HTS de mezcla y medición

Método

En unas placas de 384 pocillos se mezclan 3 μl de un compuesto de ensayo diluido en agua destilada (concentración final de los compuestos 5 μg/ml; DMSO 1%) con 3 μl de mezcla enzimática disuelta en tampón de ensayo (i-NOS final 2-10 μg/ml o e-NOS final 2-10 μg/ml o n-NOS final 2-10 μg/ml, sGC final 1:800 000 - las cantidades indicadas de los respectivos enzimas NOS se refieren a la concentración total de sobrenadante del cultivo celular usado (sistema de expresión recombinante en células de insecto)). Tras un tiempo de incubación de 30 minutos se añaden 3 μl de mezcla de substrato disueltos en tampón de ensayo (GTP final 100 μM, arginina final 3 μM, NADPH final 500 μM, para n-NOS se requiere Ca^{2+} 1 μM y calmodulina 1 μM,). Tras un tiempo de incubación adicional de 90 minutos se detiene la reacción con 10 μl de mezcla nanosfera aceptora y donante-anticuerpo disuelta en tampón de parada/detección (concentración final de cada tipo de nanosfera 15 μg/ml; anticuerpo final 1:15000).

Después de incubar durante la noche, el ensayo se mide p.ej. con un lector Alphaquest (de Perkin Elmer), que registra la fluorescencia a 520-620 nm.

Tampón de ensayo:	Tris 25 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 3 mM, DTT 3 mM, BSA 0,05%, BH_4 3 μM, FAD 1 μM, FMN 1 μM, 4-{[3',4'-(metilendioxi)bencil]amino}-6-metoxiquinazolina 10 μM
Tampón de parada/detección:	Tris 50 mM, EDTA 50 mM pH 7,4, BSA 0,10%, Tween-20 0,10%

Cada microplaca de ensayo lleva pocillos con vehículo de control en vez de compuesto (DMSO al 1% en agua), como referencia de la actividad enzimática no inhibida (100% línea de control; valores altos) y pocillos con AMT 100 μM como referencia de la actividad enzimática inhibida (0% línea de control; valores bajos).

Cada microplaca de ensayo comprende una curva estándar de cGMP (1, 10, 100, 1000, 3000, 10000, 100000, 1000000 pM/I) por duplicado, como referencia para calcular la cantidad de cGMP producida en cada pocillo.

El análisis de los datos se realiza calculando el porcentaje de cGMP en presencia del compuesto de ensayo, comparado con el cGMP generado por el control positivo:

$$(\text{cGMP(muestra)}-\text{cGMP(valor bajo)}) \times 100/(\text{cGMP(valor alto)}-\text{cGMP(valor bajo)})$$

Un inhibidor de la actividad enzimática dará valores entre 100% de control (inhibición nula) y 0% de control (inhibición completa).

Los materiales empleados son bien conocidos en el estado técnico, no obstante se indican a continuación los respectivos proveedores: las placas de 384 pocillos de bajo volumen se adquirieron a Greiner (blanco; nº de cat.

784075). El kit de detección de IgG AlphaScreen (nº de cat. 6760617) y el cGMP biotinilado se compraron a Perkin Elmer. El anticuerpo anti-cGMP (nº de cat. 970161) es de Merck Biosciences. Los diferentes enzimas NOS - i-NOS (nº de cat. 201-069), e-NOS (nº de cat. 201-070) y n-NOS (nº de cat. 201-068), la sGC (nº de cat. 201-177) y la L-arginina (nº de cat. 101-004) fueron de Alexis. El NADPH (nº de cat. N-6005) y el GTP (nº de cat. G-5884) se adquirieron a Sigma. Todos los demás materiales eran del mayor grado de pureza comercialmente disponible.

Ejemplo 3

Procedimiento operativo estándar para realizar un ensayo de actividad de la NOS compatible con un HTS de mezcla y medición, optimizado por adición de otro enzima a la mezcla reactiva, la superóxido dismutasa (SOD)

A continuación se revela otra variante del ensayo de la presente invención, en la cual se ha agregado un enzima a la mezcla de reacción. La superóxido dismutasa (SOD) (Keele Jr. B. B. y otros, 1970; Beckman J. S. y otros, 1990) aumenta la sensibilidad del sistema de ensayo y por tanto reduce la cantidad de enzima NOS necesaria para efectuar el ensayo.

