



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 026**

51 Int. Cl.:

G01N 33/557 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

C07C 229/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03748170 .2**

86 Fecha de presentación : **16.06.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1514112**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54

Título: **Procedimiento de identificación de efectores alostéricos de un receptor.**

30

Prioridad: **17.06.2002 FR 02 07436**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73

Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel Ange
75974 Paris, FR
Universite Louis Pasteur de Strasbourg**

72

Inventor/es: **Galzi, Jean-Luc;
Hibert, Marcel;
Bourguignon, Jean-Jacques y
Maillet, Emeline**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 273 026 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

Procedimiento de identificación de efectores alostéricos de un receptor.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para identificar un efector alostérico de un receptor.

Numerosos medicamentos y sustancias naturales ejercen su acción interaccionando con proteínas reguladoras, denominadas receptores, implicadas en numerosas funciones fisiológicas de los organismos, y las alteraciones de sus funciones son la causa de numerosas patologías.

Entre las moléculas que actúan uniéndose a receptores, una categoría particular, denominada efectores alostéricos o moduladores, ejerce su efecto uniéndose a sitios presentes en la superficie de los receptores, pero topológicamente distintos del sitio de unión del ligando endógeno. Sus interacciones con el receptor es de naturaleza no competitiva con relación a aquella del ligando endógeno. Uniéndose a sus sitios reguladores, los efectores no tienen o tienen poco efecto sobre las respuestas del receptor en ausencia de ligando endógeno. Sin embargo, estos modifican las propiedades de unión de los ligandos endógenos competitivos y alteran las respuestas biológicas originadas por dicho ligando.

Los efectores alostéricos presentan un interés particular en el campo terapéutico debido a que su acción no es "constitutiva", sino que se revela únicamente cuando el ligando endógeno estimula el receptor. En los casos en los que tales moléculas se pudieron identificar y comercializar, el bienestar del paciente y la selectividad del efecto siempre han sido mejorados, por ejemplo, en comparación con el efecto observado en la administración de un agonista (Pan *et al.*, 2001).

A fin de identificar nuevos efectores alostéricos de receptores, se han desarrollado ahora varios enfoques experimentales, especialmente las mediciones de unión de un ligando a su receptor y las mediciones funcionales de respuestas fisiológicas.

Entre los métodos de medida de unión, se estudió la cinética de disociación de un radioligando. Tal como se describe en Kostenis y Mohr (1996), la modulación alostérica se demuestra, más generalmente, mediante un efecto del efector alostérico sobre la cinética de disociación de un radioligando. Se implementó este método para demostrar el carácter no competitivo (por lo tanto alostérico) de moléculas que regulan los receptores M1 a M5 muscarínicos de la acetilcolina (Tucek y Poska, 1995), A1 de la adenosina (Bruns & Ferguns, 1990), alfa2 de la adrenalina (Nunnari *et al.*, 1987), o D2 de la dopamina (Hoare & Strange, 1995). En estos diferentes ejemplos, se usaron, indiferentemente, agonistas o antagonistas como radioligandos, y se definió el carácter positivo o negativo del modulador mediante su capacidad para acelerar (positivo) o ralentizar (negativo) la velocidad de disociación del radioligando usado.

El segundo enfoque más extendido de identificación de un efector alostérico consiste en medir la cantidad de complejo radioligando/receptor con una concentración subsaturante de radioligando. En estas condiciones, el hecho de que una tercera molécula provoque un aumento de la cantidad de complejo radioligando/receptor se interpreta en términos de potenciación de la unión mediante un efecto alostérico. El trabajo de Bruns y Ferguns, citado más arriba, ilustra este punto cuando se usa un radioligando agonista, mientras que el artículo de Jakubik *et al.* (1997) usa un antagonista radioactivo.

El tercer enfoque experimental consiste en establecer la curva de saturación de un radioligando en presencia y en ausencia de efector alostérico. En este caso, que se ilustra en el artículo de Massot *et al.* (1996) para el receptor 5HT1B de la serotonina, el efector 5HT-modulina reduce la cantidad de sitios receptores sin afectar a la afinidad aparente determinada para el radioligando usado.

Las medidas de la respuesta biológica originada por un ligando de receptor comprenden su activación (mediante agonistas), o bien su inhibición (mediante antagonistas). Estas medidas valoran generalmente una variación de amplitud de las respuestas que están potenciadas mediante los efectores positivos, o inhibidas mediante los efectores negativos de la respuesta, e incluyen:

- la monitorización de corrientes iónicas mediante métodos electrofisiológicos (Krause *et al.*, 1997; Galzi *et al.*, 1996) o mediante métodos ópticos que usan sondas específicas de iones (Birdsall *et al.*, 1999),
- la medida de la producción de mensajeros secundarios tales como AMPc (Bruns y Ferguns, 1990) o de fosfatos de inositol (Waugh *et al.*, 1999),
- la unión de GTP a la proteína G asociada al receptor (Birdsall *et al.*, 1999; Lazareno y Birdsall, 1995; Hoare *et al.*, 2000) o la hidrólisis de GTP mediante la proteína G asociada al receptor (Birdsall *et al.*, 1999). Rees *et al.*, 2002, vol. 8, nº 5-6, páginas 261-268, presentan un resumen de las distintas técnicas de identificación de un efecto alostérico.

La técnica de transferencia de energía de fluorescencia (FRET), en combinación con el uso de un receptor que se haya hecho fluorescente y de uno de sus ligandos fluorescentes, permite medir, tal como se describe en la solicitud internacional WO 98/55873, interacciones no covalentes entre dicho receptor y dicho ligando.

El receptor se puede hacer fluorescente gracias a una proteína fluorescente, por ejemplo, una proteína que procede de la medusa *Aequorea victoria* de la que el gen correspondiente se ha secuenciado, se ha clonado (Prasher *et al.*, 1992) y se ha optimizado para una buena expresión en las eucariotas superiores (Cormack *et al.*, 1996). Se puede fusionar con el gen que codifica otra proteína, especialmente un receptor acoplado con una proteína G (Galzi & Alix, 1997; Weill *et al.*, 1999; Vollmer *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2001), para permitir la expresión de una proteína receptora fluorescente. La combinación de la proteína receptora fluorescente con uno de sus ligandos fluorescentes permite la formación de un complejo receptor-ligando no covalente que se detecta mediante transferencia de energía de fluorescencia (Galzi y Alix, 1997; Vollmer *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2001), y de la cual se puede medir la cinética de formación y de disociación (Palanché *et al.*, 2001; Valenzuela *et al.*, 2001).

Uno de los objetivos de la invención es suministrar un procedimiento sencillo de implementar, rápido, sensible, que permite efectuar medidas cuantitativas de las interacciones entre un receptor y un ligando marcador del sitio del ligando endógeno, y que permite detectar la presencia de un eventual efector alostérico.

Otro objetivo de la invención es permitir medidas en tiempo real de las interacciones de un ligando marcador del sitio del ligando endógeno con su receptor, permitiendo detectar la presencia de un eventual efector alostérico.

Otro objetivo de la invención es permitir una medida en tiempo resuelto de la cinética de asociación y de disociación de un ligando fluorescente, marcador del sitio del ligando endógeno, con su receptor, y detectar la presencia de un eventual efector alostérico.

Otro objetivo de la invención es permitir la detección de la interacción entre un receptor y su ligando endógeno mediante transferencia de energía de fluorescencia en intervalos de concentraciones de ligando endógeno fluorescente considerablemente más amplios (desde nanomolar hasta micromolar) que cuando se usa un radioligando (campo del nanomolar). Así, la presente invención permite detectar, mediante transferencia de energía, un número más elevado de estados conformacionales del receptor, lo que facilita mucho la identificación y la interpretación de los efectos de ciertos agentes moduladores.

Uno de los objetivos de la invención es suministrar una medida experimental de las constantes de velocidad de asociación y de disociación de un ligando fluorescente, marcador del sitio del ligando endógeno, con su receptor, permitiendo la detección de la presencia de un eventual efector alostérico.

La invención tiene asimismo como objetivo suministrar un procedimiento de detección de un efector alostérico de un receptor, que se puede generalizar a numerosas proteínas receptoras y a sus ligandos.

La invención tiene asimismo como objetivo suministrar un procedimiento de detección de un efector alostérico de un receptor, que puede ser automatizado, que no necesita ni la purificación del receptor ni la del ligando.

La invención tiene asimismo como objetivo suministrar un procedimiento de detección de un efector alostérico de un receptor, no contaminante debido a que no utiliza radioactividad, económico debido a que utiliza luz visible, y que se puede implementar en equipos ya existentes.

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de un efector alostérico de un receptor, mediante determinación de la variación:

- de la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,
- y/o de la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho receptor,

estando dicho receptor y dicho ligando implicados en por lo menos una respuesta biológica en condiciones fisiológicas apropiadas, y siendo el efector alostérico capaz de modular por lo menos una de estas respuestas,

estando dicho receptor marcado por una proteína fluorescente seleccionada de entre las proteínas fluorescentes que proceden o que derivan de proteínas autofluorescentes de nematocistos, cuyo coeficiente de extinción molecular es superior a aproximadamente $14000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, y el rendimiento cuántico de fluorescencia es superior a aproximadamente 0,38,

estando dicho ligando marcado mediante un marcado constituido:

- por una molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente,
- o bien por una sustancia fluorescente,

siendo dichas determinaciones de variación de cinética de disociación y/o de asociación, y de variación de amplitud, efectuadas mediante transferencia de energía de fluorescencia:

- entre la proteína fluorescente mencionada anteriormente y dicha sustancia fluorescente, siendo la sustancia fluorescente de tal forma que sea excitable a la longitud de onda de emisión de la proteína fluorescente mencionada anteriormente, o bien emita a la longitud de estimulación de la proteína fluorescente mencionada anteriormente, o
- entre la proteína fluorescente mencionada anteriormente y dicha molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente.

La presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un efector alostérico de un receptor, mediante determinación de la variación:

- de la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,
- y/o de la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, con la condición de que cuando la variación de dicha amplitud sea negativa, se detecte igualmente la existencia de la variación de dicha cinética,

estando dicho receptor y dicho ligando implicados en por lo menos una respuesta biológica en condiciones fisiológicas apropiadas, y siendo el efector alostérico capaz de modular por lo menos una de las respuestas,

estando dicho receptor marcado por una proteína fluorescente seleccionada de entre las proteínas fluorescentes que proceden o derivan de proteínas autofluorescentes de nematocistos, cuyo coeficiente de extinción molecular es superior a aproximadamente $14000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, y el rendimiento cuántico de fluorescencia es superior a aproximadamente 0,38,

estando dicho ligando marcado mediante un marcador constituido:

- por una molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente,
- o bien por una sustancia fluorescente,

siendo dichas determinaciones de variación de cinética de disociación y/o de asociación, y de variación de amplitud, efectuadas mediante transferencia de energía de fluorescencia:

- entre la proteína fluorescente mencionada anteriormente y dicha sustancia fluorescente, siendo la sustancia fluorescente de tal forma que sea excitable a la longitud de onda de emisión de la proteína fluorescente mencionada anteriormente, o bien emita a la longitud de estimulación de la proteína fluorescente mencionada anteriormente, o
- entre la proteína fluorescente mencionada anteriormente y dicha molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente.

La invención responde al problema técnico resultante de la determinación del carácter competitivo o no competitivo de la interacción entre un receptor y un agente farmacológico que actúa supuestamente como efector de un receptor o como competidor del ligando endógeno de un receptor, mediante medidas de cinéticas de asociación o de disociación. De manera sencilla, el efector alostérico de un receptor alterará la cinética de asociación o de disociación de un receptor, mientras que un agente competidor del ligando endógeno no tendrá ningún efecto sobre estas cinéticas.

Mediante la expresión “ligando, marcador del sitio del ligando endógeno” se entiende un ligando que se une al sitio del ligando endógeno por oposición a un eventual efector alostérico, que se une a un sitio distinto de aquel del ligando endógeno. El marcador del sitio del ligando endógeno interactúa de manera competitiva con el ligando endógeno (unión mutuamente exclusiva), mientras que el efector alostérico interactúa de manera no competitiva con el ligando endógeno.

Se entiende mediante las expresiones “efector alostérico” o “modulador alostérico” una molécula o un ligando o una sustancia biológicamente activa que modula las propiedades de unión del ligando así como las propiedades funcionales del receptor, sin competir con dicho ligando.

Por definición, se recuerda que se denomina ligando a cualquier molécula susceptible de unirse a un receptor de manera no covalente, uniéndose al mismo sitio que el ligando endógeno, y que un ligando puede ser agonista o antagonista, siendo un agonista capaz de, cuando se une, provocar una respuesta biológica, y siendo un antagonista no capaz de provocar respuesta biológica ninguna y siendo capaz de bloquear el efecto del agonista.

Un efector alostérico es también un ligando del receptor, pero éste se une con el receptor sobre un sitio de unión distinto. En el presente contexto, se usará el término “efector alostérico” o “modulador alostérico” y no “ligando”.

La modulación alostérica es el mecanismo mediante el cual una molécula, denominada efector alostérico o modulador alostérico, aumenta o disminuye la respuesta de un receptor activado mediante un agonista. El efector alostérico interactúa con el receptor a nivel de un sitio de unión distinto de aquel en el que el ligando competitivo se une sobre el receptor. El hecho de que una modulación alostérica sea posible reside en:

- 1) la existencia de distintas conformaciones o estados del receptor. Cada conformación está dotada de propiedades farmacológicas y funcionales distintas. Así, existen conformaciones activas e inactivas en el plano biológico. Cada conformación une sus ligandos con afinidades diferentes. Por ejemplo, un agonista, tal como un efector alostérico positivo, exhibe una afinidad más grande para la(s) conformación(es) biológicamente activa(s) del receptor, mientras que un antagonista, tal como un efector alostérico negativo, presenta una afinidad más elevada para la(s) conformación(es) inactiva(s) del receptor;

Las propiedades farmacológicas de una conformación son la capacidad de unir ligandos y moduladores con una afinidad definida. Cada conformación une diferentes ligandos con una afinidad intrínseca propia de cada ligando. El conjunto de los ligandos que se unen a una conformación con una afinidad propia constituye lo que se denomina como perfil farmacológico. Las propiedades farmacológicas de una conformación son asimilables a su perfil farmacológico.