Método

En unas placas de 384 pocillos se mezclan 3 μl de los compuestos de ensayo diluidos en agua destilada (concentración final de los compuestos 5 μg/ml; DMSO 1%) con 3 μl de mezcla enzimática disuelta en tampón de ensayo (i-NOS final 2 μg/ml, e-NOS 5 μg/ml, n-NOS 0,4 μg/ml, SOD final 300 nM, sGC final 1:800 000 - las cantidades indicadas de los respectivos enzimas NOS se refieren a la concentración total de sobrenadante del cultivo celular usado (sistema de expresión recombinante en células de insecto)). Tras un tiempo de incubación de 30 minutos se añaden 3 μl de mezcla de substrato disueltos en tampón de ensayo (GTP final 100 μM, arginina final 3 μM, NADPH final 500 μM, para n-NOS se requiere Ca^{2+} 1 μM y calmodulina 1 μM,). Tras un tiempo de incubación adicional de 90 minutos se detiene la reacción con 10 μl de mezcla nanosfera aceptora y donante-anticuerpo disuelta en tampón de parada/detección (concentración final de cada tipo de nanosfera 15 μg/ml; anticuerpo final 1:15000).

Después de incubar durante la noche, el ensayo se mide p.ej. con un Alphaquest (tal como se ha señalado en el ejemplo 2).

Tampón de ensayo:	Tris 25 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 3 mM, DTT 3 mM, BSA 0,05%, BH_4 3 μM, FAD 1 μM, FMN 1 μM, 4-{[3',4'-(metilendioxi)bencil]amino}-6-metoxiquinazolina 10 μM
Tampón de parada/detección:	Tris 50 mM, EDTA 50 mM pH 7,4, BSA 0,10%, Tween-20 0,10%

Cada microplaca de ensayo lleva pocillos con vehículo de control en vez de compuesto (DMSO al 1% en agua), como referencia de la actividad enzimática no inhibida (100% línea de control; valores altos) y pocillos con AMT 100 μM como referencia de la actividad enzimática inhibida (0% línea de control; valores bajos).

Cada microplaca de ensayo comprende una curva estándar de cGMP (1, 10, 100, 1000, 3000, 10000, 100000, 1000000 pM/I) por duplicado, como referencia para calcular la cantidad de cGMP producida en cada pocillo.

El análisis de los datos se realiza calculando el porcentaje de cGMP en presencia del compuesto de ensayo, comparado con el cGMP generado por el control positivo:

(cGMP(muestra)-cGMP(valor bajo)) x 100/(cGMP(valor alto)-cGMP(valor bajo))

Un inhibidor de la actividad enzimática dará valores entre 100% de control (inhibición nula) y 0% de control (inhibición completa).

Ejemplo 4

Estimulación de guanilil ciclasa soluble y detección subsiguiente de cGMP

El mecanismo fundamental de la estimulación de la guanilil ciclasa soluble puede demostrarse empleando un compuesto dador de NO, como por ejemplo DEA NONOato u otros como DETA NONOato, DPTA NONOato, GEA 5024 o GEA 3162 (Drago R.S. & Paulik F.E., 1960; Drago R.S. & B.R. Karstetter B.R. 1961; Maragos, C.M. y otros, 1991; Wink D.A. y otros 1991; Hrabie, y otros 1993; Robak y otros, 1992; Moilanen E. y otros 1993; Corell T. y otros 1994; Karup G. y otros 1994; Malo-Ranta U. y otros 1994; Ma H.T. y otros 1999). Este tipo de compuestos producen NO, que es capaz de estimular la guanilil ciclasa soluble y ésta conduce a la producción de cGMP. La figura 1 representa la producción de cGMP tras la estimulación de la guanilil ciclasa soluble con DEA NONOato, dependiendo de la dosis. Para detectar el cGMP se usó un ensayo de competición AlphaScreen.

Ejemplo 5

Inhibición de diferentes enzimas NOS mediante el uso de inhibidores estándar

La tabla 1 resume los resultados obtenidos, utilizando los ensayos descritos anteriormente y probando inhibidores de NOS estándar.

enzima	**AMT [µM]**	**ODQ [µM]**	**L-NMMA [µM]**	**1400W [µM]**	**L-NIL [µM]**
iNOS	$1,3 \times 10^{-8}$	$7,7 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-6}$	$9,7 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-6}$
eNOS	$9,9 \times 10^{-8}$	$5,8 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,7 \times 10^{-5}$
nNOS	$3,1 \times 10^{-8}$	$9,0 \times 10^{-7}$	$7,9 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$2,8 \times 10^{-4}$

En la tabla 1 se indica: determinación IC50 [μM] de distintos compuestos para los diferentes enzimas NOS.