Las propiedades funcionales de una conformación de un receptor corresponden a su capacidad o no de estimular una respuesta biológica. Se distinguirá varias propiedades funcionales de un receptor:

- el estado de reposo, por definición no activo, porque no está acoplado con una respuesta, pero activable, es decir, capaz de interconvertirse en una conformación activa o acoplada con una respuesta;
- el o los estado(s) activo(s), responsable(s) de una respuesta biológica; en el caso en el que existen varios estados activos, una por lo menos de las propiedades de la respuesta será diferente (por ejemplo, respuesta cálcica contra cAMP, o también una respuesta idéntica pero una sensibilidad diferente a los agonistas, o también tiempos de respuestas diferentes, etc.); por otra parte, cada estado activo puede dar lugar a una o varias respuestas, distintas, por su naturaleza o desde un punto de vista cuantitativo; además, un receptor puede adoptar varias conformaciones que corresponden a varios estados activos a los que se asocian respuestas de naturaleza diferente;
- el (los) estado(s) desensibilizado(s) que son no activos y no activables;

- 2) la existencia, en las proteínas, de sitios múltiples que permiten la interacción simultánea de varias moléculas con un solo receptor; los ligandos competitivos interactúan con un sitio común (de manera mutuamente exclusiva) que es distinto en sí del (de los) sitio(s) de interacción de los efectores o moduladores alostéricos;

- 3) las transiciones conformacionales del receptor implican la totalidad de la molécula de receptor, y no están restringidas a la región de la molécula que une los ligandos; ellas afectan toda la estructura terciaria, incluso cuaternaria, de la proteína, y son discretas; así, durante la transición conformacional del estado de reposo hacia el estado activo del receptor, la totalidad de los sitios de unión, así como la del sitio “biólogicamente activo” ven cambiar su estructura de manera coordinada.

Estos distintos aspectos de la regulación funcional de una proteína se ilustran en la figura 1 (Monod *et al.*, 1965; Galzi *et al.*, 1996; Rubin y Changues, 1966). La descripción del modo de funcionamiento de un receptor que puede existir en dos conformaciones (estado de reposo y estado activo) se ilustra en la figura 3 para un receptor. Una versión equivalente de este esquema para un receptor acoplado con las proteínas G que puede activar una proteína Gs, ella misma responsable de la activación de una adenilil ciclasa, se describe en Tucek y Proska (1995) y en Hall (2000).

En estos esquemas, la proteína, en particular el receptor, existe en dos conformaciones que están en equilibrio espontáneo una con otra. Este equilibrio se describe mediante la constante L_0 cuyo valor se proporciona con relación a la concentración fraccional $[R]/[A]$, siendo R el estado de reposo y A el estado activo. Los ligandos se unen al estado R y al estado A con afinidades descritas mediante constantes de disociación K_R y K_A , respectivamente. Si la relación $c = K_A/K_R$ es $c < 1$, es decir que la afinidad del ligando es mejor para A que para R, dicho ligando se comportará como un agonista del receptor, y la concentración fraccional de receptor en el estado A se describirá mediante el producto L_0c que será el mismo más pequeño que L_0 . Por lo contrario, si la relación de afinidad c es $c > 1$, el ligando se unirá preferentemente al estado R, y se comportará como un antagonista. El producto L_0c será más grande que L_0 . Los efectores alostéricos, uniéndose a sitios distintos del sitio de los ligandos competitivos, se comportan de la misma manera que los ligandos competitivos porque modifican el valor de la constante de equilibrio entre los estados R y A. El formalismo matemático del efecto de los efectores alostéricos se proporciona en Rubin y Changues (1966). La presencia de un efector alostérico modifica el valor de la constante L_0 en L'_0 según $L'_0 = L_0[(1+\beta d)/(1+\delta)]^n$ con $\beta = K_A/K_R$ y $d = F/K_A$, correspondiendo F al valor de concentración de efector alostérico. La adición de un agonista o antagonista conlleva entonces al cambio de las concentraciones fraccionales de los estados del receptor en L'_0c .

Se recuerdan las siguientes definiciones:

Por “receptor”, se designa cualquier molécula de naturaleza proteica susceptible de entrar en interacción no covalente con un agente farmacológico. Preferentemente, en la invención, se usa un receptor de neurotransmisor, de hormona, de factor de crecimiento, etc. capaz de producir, después de la interacción con un ligando farmacológico, una respuesta de transducción de señal que se puede medir *in vivo* e *in vitro*.

Mediante la expresión “interacción competitiva” se designa una interacción de dos moléculas con un receptor que toma sitio a nivel de un sitio único, y un ligando se denomina como “competitivo” cuando interfiere con la unión de otro ligando de manera estérica.

Paralelamente, mediante la expresión “interacción no competitiva”, se designa una interacción de dos moléculas con un receptor que toma sitio a nivel de sitios topológicamente distintos, y un ligando se denomina como “no competitivo” cuando interfiere con la unión de otro ligando, interactuando los dos ligandos con sitios topológicamente distintos del receptor.

Se recuerda igualmente que la “asociación” en la expresión “asociación del complejo” es la acción, para un ligando, de unirse a una proteína receptora.

Si la proteína receptora puede adoptar varias conformaciones o estados es, a veces, posible discernir la unión de un ligando con las distintas conformaciones mediante diferencias de cinéticas de asociación.

Mediante la expresión “cinética de asociación”, se designa el transcurso del tiempo de una reacción de asociación. Las cinéticas pueden ser monoexponenciales o pluriexponenciales. En el caso en el que son pluriexponenciales, se descomponen en una suma de relajaciones monoexponenciales caracterizadas cada una por una velocidad de asociación y una amplitud.

La expresión “velocidad de asociación” se mide mediante la constante de velocidad de la reacción de asociación obtenida mediante ajuste de una curva experimental con la ayuda de una expresión monoexponencial de la forma $y = \lambda \exp(-k_{ap} \times T)$ en el que λ es la amplitud, k_{ap} es la constante de velocidad aparente de la reacción, y T es el tiempo. En el caso en el que la asociación refleja varios eventos de unión simultáneos, se usa una expresión multiexponencial de tipo $y = \lambda_1 \exp(-k_{1ap} \times T) + \lambda_2 \exp(-k_{2ap} \times T) + \text{etc.}$

Se recuerda que la expresión matemática de la constante de velocidad aparente (k_{ap}) depende de la naturaleza lineal o no de la variación de k_{ap} con la concentración del ligando $[L]$. Así, si k_{ap} varía de manera lineal con $[L]$, la reacción es bimolecular, del tipo $R + L \leftrightarrow RL$ con k_1 para la formación, y k_{-1} para la disociación del complejo. K_{ap} es entonces igual a $k_1 \times [L] + k_{-1}$. Si la relación no es lineal, se aplica el esquema de reacción siguiente: $R + L \leftrightarrow RL \leftrightarrow R'L$ en el que K_D es la constante de disociación del complejo RL , k_2 es la velocidad de interconversión $RL \rightarrow R'L$ y k_{-2} es la constante de velocidad de disociación del complejo $R'L \rightarrow RL$, k_{ap} es entonces igual a $k_2 \times ([L]/([L]^* + K_D)) \times k_{-2}$.

Se recuerda igualmente que la “disociación” en la expresión “disociación del complejo” es la acción de un ligando de quitar un sitio receptor. La disociación se puede obtener de por lo menos dos maneras: a) diluyendo fuertemente la mezcla de receptor-ligando de manera a privilegiar la disociación con relación a la asociación, o 2) añadiendo con mucho exceso un ligando competitivo que ocupará de manera privilegiada un sitio dejado vacío por el ligando que se disoció.

Si la proteína receptora puede adoptar varias conformaciones o estados, a veces, es posible discernir la disociación entre un ligando y su receptor que presenta diferentes conformaciones, mediante diferencias de cinética de disociación entre las distintas conformaciones.

Se entiende por cinética de disociación el transcurso del tiempo de una reacción de disociación. Las cinéticas pueden ser monoexponenciales o multiexponenciales. En el caso en el que son pluriexponenciales, se dividen en una suma de relajaciones monoexponenciales caracterizadas por una velocidad de disociación y una amplitud.

La expresión “velocidad de disociación” se mide mediante la constante de velocidad de la reacción de disociación obtenida mediante ajuste de una curva experimental con la ayuda de una expresión exponencial de la forma $y = \lambda \exp(-k \times T)$ en la que λ es la amplitud, k es la constante de velocidad intrínseca de la reacción ($k = k_{-1}$) y T es el tiempo. En el caso en el que la disociación refleja varios eventos de disociación simultáneos, se usa una expresión multiexponencial de tipo $y = \lambda_1 \exp(-k_1 \times T) + \lambda_2 \exp(-k_2 \times T) + \text{etc.}$

Se recuerda que la expresión “amplitud de unión” designa la amplitud de la señal monitorizada, que es en sí proporcional al coeficiente de ocupación de los sitios receptores. Con una concentración saturante de ligando, la amplitud de unión es constante. Así, ésta evoluciona de manera no lineal, y según la ley de acción de masas. Se puede describir mediante la ecuación empírica de Hill: $RL = R_0/(1 + K_D/L)^n$ en la que R_0 es la cantidad total de sitios receptores presentes en el ensayo, K_D es la constante de disociación, L es la concentración de ligando, y en la que n es el coeficiente de proporcionalidad también denominado coeficiente de Hill.

Se denomina “respuesta biológica” cualquier variación de metabolismo de células, de tejidos o de organismos. Para células, por ejemplo, se podrá determinar variaciones de pH, de concentraciones iónicas, de formaciones de metabolitos tales como GTP o AMPc, de expresión de genes, de morfología celular (medida del porcentaje de células que cambiaron de forma), de proliferación celular, entre otros. Se dan ejemplos más adelante.

Mediante la expresión “condiciones fisiológicas apropiadas”, se entiende cualquier condición de pH, de concentraciones y de composición iónicas, de complementos nutritivos tan próximos como sea posible de los que se encuentran en el organismo entero. Estas condiciones se elijan de manera que el experimento efectuado se realiza en condiciones tan próximas como sea posible de las que se podrían obtener efectuando la medida en el organismo entero.

La expresión “capaz de modular por lo menos una de las respuestas” significa que en un conjunto de respuestas medibles y excitables por un receptor, una por lo menos debe de estar modificada por el efector. La modificación o modulación puede afectar al tiempo de establecimiento de la respuesta, de su frecuencia, de su amplitud, de su duración, de su velocidad de extinción, así como de su sensibilidad al agonista.

En cuanto a la respuesta de transducción de señal para los receptores acoplados con las proteínas G, el ensayo general consiste en determinar la activación de la proteína G midiendo la fijación de GTP (Befort *et al.*, 1996). Otras medidas más específicas hacen, por ejemplo, intervenir determinaciones de concentraciones intracelulares de AMPc, de fosfatos de inositol, de calcio, de las medidas de activación de la transcripción de genes o de actividad oncogénica, según el tipo de enlace específico del receptor en cuestión.

Para los receptores-canales, las medidas más directas son determinaciones de corrientes iónicas (Hille, 1992). Otras medidas pueden, por ejemplo, hacer intervenir determinaciones de transcripción de genes o activaciones de enzimas.

Para los receptores de factores de crecimiento, los ensayos generales son los de la proliferación, diferenciación o supervivencia celular, y frecuentemente, también ensayos de fosforilaciones de sustratos específicos (Honneger *et al.*, 1988) de cada receptor, y detección mediante anticuerpos específicos de fosfoaminoácidos.

Para los receptores nucleares, los ensayos de transducción de señal son los de la transcripción de genes en los que genes indicadores, por ejemplo “cromogénicos” se disponen bajo el control de promotores específicos de las vías de transducción del receptor estudiado (Ko *et al.*, 2002).

Así, para las respuestas de acumulación de AMPc, se podrán usar diversos protocolos, especialmente una medida radioinmunológica tal como se describe en Palanché *et al.* (2001) o en Hausdorff *et al.* (1990).

La unión de GTP a la proteína G se puede monitorizar, por ejemplo, como se describe en Fawzi *et al.* (2001) o en Vuong y Chabre (1990).

La proliferación celular se analizará, por ejemplo, según el protocolo descrito en Buestein *et al.* (1997).

La regulación de la expresión de genes se podrá estudiar, por ejemplo, según el protocolo descrito en Baulmann *et al.* (2000).

La activación de proteínas quinasas se podrá estudiar, por ejemplo, como se describe en Vollmer *et al.* (1999) o en Yuan *et al.* (2000).

Se podrá medir la variación de pH (Nicolini *et al.*, 1995).

Una “proteína autofluorescente” es una proteína natural o sintética en la que el cromóforo se forma mediante una reacción autocatalítica entre aminoácidos de la proteína, sin la necesidad de adicionar un grupo prostético (cromóforo), y cuyas propiedades de fluorescencia son intrínsecas al monómero.

La expresión “transferencia de energía de fluorescencia” corresponde a un proceso físico, que depende de la distancia, mediante el cual se transmite energía de manera no radiactiva de un cromóforo estimulado, el donante, hacia otro cromóforo, el receptor, mediante interacción dipolo-dipolo (Förster, 1951; Wu y Brand, 1994; Clegg, 1995). La transferencia de energía se puede observar mediante una disminución de la amplitud de emisión del donante, o bien mediante un aumento de la amplitud de estimulación y de emisión del receptor. Si el receptor no es fluorescente, pero presenta un espectro de excitación que recubre por lo menos en parte el espectro de emisión del donante, la transferencia de energía se podrá detectar en forma de una reducción de amplitud de la emisión del donante.

En el caso de la aplicación de la transferencia de energía a muestras biológicas de interacción no covalentes, la señal de transferencia no puede persistir si las condiciones experimentales no permiten la interacción entre el ligando fluorescente y el receptor fluorescente. Igualmente, si una de las dos contrapartes que interactúan no es portador de un cromóforo adecuado, las eventuales variaciones de fluorescencia observadas para la otra contraparte no podrán ser atribuidas a un proceso de transferencia de energía.

Los términos “cambios” o “variaciones de fluorescencia”, definidos en el contexto de la transferencia de energía, se refieren a cualquier modificación de 1) la amplitud de la señal de fluorescencia del receptor, 2) la amplitud del espectro

de excitación o 3) la amplitud de la señal de emisión del donante. Las variaciones o cambios de fluorescencia no se deben de observar si una de las dos contrapartes no porta un cromóforo o un fluoróforo adecuado (véase más abajo), o si la interacción entre las partes fluorescentes es inhibida, por ejemplo, mediante un exceso de agente competidor.

De manera más precisa, la reacción de transferencia de energía de fluorescencia requiere dos grupos, uno denominado como donante, necesariamente donante, y el otro receptor, bien fluorescente o bien colorante. Esta reacción se produce cuando están reunidas dos condiciones:

- 1) el espectro de absorción del receptor y el espectro de emisión del donante deben recubrirse, por lo menos en parte; el recubrimiento se calcula a partir de datos experimentales y una ecuación que proporciona un valor de cm^3M^{-1} (Lakey *et al.*, 1991);
- 2) el donante y el receptor deben de ser próximos en el espacio (de 10 a 100 ángstrom) a fin de que se pueda realizar la transferencia de energía.

La primera condición tiene por consecuencia el hecho de que la estimulación del donante conlleva entonces de manera concomitante a una disminución de la amplitud de emisión del donante, y a la aparición de una señal de emisión del receptor. Esto permite detectar las interacciones entre el donante y el receptor y/o medir su distancia.

La expresión “próximos en el espacio” significa que la distancia entre el donante y el receptor es menor que $2 R_0$, representando R_0 el rayo de Forster (citado anteriormente) (Lakey *et al.*, 1991).

Según un modo de realización ventajoso de la invención, cuando la variante de la amplitud de unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, es negativa, conviene detectar la existencia de una variación de cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector y, ventajosamente, cuantificar esta variación de cinética a fin de distinguir un efector alostérico de un agente competitivo.

La presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un efector alostérico de un receptor, mediante determinación de la variación:

- de la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,

- y/o de la amplitud de unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,

estando dicho receptor y dicho ligando implicados en por lo menos una respuesta biológica en condiciones fisiológicas apropiadas, y siendo el efector alostérico capaz de modular por lo menos una de las respuestas,

siendo dicho receptor marcado por una proteína fluorescente seleccionada de entre:

- la proteína fluorescente verde (GFP o EGFP), la proteína fluorescente cian (CFP o ECFP), la proteína fluorescente amarilla (YFP o EYFP) o GFPUV,

o,

- variantes derivadas de GFP, de CFP, de YFP o de GFPUV, mediante adición, supresión o sustitución de uno o varios aminoácidos, con la condición de que estas variantes conserven la propiedad de fluorescencia,

- o fragmentos de GFP, CFP YFP o GFPUV, o fragmentos de dichas variantes, con la condición de que estos fragmentos conserve la propiedad de fluorescencia,

estando dicho ligando marcado mediante un marcador constituido de:

- bien una molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente,
- o bien una sustancia fluorescente,

siendo dichas determinaciones de variación de cinética de disociación y/o de asociación y de variación de amplitud, efectuadas por transferencia de energía de fluorescencia:

- entre la proteína fluorescente tal como se ha definido anteriormente y dicha sustancia fluorescente, siendo la sustancia fluorescente de tal manera que sea excitable a la longitud de onda de emisión de la proteína fluorescente, o bien emite a la longitud de estimulación de la proteína fluorescente, o
- entre la proteína fluorescente tal como se ha definido anteriormente y dicha molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente.

Según un modo de realización preferido de la invención, cuando la variación de dicha amplitud de unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, es negativa, se detecta igualmente la existencia de la variación de dicha cinética.

El receptor está marcado por vía genética mediante una proteína fluorescente seleccionada de entre:

- la proteína fluorescente verde (GFP) (Ward *et al.*, 1980; Chalfie, 1995), o EGFP (IEM & Tsien, 1996; Miyawaki *et al.*, 1997),
- la proteína fluorescente cian (CFP o ECFP) (IEM & Tsien, 1996; Miyawaki *et al.*, 1997),
- la proteína fluorescente amarilla (YFP o EYFP) (Cormack *et al.*, 1995; IEM, Cubitt y Tsien, 1995; Ehrig *et al.*, 1995) (Miyawaki *et al.*, 1997),
- GFPuv (Cramer *et al.*, 1996; Ehrig *et al.*, 1995),

o sus mutantes en los que los codones se optimizan para la expresión en las células humanas, bacterianas o vegetales, o sus mutantes que presentan longitudes de estimulación o de emisión más elevadas o más bajas que aquellas asociadas con las proteínas definidas anteriormente, con la condición de que su coeficiente de extinción molecular sea mayor que aproximadamente $14000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y, su rendimiento cuántico de fluorescencia sea mayor que aproximadamente 0,38.

La expresión “codones optimizados” indica la sustitución de codones de la proteína salvaje con sus homólogos preferidos del organismo hospedante, sin cambio de código, y por lo tanto, sin cambio de secuencia proteica.

La GFP salvaje (WT) de longitud de onda, de estimulación y de emisión 395/470-509 se describe en Ward *et al.* (1989) y en Chalfie (1995).

La GFP UV que presenta las siguientes mutaciones: F99S, M153T, V163A de longitud de onda, de estimulación y de emisión respectivamente de 395-510 se describe en Cramer *et al.* (1996), o la mutación T203I y la longitud de onda de estimulación y de emisión 400-512, respectivamente, se describe en Ehrig *et al.* (1995).

La EGFP presenta las siguientes mutaciones:

F64L S65T H231L

La EYFP presenta las siguientes mutaciones:

S65G V68L S72A T203Y

La ECFP presenta las siguientes mutaciones:

F64L S65T Y66W N146I

M153T V163A N212K

Los diferentes mutantes de GFP se pueden además optimizar (mediante introducción de mutaciones silenciosas optimizando el uso de codones específicos a cada especie) para la expresión en células:

- humanas (Haas *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996; Zolotukhin *et al.*, 1996)
- bacterianas (Cramer *et al.*, 1996; Cormack *et al.*, 1996, para *Escherichia coli*),
- vegetales (Reichel *et al.*, 1996).

El término GFP indica una proteína que, una vez expresada en células, emite una fluorescencia. Las GFP que presentan sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos que influyen las propiedades de fluorescencia o bien el coeficiente de expresión de GFP se denominan mutantes de GFP.

ES 2 273 026 T3

Se proporciona a continuación las principales características de las proteínas fluorescentes usadas ventajosamente en el procedimiento de la invención:

Proteína	λ -estimulación máxima	λ -emisión	Coefficiente de extinción	Rendimiento cuántico
EYFP	514	527	36500	0,63
ECFP	432	480	18000	0,67
GFPUV	395	509	21000	0,77
EGFP	489	511	39000	0,66

La proteína autofluorescente BFP está preferentemente excluida porque no responde a las condiciones definidas aquí para las proteínas autofluorescentes de nematocistos, a saber, un coeficiente de extinción molecular mayor que $14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y un rendimiento cuántico de fluorescencia mayor que 0,38.

Según un modo de realización ventajoso de la invención, el marcador se marca mediante una proteína fluorescente (nº 1), y el ligando se marca

* mediante una sustancia fluorescente, siendo la marcación:

- efectuada por vía química, siendo entonces la sustancia fluorescente un compuesto químico,
 - o bien efectuada por vía recombinante, siendo entonces la sustancia fluorescente un péptido o una proteína fluorescente (nº 2), que se puede elegir especialmente entre las proteínas fluorescentes que proceden o que derivan de proteínas autofluorescentes de nematocistos, cuyo coeficiente de extinción molecular es superior a aproximadamente $14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y el rendimiento cuántico de fluorescencia es superior a aproximadamente 0,38, elegida especialmente entre:

- la proteína fluorescente verde (GFP), o
 - variantes derivadas de GFP, mediante adición, supresión o sustitución de uno o varios aminoácidos, con la condición de que estas variantes conserven la propiedad de fluorescencia,
 - o fragmentos de GFP, o fragmentos de dichas variantes, con la condición de que estos fragmentos conserven la propiedad de fluorescencia,

* o bien mediante una sustancia no fluorescente que pertenece al grupo de los ácidos violetas [Acid Violet 5, CAS 10130-48-0; Acid Violet 7, CAS 4321-69-1; Acid Violet 17, CAS 4129-84-4], los ácidos rojos [Acid Red 1, CAS 3734-67-6; Acid Red 8, CAS 4787-93-3; Acid Red 37, CAS 6360-07-2; Acid Red 40, CAS 12167-45-2; Acid Red 106, CAS 6844-74-2; Acid Red 114, CAS 6459-94-5], las alizarinas, el aluminón, la azocarmina B [CAS 25360-72-9], la fucsina básica [Basic Red 9, CAS 569-61-9], el rojo violáceo R [Acid Red 17, CAS 5858-33-3], la carmina [CAS 1390-65-4].

El término "CAS" corresponde a Chemical Abstracts.

Mediante la expresión "marcación de un receptor o de un ligando", se entiende:

- para el receptor, la fusión de su gen o ADNc, o parte del gen o del ADNc, con el gen o ADNc, o parte del gen o ADNc, de GFP;
 - para el ligando, se puede tratar de un enlace químico entre el ligando y un grupo fluorescente, o bien de la fusión de su gen o ADNc, o parte del gen o del ADNc, con el gen o ADNc, o parte del gen o ADNc, de GFP.

La invención se refiere al uso de una proteína fluorescente según la invención, en la que el receptor y el ligando están marcados por vía genética, siendo la proteína fluorescente y la sustancia fluorescente elegidas respectivamente entre las parejas de compuestos siguientes:

GFPUV - EYFP

EYFP - GFPUV

ECFP - EYFP

EYFP - ECFP

ECFP - EGFP

5 EYFP - ECFP

EGFP - EYFP

10 EYFP - EGFP

y especialmente en la que el receptor está marcado por la proteína EYFP o EGFP y el ligando está marcado por la proteína ECFP, o en la que el receptor está marcado por la proteína ECFP y el ligando está marcado por la proteína EYFP o EGFP.

15 Según un modo de realización ventajoso de la invención, la proteína fluorescente es EGFP y:

- EGFP es donante de energía de fluorescencia y el marcado que absorbe la luz emitida por EGFP es una sustancia fluorescente o no y, estando el marcado seleccionado de entre sustancias cuyo espectro de excitación solapa el espectro de emisión de EGFP,

20 y, en el caso en el que el marcador sea una sustancia fluorescente, se elige entre: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (Bodipy), eosina, lisamina, eritrosina, tetrametilrodamina, sulforrodamina 101 comercializado por Molecular Probe con la denominación Texas Red, y sus derivados, permitiendo, por una parte, el injerto, y, por otra parte, que el espectro de excitación cubra el espectro de emisión de EGFP,

25 y, en el caso en el que el marcador no sea una sustancia fluorescente, se elige entre el grupo de los ácidos violetas [Acid Violet 5, CAS 10130-48-0; Acid Violet 7, CAS 4321-69-1; Acid Violet 17, CAS 4129-84-4], los ácidos rojos [Acid Red 1, CAS 3734-67-6; Acid Red 8, CAS 4787-93-3; Acid Red 37, CAS 6360-07-2; Acid Red 40, CAS 12167-45-2; Acid Red 106, CAS 6844-74-2; Acid Red 114, CAS 6459-94-5], las alizarinas, el aluminón, la azocarmina B [CAS 25360-72-9], la fucsina básica [Basic Red 9, CAS 569-61-9], el rojo violáceo R [Acid Red 17, CAS 5858-33-3], la carmina [CAS 1390-65-4],

- o bien EGFP es receptor de energía de fluorescencia y la sustancia fluorescente es donante de energía de fluorescencia, y se elige entre sustancias, cuyo espectro de emisión solapa el espectro de excitación de EGFP, y especialmente entre: cumarinas, 6-(N-metilanilino)naftaleno (mandil), y sus derivados, permitiendo, por una parte, el injerto, y, por otra parte, que el espectro de emisión recubra el espectro de excitación de EGFP.

40 Según un modo de realización ventajoso de la invención, la proteína fluorescente es ECFP y:

- ECFP es donante de energía de fluorescencia, y la sustancia fluorescente es receptora de energía, y se elige entre fluoresceína y 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol,
- o bien ECFP es receptor de energía de fluorescencia, y la sustancia fluorescente es donante de energía, y se elige entre pireno o cumarina, y sus derivados, permitiendo, por una parte, el injerto, y, por otra parte, que el espectro de emisión solape el espectro de excitación de ECFP.

Con respecto del receptor, éste se puede elegir entre:

- 50 - los receptores membranarios acoplados con la proteína G, especialmente en el documento Supplement Trends in Pharmacological Sciences, 1997 (*Receptor and ion Channel Nomenclature*) y en las bases de datos ensembl-org y GPCRdb,
- 55 - los receptores de factores de crecimiento, especialmente los que son estructuralmente relacionados al receptor de la insulina (Yarden, Y. y Ullrich, A., 1988) o al receptor del interferón γ (Brisco *et al.*, 1996; Ihle, 1995), y los descritos en las bases de datos ensembl.org y GPCRdb,
- 60 - los receptores canales, especialmente en el documento Supplement Trends in Pharmacological Sciences, 1997 (*Receptor and ion Channel Nomenclature*) y los descritos en las bases de datos ensembl.org y GPCRdb,
- 65 - los receptores nucleares intracelulares, especialmente los que son estructuralmente relacionados al receptor de los esteroides (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Wurtz *et al.*, 1996), y los descritos en las bases de datos ensembl.org y GPCRdb.

Según un modo de realización ventajoso, el receptor se elige entre los receptor membranarios enlazados con la proteína G.

Tal como se ha definido anteriormente, se recuerda que mediante el término “receptor” se designa cualquier molécula de naturaleza proteica susceptible de entrar en interacción no covalente con un agente farmacológico y, preferentemente, un receptor de neurotransmisor, de hormonas, de factor de crecimiento, etc., capaz de producir, tras interacción con un ligando farmacológico, una respuesta de transducción de señal que se pueda medir *in vivo* y/o *in vitro*.

Mediante la expresión “respuesta de transducción de señal” se designa cualquier respuesta, o inhibición de respuesta, que se puede medir *in vivo* y/o *in vitro*, que resulta de la interacción de un receptor con sus agentes farmacológicos específicos, y que conduce a activaciones o inhibiciones del metabolismo celular por efecto sobre mensajeros secundarios, enzimas o corrientes iónicas.

A título de ejemplos de receptores membranarios acoplados con las proteínas G, se pueden citar los receptores de purinas y nucleótidos, aminas biogénicas, péptidos y proteínas, eicosanoides, lípidos y derivados, aminoácidos estimulantes e iones, moléculas olfativas, así como receptores huérfanos (véase a continuación una lista bastante exhaustiva).

A título de ejemplo de receptores de factores de crecimiento, se pueden citar las citoquinas, el factor de crecimiento epidérmico, la insulina, el factor de crecimiento que deriva de plaquetas, el factor de crecimiento de transformación.

A título de receptores de canales, se pueden citar, especialmente, los receptores de ATP, de la serotonina, GABA, glicina, acetilcolina, glutamato.

A título de ejemplo de receptores nucleares, se pueden citar, especialmente, los receptores de las hormonas de la tiroides, de los estrógenos, de los glucocorticoides, de los retinoides.

A título de ligandos de los receptores acoplados con la proteína G, se pueden citar:

- Purinas y nucleótidos
 - Adenosina
 - cAMP
 - ATP
 - UTP
 - ADP
- Aminas biogénicas (y ligandos naturales relacionados)
 - 5-hidroxitriptamina
 - Acetilcolina
 - Dopamina
 - Adrenalina
 - Histamina
 - Melatonina
 - Noradrenalina
 - Tiramina/Octopamina
 - Otros compuestos relacionados
- Péptidos
 - Hormona adrenocorticotrófica (ACTH)
 - Hormona estimuladora de melanocito (MSH)
 - Melanocortinas
 - Neurotensina (NT)

ES 2 273 026 T3

- Bombesina y péptidos relacionados
- Endotelinas
- 5 • Quolecistoquinina
- Gastrina
- 10 • Neuroquinina B (NKB)
- Receptor de las taquiquininas
- Sustancia K (NKA)
- 15 • Sustancia (P)
- Neuropéptido Y (NPY)
- 20 • Factor de liberación de la tirotropina
- Nociceptina
- Bradiquinina
- 25 • Angiotensina II
- Beta-endorfina
- C5a anafalatoxina
- 30 • Calcitonina
- Quimioquinas (denominado igualmente intercrinas)
- 35 • Factor de liberación corticotrófico (CRF)
- Dinorfina
- Endorfina
- 40 • Péptidos formilados
- Folitropina (FSH)
- 45 • Feromonas de maduración fúngica
- Gelatina
- 50 • Receptor del polipéptido inhibidor gástrico (GIP)
- Péptidos análogos del glucagón (GLPs)
- Glucagón
- 55 • Hormona de liberación de gonadotropina (GmRH)
- Hormona de liberación de la hormona de crecimiento (GHRM)
- Hormona diurética de insecto
- 60 • Interleuquina
- Leutropina (LH/HCG)
- 65 • MET-encefalina
- Péptidos opioides

- Oxitocina
- Hormona paratiroides (PTH) y (PTHrP)
- Péptidos que activan la adenilciclase pituitaria (PACAP)
- Secretina
- Somatostatina
- Trombina
- Tirotropina (TSH)
- Péptido del intestino vasoactivo (VIP)
- Vasopresina
- Vasotocina
- Eicosanoides
 - IP - Prostaciclina
 - PG - Prostaglandinas
 - TX - Tromboxanos
- Compuestos a base de retinal
 - 11-cis retinal de vertebrado
 - 11-cis retinal de invertebrado
- Lípidos y compuestos a base de lípidos
 - Canabinoides
 - Anandamina
 - Ácido lisofosfatídico
 - Factor de activación de plaquetas
 - Leucotrienos
- Aminoácidos estimulantes e iones
 - Ión de calcio
 - Glutamato
- Receptores huérfanos

La presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque se determina la variación de:

- la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,
- y/o la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector.

La presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque se determina únicamente la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y

uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector.

En todos los casos, la medida de la variación de la cinética es suficiente para detectar un efector alostérico.

El interés de observar sólo la cinética de disociación reside en el hecho de que con concentraciones elevadas (saturantes) de ligando fluorescente, es posible que ninguna variación de amplitud sea detectable porque todos los sitios de unión están saturados.

La presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque se determina únicamente la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligando, en ausencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector.

En algunos casos, la medida sola de la amplitud es suficiente para detectar un efector alostérico, mientras que en otros casos, se debe de acoplar con la medida de la variación de la cinética.

Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, el procedimiento tal como se ha definido anteriormente se caracteriza porque el ligando es un antagonista.

Tal como se ha definido anteriormente, se recuerda que mediante el término “antagonista” se entiende cualquier molécula que inhibe el efecto del agonista uniéndose en el mismo receptor que este último.

Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, el procedimiento tal como se ha definido anteriormente se caracteriza porque el ligando es un agonista.

Tal como se ha definido anteriormente, se recuerda que mediante el término “agonista” se entiende cualquier molécula que se une al sitio del ligando endógeno natural y capaz de activar la respuesta biológica.

Cualquier sistema biológico complejo se puede describir mediante un modelo parcial que comprende un número de estados reducidos suficientes para describir el fenómeno observado. En el caso de los moduladores o efectores alostéricos, se usa un modelo parcial que comprende dos estados: el estado de reposo (R) y el estado activo (A) del receptor.

Así, se obtiene un equilibrio $R \leftrightarrow A$.

En este modelo, los ligandos presentan afinidades distintas para los estados R y A. De manera cualitativa, se puede describir las afinidades relativas K_R y K_A para respectivamente R y A de la siguiente manera, con $c = K_A/K_R$:

Afinidad para	Estado de reposo	Estado activo	c
Agonista	menos buena	mejor	$c < 1$
Antagonista competitivo	Mejor	menos buena	$c \geq 1$

En esta descripción, un agonista desplaza el equilibrio $R \leftrightarrow A$ a favor de A porque su afinidad es mejor para A que para R. Al inversa, el antagonista competitivo desplaza el equilibrio hacia R. Los intervalos de afinidad entre el estado R y el estado A varían de 1 vez ($c = 1$) (ninguna diferencia de afinidad) hasta más de 100 veces según el ligando ($c \geq 100$ o $c \leq 0,01$). Así, se obtiene, para el conjunto de ligandos de una diana, una paleta de moléculas agonistas ($c < 1$) o antagonistas ($c > 1$) de eficacia variable.

En la práctica, la asociación de un ligando con un sitio receptor se controla mediante la difusión de este ligando en el medio biológico. Diferencias de afinidad para un ligando dado, y para un sitio dado, resultan de una velocidad de disociación diferente de dicho ligando para el sitio en cada una de las conformaciones que éste puede adoptar. Al igual que para los agonistas, antagonista competitivos y efectores alostéricos. Resulta de todo eso que el efector alostérico, estabilizando por ejemplo una conformación de alta afinidad para el agonista, aumentará la proporción de los receptores en la conformación de alta afinidad, y por lo tanto conllevar a una disminución de la velocidad de disociación del agonista unido a su sitio. En una medida experimental de velocidad de disociación, se obtendrá una curva de disociación en función del tiempo cuya medida general será más lenta si el efector estabiliza estados de alta afinidad para el ligando fluorescente. Estas curvas se analizan correctamente según un modelo multiexponencial en el que las velocidades de disociación son idénticas, en presencia y ausencia de efector. Así, se obtendrán relaciones de concentración [reposo]/[activo] que diferirán cuando el agonista solo está presente, y cuando el agonista y el efector alostérico estén los dos presentes. De la misma manera, el experimento se puede realizar con un antagonista: en este caso, el efecto de los efectores alostéricos será de señal opuesta al que se observa para un agonista.

Si se efectúa una disociación después de la asociación con el equilibrio, se podrá revelar esta diferencia de afinidad entre R y A mediante una cinética de disociación que presenta un transcurso de tiempo monoexponencial ($0,01 \leq L_0 c \leq 100$) o biexponencial para $L_0 c > 100$ o $L_0 c < 0,01$. En el caso en el que la cinética es biexponencial, ésta se describe con la ayuda de 2 constantes de velocidad y 2 amplitudes, y la relación de las 2 amplitudes corresponde a la

concentración fraccional de cada uno de los estados. Cuando la cinética de disociación es biexponencial, se registra la suma de los eventos de disociación de cada uno de los estados de conformación.

Al igual que anteriormente, en el caso de los efectores, se pueden describir las afinidades relativas K_R y K_A para, respectivamente, R y A de la manera siguiente, con $c = K_A/K_R$:

	Afinidad para	Estado de reposo	Estado activo	c
	Efector positivo	menos buena	mejor	$c < 1$
10	Efector negativo	Mejor	menos buena	$c \geq 1$

En esta descripción, un efector positivo desplaza el equilibrio $R \leftrightarrow A$ a favor de A porque su afinidad es mejor para A que para R. A la inversa, el efector negativo desplaza el equilibrio hacia R.

Así, en el caso en el que existe dos estados, a saber un estado activo y un estado de reposo, la presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos (agonista), en presencia de dicho efector, es más lenta que la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, el ligando es un agonista: desplaza por lo tanto el equilibrio $R \leftrightarrow A$ hacia A (estado activo del receptor) para el cual tiene una afinidad más elevada y por lo tanto una velocidad de disociación más lenta, mientras que el efector alostérico desplaza también el equilibrio hacia A, lo que tiene por efecto el aumento de la amplitud de la disociación lenta y disminuir la amplitud de la disociación rápida.

En el caso en el que existe dos estados, a saber un estado activo y un estado de reposo, la presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos (agonista), en presencia de dicho efector, es más rápida que la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, lo que implica que el efector alostérico es un efector negativo. En este modo de realización preferido de la invención, el ligando es un agonista: desplaza por lo tanto el equilibrio $R \leftrightarrow A$ hacia A (estado activo del receptor) para el cual tiene una afinidad más elevada y, por lo tanto, una velocidad de disociación más lenta, mientras que el efector alostérico desplaza también el equilibrio hacia R, lo que tiene por efecto disminuir la amplitud de disociación lenta y aumentar la amplitud de disociación rápida.

En el caso en el que existen dos estados, a saber un estado activo y un estado de reposo, la presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos, en presencia de dicho efector, es más lenta que la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, lo que implica que el efector alostérico es un efector negativo. En este modo de realización preferido de la invención, el ligando es un antagonista: desplaza por lo tanto el equilibrio $R \leftrightarrow A$ hacia R (estado de reposo del receptor) para el cual tiene una afinidad más elevada y, por lo tanto, una velocidad de disociación más lenta, mientras que el efector alostérico estabiliza el estado de reposo, lo que tiene por efecto aumentar la amplitud de disociación lenta, disminuyendo al mismo tiempo la disociación rápida.

En el caso en el que existe dos estados, a saber un estado activo y un estado de reposo, la presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos, en presencia de dicho efector, es más rápida que la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, lo que implica que el efector alostérico es un efector positivo. En este modo de realización preferido de la invención, el ligando es un antagonista: desplaza por lo tanto el equilibrio $R \leftrightarrow A$ hacia R (estado de reposo del receptor) para el cual tiene una afinidad más elevada y, por lo tanto, una velocidad de disociación más lenta, mientras que el efector alostérico estabiliza el estado activo, lo que tiene por efecto disminuir la amplitud de disociación lenta, y aumentar la amplitud de disociación rápida.

En el caso en el que el receptor puede adoptar un número de conformaciones mayor que dos, conviene identificar las conformaciones ocupadas por el ligando fluorescente a fin de determinar en cual de los equilibrios de conformaciones porta el efecto del agente alostérico mencionado anteriormente.

Así, si existen tres estados de conformaciones R (reposo), A (activo) y D (desensibilizado), el agonista puede ocupar los estados A y D, mientras que el antagonista se unirá de manera preferencial al estado R o al estado D. De esto resultan efectos de naturaleza diferentes del agente alostérico según que se usará un agonista fluorescente o un antagonista fluorescente en los experimentos de medida de unión. El efector positivo (que estabiliza A) reducirá la unión del agonista al estado D. Habrá aumento de la velocidad de disociación mediante desaparición de una fracción de los receptores en el estado D que, generalmente, une el agonista con una afinidad más elevada que el estado A.

De la misma manera, si existen dos estados activos A1 y A2, un efector que estabiliza A1 tendrá por efecto reducir la unión a A2 (y disminuirá las respuestas asociadas a ellas) mientras que aumentará la unión a A1 (y potenciará las respuestas asociadas a ellas). En este caso, se observará un aumento de la velocidad de disociación del agonista fluorescente.

El análisis de las cinéticas de asociación del ligando es más complejo. En efecto, depende del sistema experimental analizado. Para ciertos receptores, y en ciertas condiciones experimentales, es posible observar cinéticas de asociación multiexponenciales. En este caso, la cinética más rápida refleja la interacción bimolecular del ligando (agonista o antagonista) con el receptor, mientras que las cinéticas más lentas pueden reflejar interconversiones de conformaciones que toman sitio más lentamente. Si esto se observa experimentalmente, es posible entonces analizar las amplitudes de las cinéticas lentas, y observar variaciones de estas amplitudes en presencia de un efector alostérico. Estas variaciones reflejaron la estabilidad diferencial de los diversos estados de conformaciones por el efector alostérico. En otros casos desfavorables, las interconversiones de conformaciones son cinéticamente invisibles, porque son más rápidas que la cinética de asociación bimolecular del ligando con el receptor. Entonces, el efecto de un efector alostérico sobre la velocidad de asociación no es detectable experimentalmente.

El análisis de las respuestas es una manera de seguir el estado activo del receptor. En efecto, se define el estado activo como siendo un estado de conformación provisto de la capacidad de producir la respuesta biológica. El análisis de las respuestas debe de referirse a varios parámetros:

Uno de los parámetros más sencillo a evaluar es la amplitud de la respuesta. Ésta será más elevada en presencia de un efector alostérico positivo y más baja cuando el efecto alostérico es negativo.

El segundo parámetro es el del tiempo: a veces, es posible detectar un tiempo de establecimiento más corto para respuestas potenciadas y, a la inversa, un tiempo más largo para respuestas inhibidas, en comparación con una respuesta de control. En este caso, que es el de los receptores acoplados con las proteínas G, la acumulación transitoria de proteínas de relevo activadas (la proteína G) o de mensajeros secundarios (trifosfatos de inositol, AMPc, etc.), la aparición de la respuesta puede aparecer con un tiempo menor cuando hay potenciación.

Finalmente, cuando varias respuestas se pueden iniciar mediante un receptor, el análisis de comparación de las amplitudes (y/o de los tiempos) de las diversas respuestas puede aportar indicaciones sobre la naturaleza del efecto modulador.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, mediante determinación de:

- la variación de la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector y, eventualmente
- la variación de la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector.

La presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque se determina únicamente la variación de la amplitud de unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efecto alostérico, con relación a la amplitud de unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector, cuando dicha variación es positiva.

La presente invención se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque se determina:

- la variación de la amplitud de unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la amplitud de unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,

y que dicha variación es negativa, lo que necesita la determinación de:

- la variación de la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector.

Este modo de realización permite así distinguir un efector alostérico de un agente competitivo.

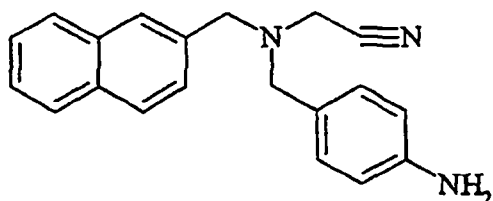
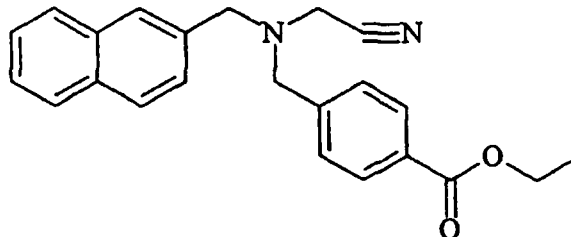
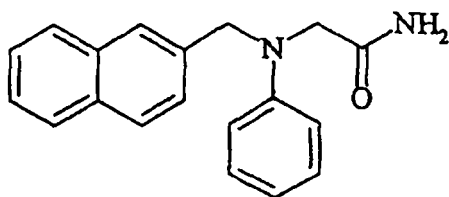
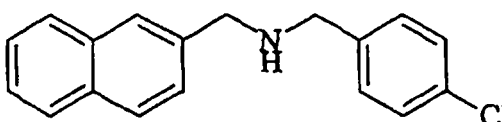
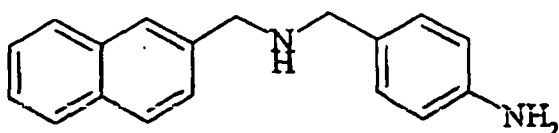
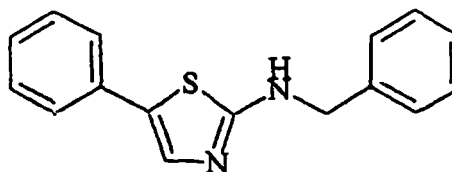
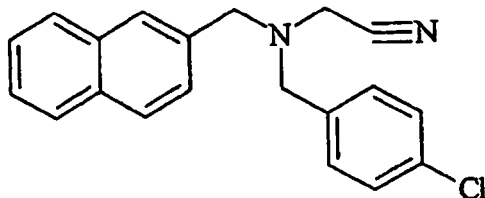
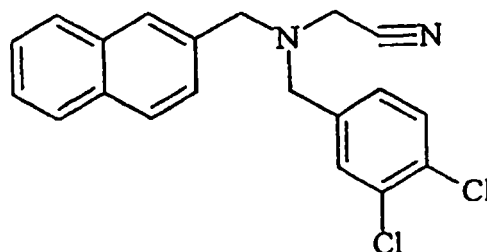
Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, el procedimiento de la invención se caracteriza porque dicha variación de cinética de disociación es positiva o negativa, lo que implica que el compuesto ensayado es un efector alostérico. Si dicha variación de cinética de disociación es nula, esto implica que el compuesto ensayado es un competidor.