Los inhibidores de NOS arriba citados forman parte del estado técnico, tal como indica a continuación:

AMT: **Nakane**, M. y otros, 1995; **Tracey**, W.R. y otros, 1995; **Rairigh**, R.L. y otros 1998; **Briones**, A-M. y otros, 1999;

ODQ: **Boulton**, C. L. y otros, 1995; **Brunner**, F. y otros, 1995; **Garthwaite**, J y otros, 1995; **Moro**, M.A. y otros, 1996; **Schrammel**, A. y otros, 1996; **Southam**, E. y otros, 1996; **Abi-Gerges**, N. y otros, 1997; **Olson**, L.J, y otros, 1997; **Sobey** C.G. & **Faraci** F.M. 1997; **Hwang**, T.L. y otros, 1998; R. **Motterlini**, y otros, 2000;

L-NMMA: **Sakuma**,I. y otros, 1988; *Rees*, D.D. y otros, 1989;

1400W: **Garvey**, E.P y otros, 1997; **Thomsen**, L.L. y otros, 1997; **Laszlo** F. & **Whittle** B.J.R, 1997; **Gumpricht**, E. y otros, 2002;

L-NIL: **Moore**, W.M. y otros, 1994.

Literatura

Meyer B. y **Hemmens** B. (1997): Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells [*Biosíntesis y acción del óxido nítrico en células de mamíferos*] *Trends Biochem. Sci*. 22, 477-481.

Patrick **Vallance** y James **Leiper**: Blocking NO Synthesis: How, where and why? [*Bloqueo de la síntesis de NO: ¿cómo, dónde y por qué?*] *Nature Reviews/Drug Discovery*, Volume 1 December 2002, 939-950.

Wendy K. **Alderton**, Chris E. **Cooper** y Richard G. **Knowles**: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition [*Sintasas de óxido nítrico: estructura, función e inhibición*] *Biochem. J.* (2001) 357, 593-615.

Janssens SP. **Shimouchi** A. **Quertermous** T. **Bloch** DB. **Bloch**, KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase [*Clonación y expresión de un ADNc que codifica sintasa de óxido nítrico como factor relajante derivado del endotelio humano*]. *Journal of Biological Chemistry* 267 (21):14519-22, 1992 Jul 25.

Marsden PA. **Schappert** KT. **Chen** HS. **Flowers** M. **Sundell** CL. **Wilcox** JN. **Lamas** S. **Michel** T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase [*Clonación y caracterización molecular de sintasa de óxido nítrico endotelial humana*]. *FEBS Letters*. Vol. 307(3) (pp 287-293), 1992.

Nakane M. **Schmidt** HHHW. **Pollock** JS. **Forstermann** U. **Murad** F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle [*La sintasa de óxido nítrico cerebral clonada se expresa ampliamente en músculo esquelético*]. *FEBS Letters*. Vol. 316(2) (pp 175-180), 1993.

Geller DA. **Lowenstein** CJ. **Shapiro** RA. **Nussler** AK. **Di Silvio** M. **Wang** SC. **Nakayama** DK. **Simmons** RL. **Snyder** SH. **Billiar** TR. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes [*Clonación molecular y expresión de sintasa de óxido nítrico inducible a partir de hepatocitos humanos*]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 90(8) (pp 3491-3495), 1993.

Sherman PA. **Laubach** VE. **Reep** BR. **Wood** ER. Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line [*Purificación y secuencia ADNc de una sintasa de óxido nítrico inducible a partir de una línea celular tumoral humana*]. *Biochemistry*. Vol. 32(43) (pp 11600-11605), 1993.

Charles IG. **Palmer** RMJ. **Hickery** MS. **Bayliss** MT. **Chubb** AP. **Hall** VS. **Moss** DW. **Moncada** S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte [*Clonación, caracterización y expresión de un ADNc codificador de una sintasa de óxido nítrico inducible a partir de condrocito humano*]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 90(23) (pp 11419-11423), 1993.

Maier R. **Bilbe** G. **Rediske** J. **Lotz** M. Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expresión [*Sintasa de óxido nítrico inducible a partir de condrocitos articulares humanos: clonación de ADNc y análisis de la expresión de ARNm*]. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & Molecular Enzymology*. Vol. 1208(1) (pp 145-150), 1994.

Chartrain NA. **Geller** DA. **Koty** PP. **Sitrin** NF. **Nussler** AK. **Hoffman** EP. **Billiar** TR. **Hutchinson** NI. **Mudgett** JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene [*Clonación molecular, estructura y localización cromosómica del gen de la sintasa de óxido nítrico inducible*]. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 269(9) (pp 6765-6772), 1994.

Griffith OW. **Stuehr** DJ. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism [*Sintasas de óxido nítrico: propiedades y mecanismo catalítico*]. *Annual Review of Physiology*. Vol. 57 (pp 707-736), 1995.

Mayer, B.: Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases, in Nitric Oxide in the Nervous System [*Bioquímica y farmacología molecular de sintasas de óxido nítrico en: Óxido nítrico en el sistema nervioso*] (S.R. Vincent, ed.), *Academic*, New York, 21-42, 1995.

Masters BSS. **McMittan** K. **Sheta** EA. **Nishimura** JS. **Roman** LJ. **Martasek** P. Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: Structure studies of a cysteine thiolate-liganded heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal [*Sintasa de óxido nítrico neuronal, un enzima modular formado por evolución convergente: estudios estructurales de una hemoproteína con ligando tiolato-cisteína que hidroxila L-arginina para producir NO como señal celular*]. *FASEB Journal*. Vol. 10(5) (pp 552-558), 1996.

Marletta MA. **Yoon** PS. **Iyengar** R. **Leaf** CD. **Wishnok** JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate [*Oxidación macrofágica de L-arginina a nitrito y nitrato: el óxido nítrico es un intermedio*]. *Biochemistry*. Vol. 27(24) (pp 8706-8711), 1988.

Kwon NS. **Nathan** CF. **Gilker** C. **Griffith** OW. **Matthews** DE. **Stuehr** DJ. L-Citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen [*Producción de L-citrulina a partir de L-arginina por sintasa de óxido nítrico macrofágica. El oxígeno ureido proviene del dioxígeno*]. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 265(23) (pp 13442-13445), 1990.

Mayer B. **John** M. **Heinzel** B. **Werner** ER. **Wachter** H. **Schultz** G. **Bohme** E. Brain nitric oxide synthase is a biopterinand flavin-containing multi-functional oxido-reductase [*La sintasa de óxido nítrico cerebral es una óxido-reductasa multifuncional que contiene flavina biopterinante*]. *FEBS Letters*. Vol. 288(1-2) (pp 187-191), 1991.

Stuehr DJ. **Kwon** NS. **Nathan** CF. **Griffith** OW. **Feldman** PL. **Wiseman** J. N(omega)-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine [*La N(omega)-hidroxi-L-arginina es un intermedio en la biosíntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina*]. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 266(10) (pp 6259-6263), 1991.

Klatt P. **Schmidt** K. **Uray** G. **Mayer** B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N(omega)-hydroxy-L- arginine as an intermediate [*Funciones catalíticas múltiples de la sintasa de óxido nítrico cerebral. Caracterización bioquímica, requerimiento de cofactor y papel de la N(omega)-hidroxi-L-arginina como intermedio*]. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 268(20) (pp 14781-14787), 1993.

Feldmann PL. **Griffith** OW. and **Stuehr** DJ.: The surprising life of nitric oxide [*La sorprendente vida del óxido nítrico*]. *Chem. Eng. News* 71, 26-38, 1993.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis [*Sintasa de óxido nítrico: aspectos estructurales y catalíticos*]. *Cell*. Vol. 78(6) (pp 927-930), 1994.

Pufahl RA. **Marletta** MA. Oxidation of N(G)-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase: Evidence for the involvement of the heme in catalysis [*Oxidación de N(G)-hidroxi-L-arginina mediante sintasa de óxido nítrico: prueba de la participación del hemo en la catálisis*]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. Vol. 193(3) (pp 963-970), 1993.

Clement B. **Schultze-Mosgau** M-H. **Wohlers** H. Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide [*N-hidroxilación de una guanidina (debrisoquina) dependiente del citocromo P450, reducción por catálisis microsómica y posterior oxidación del metabolito N-hidroxiguanidina al derivado de urea. Similitud con la oxidación de arginina a citrulina y óxido nítrico*]. *Biochemical Pharmacology*. Vol. 46 (12) (pp 2249-2267), 1993.

Powell D., **Williams** D. Nitric Oxide Synthase Screening Kit for the detection of inhibitors of NOS enzyme activity [*Kit de cribado con sintasa de óxido nítrico para detectar inhibidores de la actividad de enzimas NOS*] *Life Science News*, 2002 Amersham Biosiences.

Misko T.P., **Schilling** R.J., **Salvemini** D., **Moore** W.M., **Currie** M.G. A; A Fluorometric Assay for the Measurement of Nitrate in Biological Samples [*Ensayo fluorométrico para la medición de nitrato en muestras biológicas*] *Analytical Biochemistry* 214, 11-16 1993.