En el caso de receptores acoplados a las proteínas G, se distinguen casos complejos porque pueden existir varios estados activos de un receptor (Palanché *et al.*, 2001; Lefkowitz, 1998). En este caso, los distintos estados activos están provistos de propiedades funcionales distintas, es decir, que regulan respuestas que pueden diferir unas de otras. Enton-

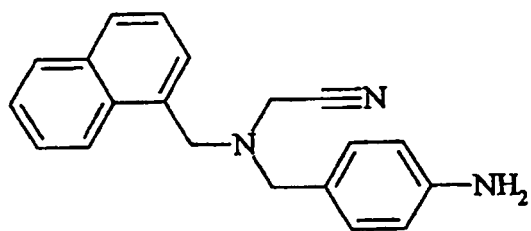
ces, el efector alostérico puede tener un comportamiento que discrimina los estados activos entre sí. Así, privilegiando la estabilización de un estado activo escogido entre varios, el efector puede comportarse como modulador positivo de una respuesta dada, comportándose al mismo tiempo como un modulador negativo de las respuestas asociadas a los demás estados activos. Se definirá entonces el carácter positivo y/o negativo frente a una respuesta biológica dada.

El efector puede modular una respuesta desconocida del receptor. Así, en el caso en el que no se observa ningún efecto sobre una respuesta conocida en el receptor, la presente invención permite buscar otras respuestas del receptor.

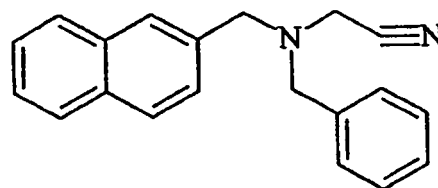
Se han identificados productos que responden a una de las siguientes fórmulas:

A11**G11****H10****H6****H3****F3****801****803**

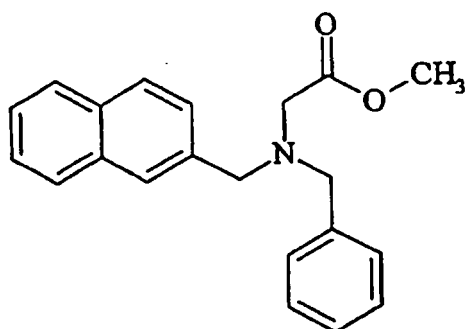
804



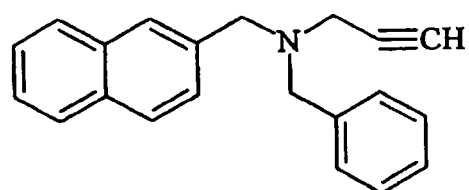
805



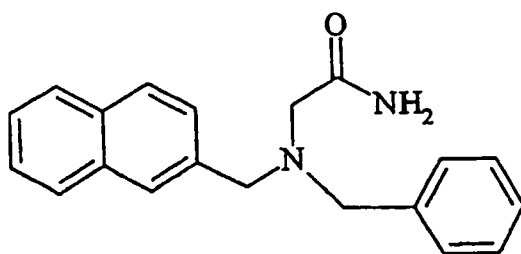
806



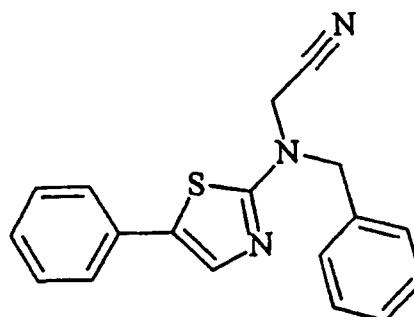
808



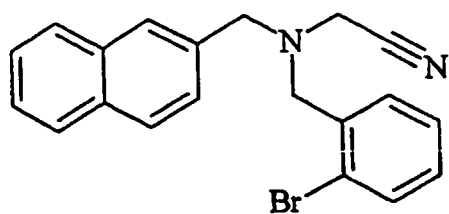
807



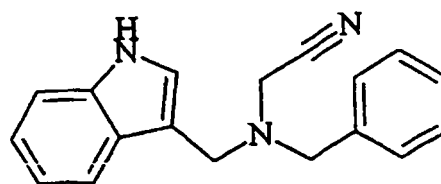
809

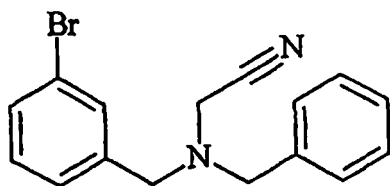
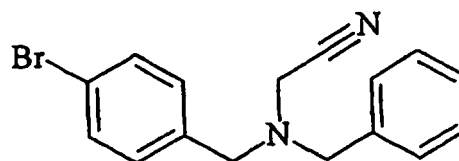
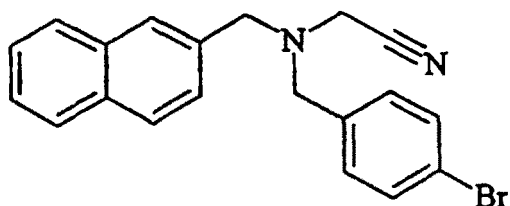
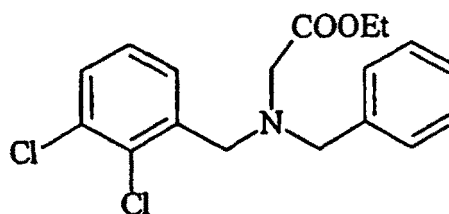
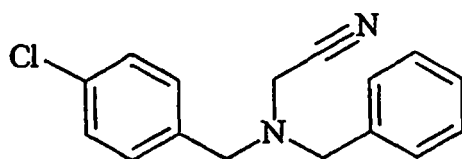
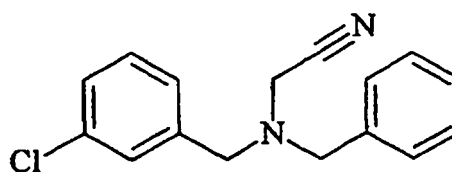
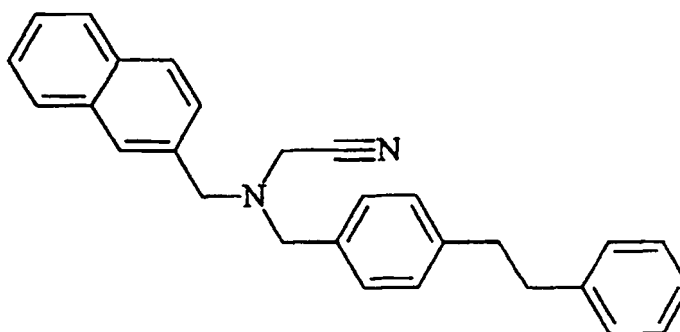


CV1-80



CV1-81



CV1-84**CV1-85****CV1-93****CV1-97****CV1-122****CV1-123****CV1-135**

siendo dichos productos compuestos tales como se detectaron mediante el procedimiento indicado anteriormente.

Los productos de fórmula A11, G11, H10, H6, H3, F3, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, CV1-80, CV1-81, CV1-84, CV1-85, CV1-93, CV1-97, CV1-122, CV1-123, CV1-131 y CV1-135 son nuevos en sí.

Las tablas 1 y 2 siguientes resumen el conjunto de los datos experimentales adquiridos para las moléculas G6, A11, G11, F3, H6, F9, H3, F7, H10, NP234 (o 801), NP 246 (o 803), 804, 805, 806, 808, 807, 809, CV1-80, CV1-81, CV1-84, CV1-85, CV1-93, CV1-97, CV1-122, CV1-123 y CV1-135, cuyas estructuras se indican en columnas.

En la tabla 1, la columna "código" corresponde al nombre de uso; la columna "EC50" corresponde a la concentración de compuesto que provoca un aumento de 50% (con relación al valor máximo) del porcentaje de la amplitud de la velocidad de disociación rápida; la columna "%a1 (max)" corresponde al valor máximo observado para el aumento de amplitud de la velocidad de disociación rápida; la columna "IC50" corresponde a la concentración de compuesto para la cual se observa una disminución de 50% de unión de 20 nM de NKA-Bo al receptor EGFP-NK2R; la columna "Rep

Ca” corresponde a la capacidad de cada compuesto para evocar una respuesta cálcica sobre células que no expresan el receptor EGFP-NK2R, y la columna “inhib AMPc” indica la capacidad de cada compuesto para inhibir la respuesta de producción de AMPc originada por NKA.

En la tabla 2, la columna “código” corresponde al nombre de uso; la columna “EC50” corresponde a la concentración de compuesto que provoca un aumento de 50% (con relación al valor máximo) del porcentaje de la amplitud de la velocidad de disociación rápida; la columna “% al (con 10 μ M)” significa que los compuestos se ensayaron únicamente con 10 μ M, y se compararon con los valores determinados para 805 ($T = 22 \pm 1$ representa la amplitud de disociación rápida en ausencia de efector); la columna “% de inversión de enlace (al 10 μ M)” significa que los compuestos se ensayaron únicamente con 10 μ M y se compararon con los valores determinados para 805.

Entre todos los compuestos, el compuesto 805 fue objeto de un estudio de la potenciación de las respuestas cálcicas originadas por NKA o NKA truncada sobre los receptores NK2R salvaje de humano, NK1R salvaje de humano, o EGFP-NK2R.

TABLA 1

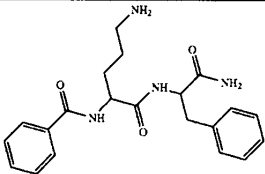
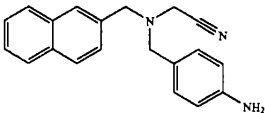
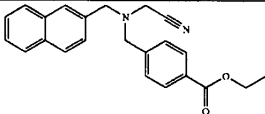
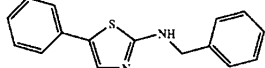
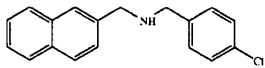
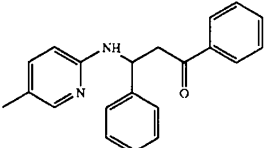
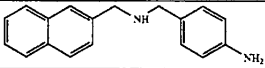
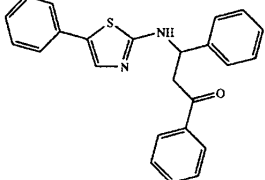
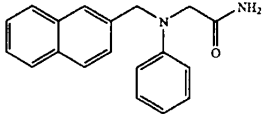
Código	Estructura	Nombre IUPAC	EC50 (μ M)	% al (max.)	IC50 (μ M)	Resp. Cá	Inhib. AMPc
G6		N-(4-amino-1-(1-carbamoyl-2-fenil-etilcarbamoyl)-butil)-benzamida	ns	Ns	46	nt	nt
A11		[(4-Aminobencil)-naftalen-2-ilmetil-amino]-acetonitrilo	38-44	≥ 90	100	ns	++
G11		Éster etílico del ácido 4-[(Cianometil-naftalen-2-ilmetil-amino)-metil]-benzoico	10-30	70	>100	ns	nt
F3		Bencil-(5-fenil-tiazol-2-il)-amino	1-5	65	100	++	+
H6		(4-Cloro-bencil)-naftalen-2-ilmetil-amino	50-80	80	>100	++	++
F9		3-(5-Metil-piridin-2-ilamino)-1,3-difenil-propan-1-ona	ns	Ns	>50	++	nt
H3		4-[(Naftalen-2-ilmetil)-amino]-metil-fenilamino	ns	Ns	>50	ns	nt
F7		1,3-Difenil-3-(5-fenil-tiazol-2-ilamino)-propan-1-ona	≥ 50	≥ 60	90	ns	nt
H10		2-(Naftalen-2-ilmetil-fenil-amino)-acetamida	>50	>60	≥ 100	ns	nt

TABLA 1 (continuación)

Código	Estructura	Nombre IUPAC	EC50 (μM)	% al (max.)	IC50 (μM)	Resp. Cá	Inhib. AMPc
NP 234 801		[(4-clorobencil)(2-naftilmetil)amino]-acetonitrilo	5-10	60-70	110	ns	++
NP 246 803		[(3,4-diclorobencil)(2-naftilmetil)amino]-acetonitrilo	10-30	60-70	>500	ns	nt
804		[(4-aminobencil)(1-naftilmetil)amino]	20-30	≥ 80	>100	ns	nt
805		[bencil(2-naftilmetil)amino]-acetonitrilo	3-8	80	>500	ns	++
806		[bencil(2-naftilmetil)amino]acetato de metilo	10-20	90	>200	ns	nt
808		N-bencil-N-(2-naftilmetil)-N-prop-2-inilamino	20-30	≥ 70	>200	+	nt
807		2-[bencil(2-naftilmetil)amino]-acetamida	?	≥ 90	100	+ ?	nt
809		[bencil(5-fenil-1,3-tiazol-2-il)amino]acetonitrilo	1-20	≥ 75	>100	nt	nt

Ns: no significativo; nt: no ensayado; ?: no interpretado

TABLA 2

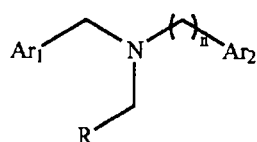
Código	Estructura	Nombre IUPAC	EC50 (μM)	% al (con 10 μM) T=22±1	% de inversión de enlace (a 10 μM)	Resp. Ca
805			8	29 (10 μM) 45 (50 μM)	1 (10 μM) 9 (50 μM)	Ns
CV1-80		[(2-bromobencil)(2-naftilmetil)amino]-acetronitrilo	nt	25	16	Nt
CV1-81		bencil(1H-indol-3-ilmetil)amino]-acetronitrilo	nt	22	15	Nt
CV1-84		bencil(3-bromobencil)amino]-acetronitrilo	nt	25	4	Nt
CV1-85		bencil(4-bromobencil)amino]-acetronitrilo	Nt	28	4	Nt
CV1-93		[(4-bromobencil)-naftilmetil]amino]-acetronitrilo	Nt	26	3	Nt
CV1-97		[bencil(2,3-diclorobencil)amino]-acetronitrilo	Nt	34	15	Nt
CV1-122		[bencil(4-amino)-acetronitrilo	Nt	31	17	Nt
CV1-123		[bencil(3-clorobencil)amino]-acetronitrilo	Nt	26	7	Nt
CV1-135			Nt	22	6	Nt

Ns: no significativo; nt: no ensayado; ?: no interpretable

Los compuestos citados se reúnen en dos grandes familias: familia I y familia II.