Gerzer R., y otros; Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper [*La guanilato ciclasa soluble purificada de pulmón bovino contiene hemo y cobre*]; *FEBS Lett*. 132, 71 (1981).

Zabel U., y otros; Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family [*Guanilato ciclasa soluble humana: expresión funcional y familia isoenzimática revisada*]; *Biochem. J.* 335 (Pt 1), 51 (1998).

Hoenicka, M. y otros; Purified soluble guanylyl cyclase expressed in a baculovirus/Sf9 system: stimulation by YC-1, nitric oxide and carbon monoxide [*Guanilil ciclasa soluble purificada, expresada en un sistema báculovirus/Sf9: estimulación por YC-1, óxido nítrico y monóxido de carbono*]; *J. Mol. Med*. 77, 14 (1999).

Lee, Y.C. y otros; Human recombinant soluble guanylyl cyclase: expression, purification and regulation [*Guanilil ciclasa soluble humana recombinante: expresión, purificación y regulación*]; PNAS 97, 10763 (2000).

Kosarikov, D.N. y otros; Human soluble guanylate cyclase: functional expression, purification and structural characterization [*Guanilil ciclasa soluble humana: expresión funcional, purificación y caracterización estructural*]; *Arch. Biochem. Biophys*. 388, 185 (2001).

Claret E.J., y otros; A new HTRF cGMP assay for monitoring Guanylyl cyclase activity [*Nuevo ensayo HTRF de cGMP para controlar actividad de guanilil ciclasa*]; Presentación gráfica en el SBS Meeting de Orlando (2004).

Perkin Elmer: Flashplate cyclic cGMP [125I]-assay product no: SMP002J001PK [*kit de ensayo Flashplate cGMP cíclico-[I^{125}], producto nº SMP002J001PK*] **Keele**, B.B. Jr. y otros; Superoxide Dismutase from *Escherichia coli* B [*Superóxido dismutasa de Escherichia coli B*]; *JBC* Vol.245, No. 22, pp 6176-6181 (1970).

Beckman J. S. y otros; Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [*Producción aparente de radicales hidroxilo por peroxinitrito: implicaciones en la lesión endotelial ocasionada por óxido y superóxido de nitrógeno*]; *Proc. Natl. Acad. Sci* USA Vol 87, pp. 1620-1624 (1990).

Drago R.S. & **Paulik** F.E.; The Reaction of Nitrogen(II) Oxide with Diethylamine [*La reacción del óxido de nitrógeno(II) con dietilamina*]; *JACS* 82, 96 (1960).

Drago R.S. & B.R. **Karstetter** B.R.; The Reaction of Nitrogen(II) Oxide with Various Primary and Secondary Amines [*La reacción del óxido de nitrógeno(II) con varias aminas primarias y secundarias*]; *JACS* 83, 1819 (1961).

Maragos, C.M. y otros; Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects [*Complejos de NO con nucleófilos, como agentes de liberación biológicamente controlada de óxido nítrico. Efectos vasorrelajantes*]; *J. Med. Chem*. 34, 3242 (1991).

Wink D.A., y otros; DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors [*Capacidad desaminadora del ADN y genotoxicidad del óxido nítrico y de sus precursores*]; *Science* 254, 1001 (1991).

Hrabie, y otros; New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines [*Nuevos zwitteriones liberadores de óxido nítrico derivados de poliaminas*]; *JOC* 58, 1472 (1993).

Robak, y otros; *Pharmacol. Res*. 25 S2, 355 (1992).

Moilanen, E: y otros; Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions [*Inhibición por donantes de óxido nítrico de las funciones de los leucocitos polimorfonucleares humanos*]; *Br. J. Pharmacol*. 109, 852 (1993).

Corell, T. y otros; Pharmacology of mesoionic oxatriazole derivatives in blood, cardiovascular and respiratory systems [*Farmacología de los derivados mesoiónicos de oxatriazol en los sistemas sanguíneo, cardiovascular y respiratorio*]; *Pol. J. Pharmacol*. 46, 553 (1994).

Karup, G. y otros; Mesoionic oxatriazole derivatives-a new group of NO-donors [*Derivados mesoiónicos de oxatriazol - un nuevo grupo de donantes de NO*]; *Pol. J. Pharmacol*. 46, 541 (1994).

Malo-Ranta, U. y otros; Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein [*El donante de óxido nítrico GEA 3162 inhibe la oxidación de lipoproteína de baja densidad mediada por células endoteliales*]; *FEBS Lett*. 337, 179 (1994).