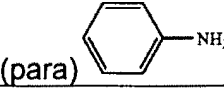
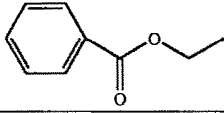
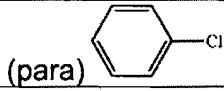
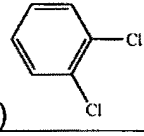
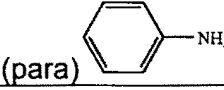
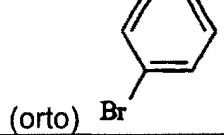
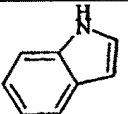
La familia I agrupa los compuestos A11, G11, H10, 801, 803, 804, 805, 806, 808, 807, CV1-80, CV1-81, CV1-84, CV1-85, CV1-93, CV1-97, CV1-122, CV1-123 y CV1-135.

Estos compuestos corresponden a la fórmula general siguiente:



(I)

en la que n es igual a 0 ó 1, Ar₁ y Ar₂ representan grupos aromáticos sustituidos mono- o bicíclicos, y R representa un grupo electroatractivo tal como CN, COOMe o CONR₁R₂ o un grupo insaturado tal como un grupo alqueno o alquino.

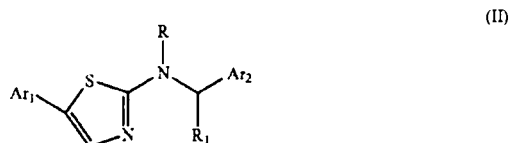
Compuesto	n	Ar ₁	Ar ₂	R
A11	1	β-naftilo	(para) 	C≡N
G11	1	β-naftilo		C≡N
H10	0	β-naftilo		CONH ₂
801	1	β-naftilo	(para) 	C≡N
803	1	β-naftilo	(para y meta) 	C≡N
804	1	α-naftilo	(para) 	C≡N
805	1	β-naftilo		C≡N
806	1	β-naftilo		COOCH ₃
808	1	β-naftilo		C≡CH
807	1	β-naftilo		CONH ₂
CV1-80	1	β-naftilo	(orto) 	C≡N
CV1-81	1			C≡N

CV1-84	1			C≡N
CV1-85	1			C≡N
CV1-93	1	β-naftilo		C≡N
CV1-97	1	(orto y meta) 		COOEt
CV1-122	1	(para) 		C≡N
CV1-123	1	(meta) 		C≡N
CV1-135	1	β-naftilo		C≡N

Los compuestos H6 y H3 son intermedios de síntesis que permiten la obtención de los compuestos de la familia I mencionada anteriormente.

La familia II agrupa los compuestos F3, F7 y 809.

Estos compuestos corresponden a la fórmula general siguiente:



en la que Ar₁ y Ar₂ representan grupos aromáticos, R representan un átomo de hidrógeno o un grupo -CH₂CH₃; y R₁ es un átomo de hidrógeno o un grupo CH₂COΦ.

Ya se conocen los compuestos F7 y F9, y se describen en el artículo de Moutou *et al.* (1994).

Por otra parte, ya se conoce el compuesto G6 de la tabla 1, y se describe en la solicitud internacional WO 02/24192.

Modos de preparación de los compuestos mencionados anteriormente

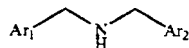
1- Modo de preparación de los compuestos de la familia I

A) Primera etapa: preparación de las aminas secundarias

A una disolución de aldehído aromático apropiado (1 eq.) en el metanol, se añade amina primaria (1 eq.) (véase tabla a continuación). El medio de reacción se calienta a 60°C durante dos horas, y después se enfría rápidamente hasta 0°C. Después, se añade NaBH₄ (2 eq.), y se agita durante algunos minutos, y después se vuelve a poner a temperatura ambiente durante una hora. Después de la evaporación de la disolución, se extrae mediante AcOEt lavando con agua,

y después con una disolución saturada de NaCl. Se seca con Na₂SO₄, se filtra sobre fritas, y se evapora hasta sequedad. La amina secundaria así aislada, más generalmente en forma de un aceite, se usa tal cual sin ninguna purificación adicional.

La amina secundaria así obtenida corresponde a la siguiente fórmula:



en la que Ar₁ y Ar₂ son tales como se ha definido anteriormente.

Un ejemplo de reacción que corresponde a la etapa 1 (aquí obtención del compuesto H3) es:

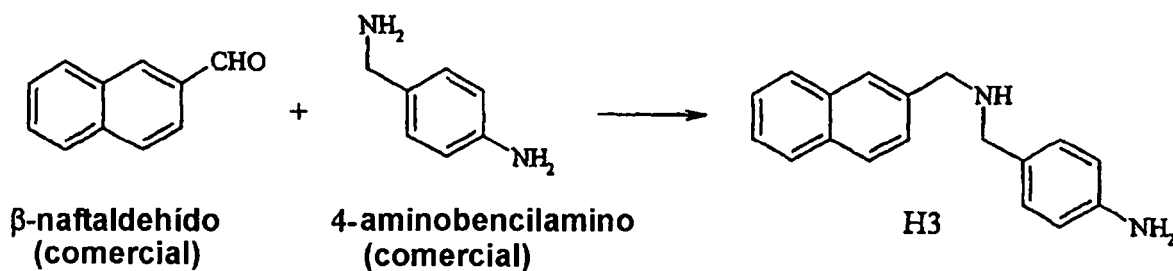


Tabla recapitulativa de los productos de partida:

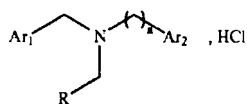
Producto final obtenido al final de la etapa 2	Aldehído de partida	Amina de partida
H3	β -naftaldehído	4-aminobencilamino
A11	β -naftaldehído	4-aminobencilamino
G11	β -naftaldehído	4-etoxicarbonilbencilamino
H6	β -naftaldehído	4-clorobencilamino
H4	β -naftaldehído	Bencilamino
H10	β -naftaldehído	Anilina
801	β -naftaldehído	4-clorobencilamino
803	β -naftaldehído	3,4-diclorobencilamino
804	β -naftaldehído	4-aminobencilamino
805	β -naftaldehído	Bencilamino
806	β -naftaldehído	Bencilamino
808	β -naftaldehído	Bencilamino
807	β -naftaldehído	Bencilamino
CV1-80	β -naftaldehído	2-bromobencilamino
CV1-81	β -naftaldehído	Indol-3-metilamino
CV1-84	3-bromobenzaldehído	Bencilamino
CV1-85	4-bromobenzaldehído	Bencilamino
CV1-93	β -naftaldehído	4-bromobencilamino
CV1-97	3,4-diclorobenzaldehído	Bencilamino
CV1-122	4-clorobenzaldehído	Bencilamino
CV1-123	3-clorobenzaldehído	bencilamino

B) Segunda etapa: preparación de las aminas terciarias

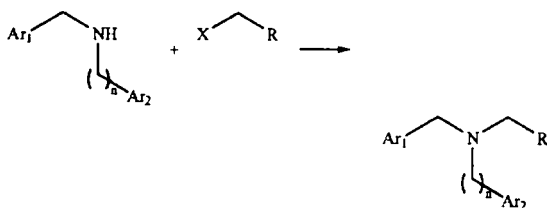
La amina secundaria (1,1 eq.), obtenida en la etapa anterior, se disuelve en dimetilformamida, y se añade halogenuro de alquilo (cloroacetoniitrilo, cloruro de propargilo, etc.) (véase más adelante). La disolución se calienta a reflujo durante 12 horas, y después se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Después se extrae con éter (10 veces más en volumen que DMF), y se lava con agua, y después con una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con

Na₂SO₄, y después se evapora hasta sequedad. El producto bruto se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice (AcOt 1/Hex 9). Los hidrocloruros se preparan mediante barbotaje de HCl gaseoso en AcOEt.

Se obtienen entonces dichos compuestos, en forma de clorhidrato, de fórmula tal como se define a continuación:



Más precisamente, esta segunda etapa corresponde al esquema de reacción siguiente:



Por lo tanto, las aminas secundarias se hacen reaccionar con distintos halogenuros comerciales.

Para los compuestos A11, G11, 801, 803, 804, 805, CV1-80, CV1-81, CV1-84, CV1-85, CV1-93, CV1-122, CV1-123 y CV1-135, se usa cloroacetnitrilo.

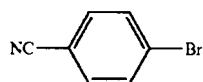
Para los compuestos 806 y CV1-97, se usa bromuro o cloroacetato de etilo o de metilo.

Para los compuestos H4, H10 y 807, se usa bromo o cloroacetamida.

Para el compuesto 808, se usa bromuro y cloruro de progargilo.

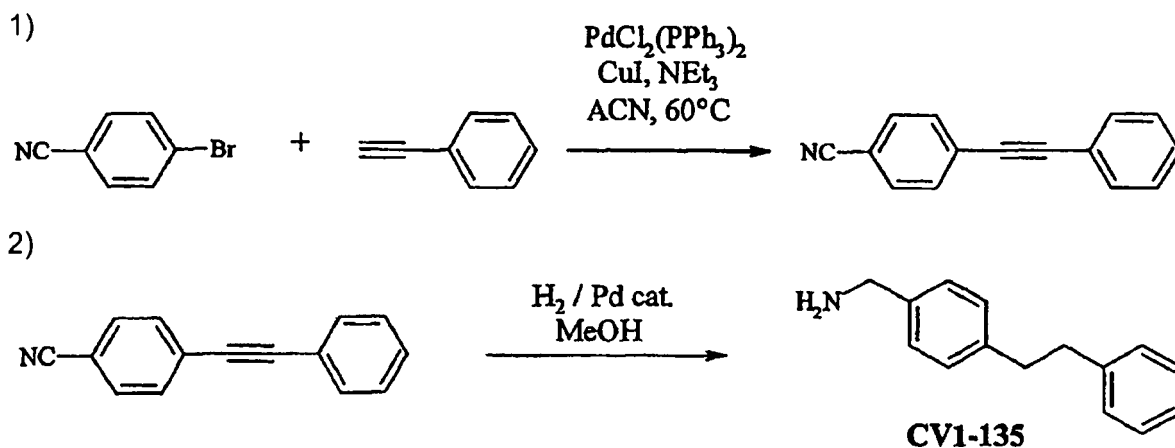
Con referencia al compuesto CV1-135, éste se obtiene según un modo de realización particular, tal como se describe a continuación:

Se disuelve en acetonitrilo el 4-bromobenzonitrilo de fórmula:



así como el catalizador PdCl₂(PPh₃)₂, del ioduro de cobre CuI, la base NEt₃ y fenilacetileno. El medio de reacción se calienta durante una noche a 50-60°C. Se evapora al final de la reacción, y se purifica mediante cromatografía en columna de sílice.

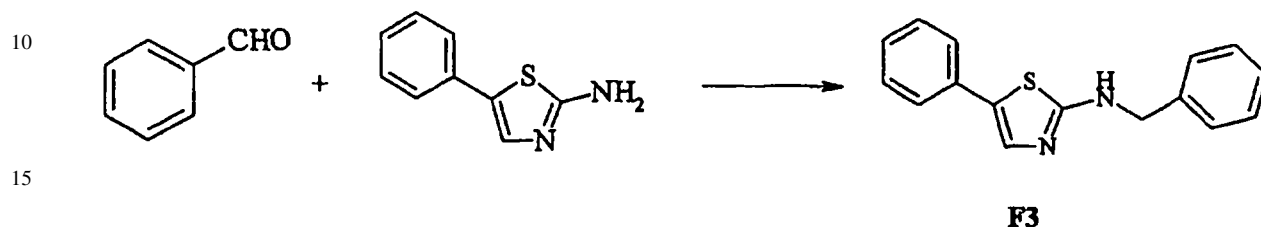
Este modo de realización corresponde al esquema de reacción siguiente:



II - Modo de preparación de los compuestos de la familia II

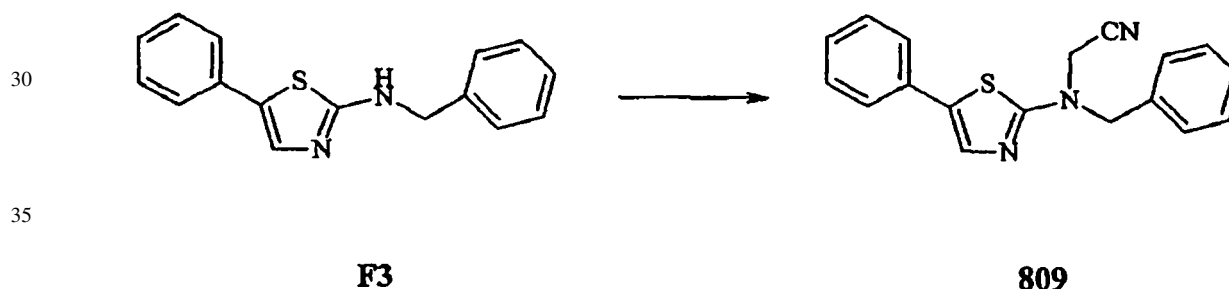
El 5-fenil-2-bencilaminotiazol se obtiene a partir de 5-fenil-2-aminotiazol mediante condensación con benzaldehído, seguido de una hidrogenación. Después, el compuesto obtenido se alquila mediante cloroacetonitrilo (véase modo de realización I).

El compuesto F3 se obtiene según el siguiente esquema de reacción:



20 A una disolución de 5-fenil-2-aminobenciltiazol (1 eq.) en DMF enfriado hasta 0°C, se añade NaH (1,3 eq.). El medio de reacción se agita durante 15 minutos, y después se añade gota a gota el cloroacetonitrilo (1 eq.). Se sigue agitando a temperatura ambiente durante 8 horas, después la disolución se diluye con agua. Después de la extracción con acetato de etilo, la fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro, y se evapora. El producto bruto de reacción se purifica mediante cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt 1/hexano 2).

25 Se obtiene así, por ejemplo, el compuesto 809: ((5-fenil-tiazol-2-il)-N-bencil)acetonitrilo $C_{18}H_{15}N_2S$ (305, 40 g.mol⁻¹) en forma de un polvo beige, según el siguiente esquema de reacción:



40 RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): 4,42 (s, 2H); 4,70 (s, 2H); 7,30-7,51 (m, 11H)

Descripción detallada de la invención

45 En su forma de realización preferida, el desarrollo de la invención usa el ADNc que codifica la proteína fluorescente verde (Prasher *et al.*, 1992) de la medusa *Aequorea victoria*, preferentemente los mutantes EYFP, EGFP y ECFP de esta proteína optimizada para su expresión en los organismos hospedantes preferidos, las células mamíferas.

El ADNc se puede modificar para codificar una variante en la que uno o varios aminoácidos están sustituidos, insertados o suprimidos a fin de permitir su fusión, en N o en C-terminal con el gen que codifica un receptor.

50 El receptor se puede seleccionar de entre:

- 1) los receptores de neurotransmisores acoplados con proteínas G estructuralmente unidas a los receptores adrenérgicos y receptores metabotrópicos del glutamato en la lista actualizada anualmente y editada en las bases de datos GPCRdb (<http://www.gcrdb.uthscsa.edu> o <http://www.gpcr.org>), ensembl (<http://www.ensembl.org>) entre otros.
- 2) los receptores-canales estructuralmente unidos a los receptores nicotínicos, a los receptores del glutamato y a los receptores del ATP, tales como se presentan en la lista actualizada anualmente y editada en las bases de datos GPCRdb (<http://www.gcrdb.uthscsa.edu> o <http://www.gpcr.org>), ensembl (<http://www.ensembl.org>) entre otros.
- 3) los receptores nucleares que poseen un campo de interacción con el ADN estructuralmente unidos al receptor de los esteroides (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Wurtz *et al.*, 1996).
- 4) los receptores de la membrana plasmica con actividad de tirosina quinasa estructuralmente unidos al receptor de la insulina (Yarden, Y. y Ullrich, A., 1988).

- 5) los receptores de membranas unidos a las proteínas de tirosina quinasa (STATs, TYK2, Jak), estructuralmente unidos al receptor del interferón γ (Brisco *et al.*, 1996; Ihle, 1995).

En el caso en el que la fusión se efectúa entre EGFP y un receptor enlazado a las proteínas G (grupo 1), la fusión se puede efectuar especialmente:

- 1) del lado N-terminal del receptor y, por lo tanto, del lado C-terminal de EGFP,
- 2) del lado C-terminal del receptor y, por lo tanto, del lado N-terminal de EGFP,
- 3) en la secuencia del receptor, en particular en el primer o tercer bucle intracelular, introduciendo eventualmente una o varias copias de una secuencia espaciadora, especialmente -GGGGS-.

En el caso en el que la fusión se efectúa entre EGFP y un receptor-canal (grupo 2), la fusión se puede efectuar especialmente:

- 1) en la región homóloga a la "región inmunogénica mayor" de la subunidad α del receptor nicotínico de Torpilla (restos 67-76), introduciendo eventualmente una o varias copias de una secuencia espaciadora, especialmente -GGGGS-.

En el caso en el que la fusión se efectúa entre EGFP y un receptor nuclear (grupo 3), la fusión se puede efectuar especialmente:

- 1) del lado N-terminal del receptor y, por lo tanto, del lado C-terminal de EGFP,
- 2) del lado N-terminal del receptor, truncado en su parte N-terminal aguas arriba del dominio de unión con el ADN y, por lo tanto, del lado C-terminal de EGFP.

En el caso en el que la fusión se efectúa entre EGFP y un receptor con actividad de tirosina quinasa, o bien acoplado con una tirosina quinasa (grupos 4 y 5), la fusión se puede efectuar especialmente:

- 1) del lado N-terminal del receptor y, por lo tanto, del lado C-terminal de EGFP.

Se podría usar, en esta invención, cualquier gen que codifica una proteína fluorescente, especialmente GFP, acoplado con un receptor, y que deriva de organismos que expresan GFP, o proteínas similares.

Las secuencias de ADN que codifican GFP y las proteínas diana, especialmente receptores, pueden ser de origen genómico o ADNc, y se pueden obtener a partir del ADN de cualquier especie animal o vegetal, eucariota o procariota, por ejemplo, preparando bancos genómicos o bancos de ADNc, y cribando estos bancos para identificar las secuencias que codifican mediante hibridación sondas oligonucleotídicas mediante las técnicas estándares (Current Protocols in Molecular Biology, citado más abajo).

Las construcciones de ADN que codifican GFP y las proteínas diana también se pueden obtener mediante síntesis total, mediante los métodos estándares, especialmente el método de fosforamido (Beaucage y Caruthers, 1981), y el uso de aparatos de síntesis de ADN automatizados, siendo después los polinucleótidos obtenidos purificados, enlazados y clonados en los vectores apropiados. Para la mayoría de las aplicaciones, los genes que codifican GFP y las proteínas diana se obtendrán preferentemente mediante cribado de bancos, mientras que los brazos espaciadores así como los oligonucleótidos requeridos para la mutagénesis se obtendrán preferentemente mediante síntesis.

Las construcciones de ADN podrán ser de naturaleza mixta, sintética y genómica, mediante enlace de fragmentos sintéticos con elementos de ADN genómico, según los procedimientos estándares (Current Protocols in Molecular Biology, citado más abajo).

Las construcciones de ADN también se pueden obtener mediante PCR ("reacción en cadena de polimerasa") usando cebadores específicos, tal como se describe, por ejemplo, en PCR Protocol 1990, Academic Press, San Diego, California, USA.

Finalmente, las construcciones de ADN se pueden modificar mediante otros métodos que incluyen, por ejemplo, reacciones químicas de la mutagénesis aleatoria o dirigida, mediante inserción, supresión o sustitución de nucleótidos, pudiendo estas modificaciones alterar propiedades de una u otra proteína, especialmente GFP y las proteínas diana.

Las construcciones de ADN se pueden insertar en un vector recombinante. Este vector puede ser cualquier vector apropiado para los procedimientos usados con vectores recombinantes. La elección del vector se efectuará, frecuentemente, en función de la célula hospedante en la que la construcción autónoma, es decir extracromosómico, es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector se podrá elaborar de manera a integrar todo o parte del ADN que este contiene en el genoma de la célula hospedante, y se replicará al mismo tiempo que el (los) cromosoma(s) en el que se integrará.

ES 2 273 026 T3

El vector es, preferentemente, un vector de expresión en el que GFP fusionada con el receptor o GFP fusionada con el ligando está bajo el control de otros segmentos de ADN requeridos para la transcripción. Generalmente, el vector de expresión deriva de ADN plasmídico o vírico, o puede contener elementos de uno y de otro.

La expresión “bajo el control” indica que los segmentos de ADN están dispuestos sobre el vector de manera a funcionar concertadamente para llegar al objetivo deseado, por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y se continua a lo largo de la secuencia que codifica el receptor fusionado con GFP o el ligando fusionado con GFP.

El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN susceptible de promover una actividad transcripcional en la célula hospedante elegida, y se puede derivar de gen homólogos o heterólogos de la célula hospedante.

Ejemplos de promotores que convienen para la expresión del receptor fusionado con GFP o del ligando fusionado con GFP en células mamíferas son, el promotor del virus del simio SV40 (Subramani *et al.*, 1981), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) o el promotor tardío mayor del adenovirus (AdMLP).

Ejemplos de promotores para células de insectos

Promotor de la polihedrina (documento US 4.745.051; Vasuvedan *et al.*, 1992), el promotor P10 (Vlack *et al.*, 1988), el promotor del gen precoz 1 del baculovirus (documentos US 5.155.037; US 5.162.222).

Ejemplos de promotores para levaduras

Promotores de los genes de la glicólisis (Hitzeman *et al.*, 1980; Alber y Kawasaki, 1982), de los genes de los alcoholes deshidrogenados (Young *et al.*, 1982).

Ejemplos de promotores para bacterias

Ejemplos de promotores para la expresión en la bacteria pueden ser promotores constitutivos tal como el promotor de la polimerasa T7, o promotores inducibles tales como, por ejemplo, el promotor pL del fago lambda (Current Protocols in Molecular Biology, citado más abajo).

Ejemplos de promotores para hongos filamentosos

Los promotores que se puede usar son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight *et al.*, 1985) o el promotor tpiA. Otros promotores útiles pueden ser derivados de los genes que codifican el asparto proteinasa de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* o el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori*.

Por otra parte, el vector podrá contener:

- secuencias de poliadenilación tal como, por ejemplo, aquellas de SV40 o de la región Elb 5 del adenovirus,
- secuencias activadoras (potenciadoras) de la transcripción (el activador SV40),
- secuencias de replicación tal como, por ejemplo, las secuencias de replicación de SV40 o del virus de Epstein Barr, para las células mamíferas, o el origen y los genes de replicación REP 1-3 del plásmido 2 μ , para levaduras,
- marcadores de selección, a saber genes que confieren una resistencia a un antibiótico (neomicina, zeocina, higromicina, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloroamfenicol, etc.) o que permiten la compensación de un defecto (gen que codifica la dihidrofolato reductasa que permite la resistencia al metotrexato, o gen TPI de *S. pombe* descrito por Russell (1985).

La célula hospedante puede ser cualquier célula capaz de expresar la construcción de ADN insertada en un vector apropiado.

Las células pueden ser, especialmente, bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores tal como, por ejemplo, células mamíferas.

Ejemplos de células bacterianas capaces de expresar las construcciones de ADN son:

- bacterias gram-positivas tales como las cepas de *Bacillus* tal como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. thurigiensis* o cepas de *Streptomyces* tales como *S. lividans*, *S. murinus*,
- bacterias gram-negativas tales como *Escherichia coli*.

La transformación de las bacterias se puede efectuar mediante transformación protoplástica o mediante transformación de bacterias competentes (Current Protocols in Molecular Biology, citado más abajo).

Ejemplos de células eucariotas

Líneas celulares HEK 293, cultivos primarios, células COS (por ejemplo ATCC CRL 1650), BHK (por ejemplo ATCC CRL 1632), CHO (por ejemplo ATCC CCL 61).

Los métodos de introducción del ADN en estas células (transfección, lipofección, electroporación, etc.) se describen en Current Protocols in Molecular Biology, citado más abajo.

Ejemplos de células de levaduras

Saccharomyces, *S. cerevisiae*, *S. klyveri*,

Kluiveromyces, *K. lactis*,

Hansenula, *H. polymorpha*,

Pichia, *P. pastoris*,

transformadas mediante introducción de AND heterólogo según los protocolos descritos en Current Protocols in Molecular Biology, citado más abajo.

Las células transformadas se seleccionan mediante un fenotipo determinado por un marcador de resistencia, generalmente una droga, o mediante su capacidad a proliferar en ausencia de un nutrimento particular.

Ejemplos de hongos filamentosos

Las cepas *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. niger*), *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma*. El uso de *Aspergillus* para la expresión de proteínas se describe en los documentos EP 272.277 o EP 230.023 o EP 184.438.

Ejemplos de células de insectos

Se pueden citar las líneas de *Lepidoptera*, por ejemplo, *Spodoptera frugiperda* (Sf9) o *Trichoplusia ni* (Tni). Los métodos de transformación (particularmente la infección) se describen en Current Protocols in Molecular Biology (citado más abajo).

Los ligandos

Los ligandos que interactúan con el receptor pueden ser de cualquier origen (natural, sintético, semisintético, recombinante), y de cualquier estructura (química, peptídica, proteica). Pueden ser naturalmente fluorescentes (o portadores de un cromóforo) o pueden necesitar una reacción química que permite el injerto de un grupo fluorescente (o de un precursor de grupo fluorescente) o de un cromóforo, o bien una construcción de ADN que conduce a la fusión del ligando con GFP y que permite la expresión del ligando así producido fluorescente.

Ejemplos de reacciones químicas son:

- acoplamiento de *aminas o de tiol* con reactivos de tipo halogenuro de alquilo, halogenuros de arilos, halogenuros de ácidos, el grupo isotiocianato, el grupo maleimido, epóxidos, en un disolvente orgánico en presencia de una base o en un medio acuoso,
- acoplamiento de ácidos con aminas activadas mediante grupos tales como succinimida.

Según el procedimiento de la invención, la fluorescencia de las células transformadas se puede medir en un espectrofluorímetro con la ayuda del cual las propiedades espectrales de las células, en suspensión o adherentes, se pueden determinar mediante la adquisición de sus espectros de estimulación y de emisión. Después, las interacciones con el ligando fluorescente se detectan mediante los cambios de espectros de estimulación y/o de emisión del donante y del receptor de energía, y los ligandos se definen como farmacológicamente significativos si sus interacciones con el receptor están inhibidos mediante la adición de un exceso de ligando no fluorescente que impide la interacción entre el receptor fluorescente y el ligando fluorescente.

Medidas de la unión

Las medidas de las cinéticas de asociación y/o disociación se efectúan mediante todos los medios que permite monitorizar la formación o la disociación del complejo entre el ligando marcado y el receptor marcado, de manera continuo o discontinuo, de tal forma que se puede determinar los parámetros cinéticos de la asociación y de la diso-

ciación, a saber la(s) constante(s) de velocidad, así como la o las amplitudes relativas asociadas a cada etapa cinética de asociación y/o disociación.

En su realización preferida, las cinéticas, cuyas constantes de velocidad aparentes son mayores que $0,1 \text{ S}^{-1}$, se monitorizaron con la ayuda de un aparato de mezcla rápida conectado a un dispositivo de estimulación y de detección de fluorescencia (figura 1). Las muestras a mezclar se colocaran en jeringas (u otros contenedores) de mezclamiento, y después se mezclarán rápidamente. En este contexto, “rápidamente” quiere decir que el contenido de las jeringas se propulsa con un caudal mayor o igual que 4 ml/seg para una cámara de observación de $100 \mu\text{l}$, tal como se describe, por ejemplo, en Palanché *et al.* (2001).

En el caso en el que las constantes de velocidad son menores que $0,1 \text{ S}^{-1}$, el uso de un aparato de mezclamiento rápido no es indispensable. En este caso, se puede monitorizar variaciones de fluorescencia del donante y/o del receptor en un espectrofluorímetro estándar provisto de un dispositivo de agitación magnético de la muestra, de una regulación de temperatura y de una función de monitorización del tiempo. Entonces, las muestras se disponen en una cubeta provista de un agitador, y la mezcla se obtendrá mediante adición manual de los componentes o de las disoluciones deseadas. Las muestras que contienen el receptor pueden ser células, o bien fragmentos de células. Se dispondrán preferentemente en primer lugar en la cubeta, y se añadirán los agentes modulantes así como el ligando marcado a esta disolución. El efecto de estas adiciones se podrá así monitorizar, y cualquier variación de fluorescencia se podrá caracterizar en el plano físico y farmacológico para determinar si éstas dependen o no del proceso de transferencia de energía y responden o no a los criterios de la especificidad farmacológica buscada. En su realización preferida, una medida de disociación se obtiene mediante adición de un exceso de ligando competitivo. Esto se puede obtener:

- mediante adición de un volumen bajo ($\leq 5\%$ del volumen final) de una disolución concentrada de ligando competitivo (aproximadamente 500-1000 veces su K_d en la disolución final, correspondiendo el K_a a la concentración que lleva al 50% de ocupación de los sitios), en una cubeta que contiene una mezcla de ligando fluorescente, de receptor fluorescente y, eventualmente, de efector alostérico, o
- mediante mezclamiento rápido del contenido de una jeringa que contiene el ligando fluorescente, el receptor fluorescente y, eventualmente, el efector alostérico con aquel de una jeringa que contiene el ligando competitivo, con la concentración deseada, así como el efector alostérico con una concentración igual a la de la otra jeringa (para un mezclamiento volumen/volumen) a fin de evitar de diluirlo durante la operación de mezclamiento.

En la realización preferida del procedimiento, las medidas de asociación se efectúan mezclando el ligando fluorescente con células, membranas o extractos, que contienen el receptor fluorescente, con el ligando fluorescente, siguiendo la variación de fluorescencia debida a la transferencia de energía. El efecto del efector se puede estudiar tras mezclar previamente con el receptor, o en un protocolo de mezclamiento simultáneo con el ligando fluorescente. El mezclamiento se puede efectuar mediante un aparato de mezclamiento rápido, o mediante un mezclamiento manual en una cubeta de espectrofluorimetría.

Medidas de las respuestas

Debido a la diversidad de los receptores y el número variable de los estados conformacionales que éstos pueden adoptar, es la medida de la modulación de las respuestas que permite definir el carácter positivo o negativo del efector alostérico.