Ma, H.T. y otros; Ca(2+) entry activated by S-nitrosylation. Relationship to store-operated Ca(2+) entry [*Entrada de Ca(2+) activada por S-nitrosilación. Relación con la entrada de Ca(2+) regulada por depósitos intracelulares*]; *J. Biol. Chem*. 274, 35318 (1999).

Nakane, M. y otros; Novel potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase [*Nuevos inhibidores potentes y selectivos de la sintasa de óxido nítrico inducible*]; *Mol. Pharmacol*. 47, 831 (1995).

Tracey, W.R. y otros; *in vivo* pharmacological evaluation of two novel type II (inducible) nitric oxide synthase inhibitors [*Evaluación farmacológica* in vivo *de dos nuevos inhibidores de sintasa de óxido nítrico del tipo II (inducible)*]; *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 73, 665 (1995).

Rairigh, R.L. y otros; Role of inducible nitric oxide synthase in regulation of pulmonary vascular tone in the late gestation ovine fetus [*Papel de la sintasa de óxido nítrico inducible en la regulación del tono vascular pulmonar durante la gestación avanzada del feto ovino*]; *J. Clin. Invest*. 101, 15 (1998).

Briones, A-M. y otros; Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats [*Papel de la iNOS en las respuestas vasodilatadoras inducidas por L-arginina en la arteria cerebral media de ratas normo-tensivas e hipertensivas*]; *Br. J. Pharmacol*. 126, 111 (1999).

Boulton, C. L. y otros; Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl ciclase [*La potenciación prolongada dependiente de óxido nítrico es bloqueada por un inhibidor específico de guanilil ciclasa soluble*]; *Neuroscience* 69, 699 (1995).

Brunner, F. y otros; Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion [*Nuevo inhibidor de guanilil ciclasa, la ODQ revela el papel del óxido nítrico, pero no del GMP cíclico, en la secreción de endotelina-1*]; *FEBS Lett*. 376, 262 (1995).

Garthwaite, J y otros; Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one [*Inhibición potente y selectiva de guanilil ciclasa sensible al óxido nítrico mediante 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona*]; *Mol. Pharmacol*. 48, 184 (1995).

Moro, M.A. y otros; cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase [*El cGMP vehicula la acción vascular y plaquetaria del óxido nítrico: confirmación mediante el empleo de un inhibidor de la guanilil ciclasa soluble*]; *PNAS* 93, 1480 (1996).

Schrammel, A. y otros; Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase [*Identificación de la 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-ona como inhibidor de sitio hemo de guanilil ciclasa sensible a óxido nítrico*]; *Mol. Pharmacol*. 50, 1 (1996).

Southam, E. y otros; The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic plasticity in the rat superior cervical ganglion [*La vía óxido nítrico-GMP cíclico y plasticidad sináptica en el ganglio cervical superior de rata*]; *Br. J. Pharmacol*. 119, 527 (1996).

Abi-Gerges, N. y otros; A comparative study of the effects of three guanylyl cyclase inhibitors on the L-type Ca2+ and muscarinic K+ currents in frog cardiac myocytes [*Estudio comparativo de los efectos de tres inhibidores de guanilil ciclasa sobre las corrientes de Ca2+ tipo L y las corrientes muscarínicas de K+ en miocitos cardíacos de rana*]; *Br. J. Pharmacol*. 121, 1369 (1997).

Olson, L.J, y otros; Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation [*Inhibidor selectivo de guanilil ciclasa que invierte la vasorrelajación inducida por óxido nítrico*]; *Hypertension* 29, 254 (1997).

Sobey C.G. & **Faraci** F.M.; Effects of a novel inhibitor of guanylyl cyclase on dilator responses of mouse cerebral arterioles [*Efectos de un nuevo inhibidor de guanilil ciclasa en las respuestas dilatadoras de arteriolas cerebrales de ratón*]; *Stroke* 28, 837 (1997).

Hwang, T.L. y otros; Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea [*Comparación de dos inhibidores de la guanilil ciclasa soluble, azul de metileno y ODQ, en la relajación inducida por nitroprusiato en tráquea de cobaya*]; *Br. J. Pharmacol* 125, 1158 (1998).

Motterlini, R y otros; Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols [*Inducción por hipoxia de la hemo-oxigenasa-1 endotelial. Modulación mediante sintasa de óxido nítrico inducible y S-nitrosotioles*]; *J. Biol. Chem*. 275, 13613 (2000).

Sakuma,I. y otros; Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor [*Identificación de arginina como precursor del factor relajante derivado de endotelio*]; *PNAS* 85, 8664 (1988).

Rees, D.D. y otros; A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation [*Inhibidor específico de la formación de óxido nítrico a partir de L-arginina, que atenúa la relajación dependiente del endotelio*]; *Br. J. Pharmacol*. 96, 418 (1989).

Garvey, E.P y otros; 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo* [*El 1400W es un inhibidor lento, de fuerte fijación y muy selectivo,* in vitro *e* in vivo*, de la sintasa de óxido nítrico inducible*]; *J. Biol. Chem*. 272, 4959 (1997).

Thomsen, L.L. y otros; Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth *in vivo*: studies with 1400W, a novel inhibitor [*La inhibición selectiva de sintasa de óxido nítrico inducible inhibe el crecimiento tumoral* in vivo*: estudios con 1400W, un nuevo inhibidor*]; *Cancer Res*. 57, 3300 (1997).

Laszlo F. & **Whittle** B.J.R.; Actions of isoform-selective and non-selective nitric oxide synthase inhibitors on endotoxininduced vascular leakage in rat colon [*Efectos de los inhibidores isoformo-selectivos y no selectivos de la sintasa de óxido nítrico en el derrame vascular inducido por endotoxinas en colon de rata*]; *Eur. J. Pharmacol*. 334, 99 (1997).

Gumpricht, E. y otros; Nitric Oxide Ameliorates Hydrophobic Bile Acid-induced Apoptosis in Isolated Rat Hepatocytes by Non-mitochondrial Pathways [*El óxido nítrico mejora la apoptosis inducida por ácidos biliares hidrófobos en hepatocitos aislados de rata por vías no-mito-condriales*]; *J. Biol. Chem*. 277, 25823 (2002).

Moore, W.M. y otros; L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase [*L-N6-(1-iminoetil)lisina: un inhibidor selectivo de sintasa de óxido nítrico inducible*]; *J. Med. Chem*. 37, 3886 (1994).

Descripción de la figura 1

La figura 1 representa un ensayo dosis-respuesta de la capacidad del donante de NO sintético DEA NONOato para estimular guanilil ciclasa soluble y la detección de la subsiguiente producción de cGMP mediante guanilil ciclasa, usando el ensayo de competición de cGMP AlphaScreen señalado en el ejemplo 4.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir actividad de la sintasa de óxido nítrico, que es apropiado para un formato de ensayo del tipo cribado de alto rendimiento (HTS), **caracterizado** porque consiste en:

(a) proporcionar una solución que contenga una sintasa de óxido nítrico y un substrato adecuado en las condiciones que permitan la síntesis de óxido nítrico;

(b) añadir guanilil ciclasa y GTP en las condiciones que permitan la síntesis de cGMP;

(c) medir el cGMP con un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

2. Un método para determinar si una sustancia es moduladora de la actividad de sintasa de óxido nítrico, que es apropiado para un formato de ensayo del tipo cribado de alto rendimiento (HTS), **caracterizado** porque consiste en:

(a) proporcionar una primera solución que contenga una sintasa de óxido nítrico y un substrato adecuado en las condiciones que permitan la síntesis de óxido nítrico;

(b) proporcionar una segunda solución que contenga una sintasa de óxido nítrico y un substrato adecuado en las condiciones que permitan la síntesis de óxido nítrico;

(c) añadir una sustancia objeto de ensayo a la primera o a la segunda solución;

(d) añadir guanilil ciclasa y GTP en las condiciones que permitan la síntesis de cGMP a la primera y a la segunda solución;

(e) medir cGMP con un anticuerpo capaz de detectar cGMP en la primera y en la segunda solución;

(f) comparar los niveles de cGMP de la primera y de la segunda solución, donde un modulador de la actividad de una sintasa de óxido nítrico se identifica por distintos niveles de cGMP.

3. Un método para detectar óxido nítrico (NO), apropiado para un formato de ensayo del tipo cribado de alto rendimiento (HTS), **caracterizado** porque consiste en:

(a) proporcionar una solución que contenga NO;

(b) añadir guanilil ciclasa y guanosin trifosfato (GTP) en las condiciones que permitan la síntesis de guanosin monofosfato cíclico (cGMP);

(c) medir cGMP con un anticuerpo capaz de detectar cGMP.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que el substrato es arginina.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en que la sintasa de óxido nítrico está seleccionada de un grupo formado por: i-NOS, e-NOS y n-NOS.

6. Un método según la reivindicación 2, donde el modulador es un inhibidor de la actividad de la sintasa de óxido nítrico y un inhibidor se identifica por un nivel reducido de cGMP que puede medirse en la solución a la cual se añadió la sustancia en la etapa (c).

7. Un método según la reivindicación 2, donde el modulador es un activador de la actividad de la sintasa de óxido nítrico y un activador se identifica por un mayor nivel de cGMP, que puede medirse en la solución a la cual se añadió la sustancia en la etapa (c).

8. Un método según la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, cuyo formato es de alto rendimiento (HTS).

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7 u 8, **caracterizado** porque se añade superóxido dismutasa junto con la guanilil ciclasa y el GTP.

10. Un método según la reivindicación 8, en que se usa una placa que tiene como mínimo 96 pocillos.

11. Un método según la reivindicación 10, en que se usa una placa de 384 o de 1536 pocillos.

12. Un método según la reivindicación 8, en que se usa un chip como plataforma de reacción y/o de lectura.

13. Uso de un método según una de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 en un cribado de alto rendimiento.

14. Un kit para determinar si una sustancia es un modulador de la actividad de NOS, que comprende

(a) guanilil ciclasa

(b) GTP, y

(c) un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

15. Un kit para medir actividad de sintasa de óxido nítrico (NOS), que comprende

(a) guanilil ciclasa

(b) GTP, y

(c) un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

16. Un kit para detectar óxido nítrico (NO), que comprende

(a) guanilil ciclasa

(b) GTP, y

(c) un anticuerpo capaz de fijarse al cGMP.

17. Un kit según la reivindicación 14 o 15, que comprende adicionalmente una sintasa de óxido nítrico (NOS) escogida del grupo formado por: i-NOS, e-NOS y n-NOS.

18. Un kit según la reivindicación 14, 15, 16 o 17, que comprende adicionalmente superóxido dismutasa.

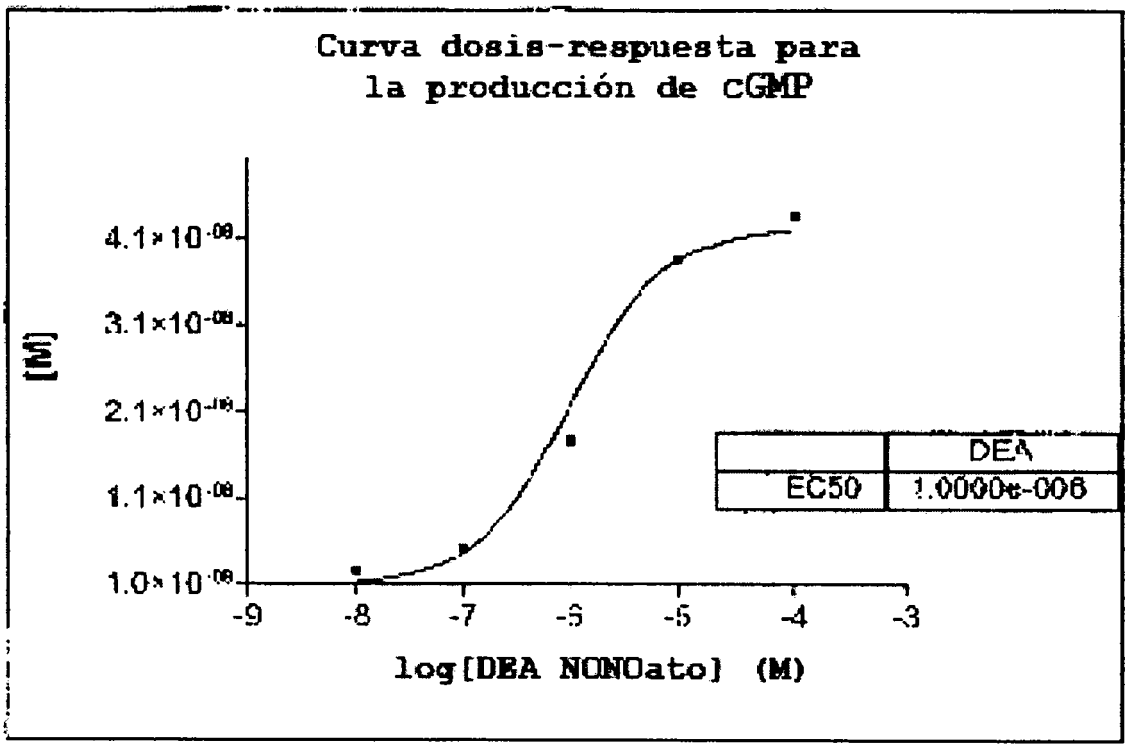

Curva dosis-respuesta para
la producción de cGMP
[M]
4.1×10
3.1×10
2.1×10
1.1×10
1.0×10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
-3
log[DEA NONOato] (M)
DEA
EC50
1.0000e-006

Figura 1