Se recuerda que, en este contexto, el carácter positivo o negativo de un efector alostérico se define mediante su capacidad a potenciar (efector positivo) o rebajar (efector negativo) una respuesta fisiológica propia al receptor estudiado. El efector alostérico positivo se considerará como tal, sea cual sea su efecto (aceleración o deceleración) sobre la cinética de asociación y/o de disociación del ligando fluorescente marcador, que sea este último agonista o antagonista.

Se han proporcionado anteriormente los diferentes ensayos usados para medir las respuestas.

Todos los parámetros de una respuesta pueden ser afectados por un efector alostérico positivo. Estos parámetros incluyen, entre otros, la velocidad de establecimiento de la respuesta, su amplitud, su duración, su frecuencia, su sensibilidad al agonista y el nivel de base de la respuesta.

En su realización preferida, el procedimiento se destina al estudio de los receptores acoplados con las proteínas G. Para estos receptores, las respuestas que puede ser objeto de un estudio son variadas porque están acoplados a múltiples vías de transducción de señal. Se puede citar, por ejemplo, la unión de GTP con la proteína G, la producción de AMPc, de fosfatos de inositoles, de ácido araquidónico, la fosforilación de proteínas, la liberación de calcio intracelular, la modificación de pH celular, la modificación de la velocidad de proliferación celular, la alteración de la morfología celular, la polimerización de actina, o también la regulación de canales iónicos o la de la expresión de genes.

Cada una de estas respuestas se puede monitorizar, y se pueden determinar los efectos del efector.

En los casos más frecuentes, se focalizará en primer lugar sobre las respuestas cálcicas y la producción de AMPc.

Para las respuestas cálcicas, se podrá usar una sonda óptica sensible al calcio o una monitorización electrofisiológica de la regulación de las corrientes. El uso de una sonda cálcica permite determinar el tiempo de establecimiento de la respuesta, la duración de la respuesta, su intensidad o su sensibilidad al agonista. La monitorización electrofisiológica permite además el análisis de la frecuencia de apertura de canales (Mulle *et al.*, 1992). Un efector alostérico positivo podrá disminuir el tiempo de establecimiento de la respuesta y aumentar los otros parámetros (amplitud, duración, sensibilidad, etc.). El efector alostérico negativo tendrá efectos contrarios.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el esquema de un aparato de mezclado rápido que permite efectuar las medidas de cinética rápida. El aparato está constituido de dos jeringas, de una cámara de mezclado y de una cámara de observación. El avance de los pistones de las jeringas permite el mezclado del contenido de las jeringas a nivel de la cámara de mezclado. Después de un tiempo muerto, la mezcla llega a la cámara de observación provista de un dispositivo de estimulación y de detección de la fluorescencia. La parada del avance de los pistones, o la llegada en el tope de la jeringa de parada, detiene la etapa de mezclado, al final de la cual se monitoriza la evolución de la mezcla.

La figura 2 (prestada a Monod, Wyman y Changues, 1965) representa un esquema de proteína reguladora que existe en dos estados de conformaciones, o dos estados de oligomerización. En este modelo, la proteína puede existir en varios estados discretos, en un número finito, que corresponden a estados termodinámicamente estables que difieren entre sí de por su estructura terciaria y cuaternaria. La interconversión entre cada estado se puede realizar espontáneamente, y se describe mediante el parámetro de isomerización.

Las conformaciones difieren de por sus propiedades farmacológicas. Así, los ligandos estabilizan las conformaciones para las cuales exhiben la afinidad más elevada. Las conformaciones difieren de por sus propiedades funcionales. Así, los agonistas estabilizan preferentemente el estado activo, mientras que los antagonistas estabilizan preferentemente el estado inactivo.

En este esquema, el estado de relajación corresponde al estado conformacional “activo” de la proteína. Esta conformación puede unir con una alta afinidad los agonistas (A) si es un receptor o los sustratos (S) si es una enzima. Los estados restringidos y/o monómero son menos (o nada) activos en comparación con el estado de relajación, que es el más activo. El estado restringido une con una alta afinidad los inhibidores o antagonistas. El estado monomérico une con una afinidad moderada los agonistas o los sustratos.

Las figuras 3A y 3B representan un esquema cuantificado de las relaciones entre los estados conformacionales y las interacciones con los ligandos.

En la figura 3A, la proteína existe en dos conformaciones que corresponden a un estado de reposo (no activo en el plano biológico) y un estado activo. La isomerización espontánea entre los estados R y A se describe mediante la constante de isomerización L_0 igual a la relación de las concentraciones relativas de cada estado ($L_0 = [R]/[A]$). Los ligandos de la proteína se unen al estado R con una constante de disociación igual a K_R , y al estado A con una constante de disociación igual a K_A . La relación $c = K_A/K_R$ describe la relación de afinidad para un ligando dado entre las conformaciones. Si c es menor que 1, el ligando es agonista (este aumenta la concentración fraccional de A). Si c es mayor o igual que 1, el ligando es antagonista (este aumenta la concentración fraccional de R). El equilibrio entre las conformaciones R y A unidas al ligando ($RF \leftrightarrow AF$) se describe mediante el resultado de L_0 por c .

En presencia de un efector alostérico (véase figura 3B), la constante de isomerización L_0 está alterada en L_0' según $L_0' = L_0[(1+\beta d)/(1+\beta)]^n$ en el que β (homólogo de) describe la relación de afinidad del efector para las dos conformaciones ($\beta = K_A/K_R$), y d es la concentración de efector normalizada con relación a la afinidad para el estado A ($d = [\text{efector}]/K_A$). Los efectores cuyo $\beta > 1$ son inhibidores, los cuyo $\beta < 1$ son potenciadores.

La figura 4 representa una monitorización en tiempo real de la cinética de asociación (A) y de disociación (B) de NKA-Bo (NKA marcado por Bodipy) al receptor EGFP-NK2R (NK2R marcado por GFP). La monitorización de la cinética de asociación se efectúa después del mezclado rápido de células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R. La cinética de disociación se monitoriza después de mezclar manualmente las células que expresan el receptor con la NKA-bo (preincubación de 15 minutos, 100 nanomolares), y después con el antagonista competitivo SR 4896 (10 μ M final).

El eje de las abscisas representa el tiempo en segundos, y el eje de las ordenadas representa la fluorescencia (unidades arbitrarias) con 510 nm. Los valores λn y κn corresponden, respectivamente, a las amplitudes y a las constantes de velocidad determinadas mediante un ajuste de mínimos cuadrados con dos exponenciales.

Las figuras 5A, 5B, 5C y 5D indican el procedimiento de identificación de un ligando que interactúa de manera competitiva con el ligando fluorescente en un sitio receptor.

El complejo formado entre el receptor EGFP-NK2R y NKA-Bo se invierte mediante concentraciones crecientes de la molécula G6 (véase tabla 1), y después mediante NKA no fluorescente.

La figura 5A indica que una parte del complejo receptor-ligando está invertido durante cada adición de molécula G6 (10 ó 20 μM), así como durante la adición de una concentración saturante de NKA (10 μM). En esta figura, el eje de las abscisas corresponde al tiempo en segundos y el eje de las ordenadas corresponde a la fluorescencia medida con 510 nm.

La figura 5B muestra que la cinética de disociación de NKA-Bo, determinada después de adición de una concentración saturante de NKA, no está modificada por la presencia de la molécula G6.

Las dos marcas experimentales se ajustan con la ayuda de 2 exponenciales, rápida (0,04 s^{-1}) y lenta (0,014 s^{-1}), cuyas amplitudes (66% para la rápida y 33% para la lenta) no están afectadas por la presencia de 60 μmoles de molécula G6.

En esta figura, el eje de las abscisas corresponde al tiempo en segundos, y el eje de las ordenadas corresponde a la fluorescencia medida con 510 nm.

La figura 5C representa un estudio cuantitativo de la cinética de disociación de NKA-Bo en presencia de un antagonista competitivo conocido, el SR 48968. La disociación de NKA-Bo se monitoriza en presencia de 0,2, 1 y 5 nM de SR 48968. en las tres condiciones experimentales, la velocidad de disociación se puede describir como una suma de dos exponenciales cuyas velocidades son 0,04 s^{-1} y 0,008 s^{-1} , y cuyas amplitudes relativas siguen siendo constantes en las diferentes dosis de SR 48968 (45% de disociación rápida (0,04 s^{-1}) y 55% de disociación lenta (0,008 s^{-1})).

En esta figura, el eje de las abscisas corresponde al tiempo en segundos, y el eje de las ordenadas corresponde a la fluorescencia medida con 510 nm.

La figura 5D representa los valores de las amplitudes de disociación rápida (cuadros) y lenta (triángulos hacia arriba) de NKA-Bo en presencia de SR 48968, así como la amplitud total de la unión de NKA-Bo (triángulos hacia abajo).

En esta figura, el eje de las abscisas corresponde al logaritmo de la concentración de SR 48968, y el eje de las ordenadas corresponde a la amplitud de la fluorescencia normalizada.

La parte superior de la figura 5D representa la relación de la amplitud de la disociación lenta (A2) con relación a la amplitud total de disociación (A total)(curva con los rombos). Se observa que esta relación es constante. En este gráfico, el eje de las abscisas corresponde al logaritmo de la concentración de SR 48968, y el eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de la amplitud de la fluorescencia.

Las figuras 6A, 6B y 6C indican el procedimiento de identificación de un ligando que interactúa de manera no competitiva con el ligando fluorescente en un sitio receptor.

En la figura 6A, se representa la fluorescencia medida con 510 nm en función del tiempo en segundos.

El complejo formado entre el receptor EGFP-NK2R y NKA-Bo está invertido mediante concentraciones crecientes de la moléculas A11, y después mediante NKA no fluorescente. La figura 6A indica que una baja porción del complejo receptor-ligando está invertida durante cada adición de molécula A11, mientras que NKA (10 μM) invierte la mayoría del complejo. La cinética de la disociación mediante NKA no es de la misma forma que en el control.

En la figura 6B, se ha representado la fluorescencia medida con 510 nm en función del tiempo en segundos. La figura 6B ilustra la modificación de cinética de disociación en presencia de molécula A11. Las monitorizaciones de disociación de NKA-Bo de su receptor EGFP-NK2R se efectúan en presencia y en ausencia de A11. La disociación se inicia mediante adición de NKA no fluorescente con una concentración de 20 μM final. El análisis de la cinética de disociación hace aparecer dos relajaciones monoexponenciales cuyas constantes de velocidad (K1 y K2) son idénticas en presencia y en ausencia de A11, pero cuyas amplitudes relativas cambian de manera que la disociación lenta represente 59% de la señal total en el control, y 22% de la señal total en presencia de A11.

En la figura 6C, se ha representado la asociación de NKA-Bo (20 nanomolares) al receptor EGFP-NK2R, en función del tiempo en segundos. La figura 6C representa monitorizaciones de unión (asociación) resultados en el tiempo de NKA-Bo con su receptor EGFP-NK2R, en ausencia y en presencia de la molécula A11. El análisis de la cinética de unión hace aparecer dos relajaciones monoexponenciales caracterizadas por constantes de velocidad (K1 y K2) que no cambian en presencia de A11, pero de amplitudes variables según que las células se incuban, o no, con A11.

Las figuras 7A a 7I ilustran el análisis de los efectos de diversas moléculas sobre la disociación de NKA-Bo unida a su receptor fluorescente EGFP-NK2R.

La figura 7A representa las monitorizaciones de disociación de NKA-Bo en presencia de concentraciones variables (1, 10 y 50 μM) de la molécula 805 (véase tabla 1). Se ha representado la fluorescencia medida con 510 nm en función del tiempo en segundos. El análisis cuantitativo de la cinética de disociación se obtiene con la ayuda de dos

ES 2 273 026 T3

exponenciales, rápido ($0,04 \text{ s}^{-1}$) y lento ($0,008 \text{ s}^{-1}$), cuyas amplitudes relativas (rápida/lenta) varían de 30/70 a 80/20 cuando aumenta la concentración de 805.

En las figuras 7B a 7I, se ha representado el porcentaje de amplitud de la disociación rápida en función del logaritmo de la concentración de los compuestos ensayados. Estas figuras dan los resultados del análisis cuantitativo de la disociación de NKA-Bo en presencia de las moléculas 805 (figura 7B), NP246 (figura C), A11 (figura 7D), H10 (figura 7E), G11 (figura 7F), F7 (figura 7G), F3 (figura 7H) y NP 234 (figura I). La disociación de NKA-Bo se determinó en presencia de cada molécula con las concentraciones indicadas en el eje de las abscisas. El efecto de aumento de la velocidad de disociación se representa mediante el aumento relativo de la amplitud (% λ) de la disociación rápida.

Las figuras 8A y 8B representan una cuantificación del desplazamiento de [^3H]SR 48968, unido al receptor EGFP-NK2R, mediante NKA y la molécula 805.

En estas figuras, se ha representado la unión de 1 nanomolar [^3H]SR 48968 (Amersham, Life Sciences) en función del logaritmo de la concentración de NKA (figura 8A) o en función de la concentración de molécula 805 (figura 8B).

Se observa que NKA (ligando competitivo) invierte 100% de la unión de [^3H]SR 48968 mientras que 805 (ligando no competitivo) invierte sólo aproximadamente 35% de la unión de SR 48968.

Las figuras 9A, 9B y 9C representan los resultados de la estimulación de producción de AMPc mediante NKA en las células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R.

La figura 9A representa el efecto de la presencia de antagonista competitivo (H8565) y del efector alostérico (805). En esta figura, se ha representado la acumulación de AMPc intracelular (en pmoles/pocillo) en función del logaritmo de la concentración de NKA. La curva con los cuadros negros corresponde a la diana; la curva con los triángulos negros corresponde al antagonista H8565 con una concentración de $1 \mu\text{M}$; la curva con los cuadros grises corresponde al ligando 805 con una concentración de $10 \mu\text{M}$, y la curva con los triángulos grises corresponde al ligando 805 con una concentración de $50 \mu\text{M}$.

La acumulación de AMPc intracelular se determina con distintas concentraciones de NKA. El antagonista H8565 desplaza la curva concentración-respuesta de NKA hacia valores más elevados sin afectar a la intensidad de la respuesta máxima (triángulos negros). El ligando 805 (cuadros y triángulos grises) disminuye la intensidad de la respuesta máxima sin afectar EC_{50} (concentración eficaz al 50%) de la NKA para la respuesta.

La figura 9B representa la concentración eficaz al 50% de la respuesta máxima de AMP cíclico con NKA. Esta EC_{50} aumenta en presencia de antagonista competitivo mientras que no se modifica de manera significativa en presencia de 10 y $50 \mu\text{M}$ de 805.

La figura 9C representa la inhibición de la respuesta máxima de AMPc inducida por NKA en presencia de una concentración creciente de 805. La abscisa representa el logaritmo de la concentración de 805, y la ordenada el valor máximo de la producción de AMP cíclico. La constante de inhibición KI es del orden de $6 \mu\text{M}$.

Las figuras 10A, 10B, 10C, 10D y 10E ilustran el efecto de 805 sobre las respuestas cálcicas asociadas al receptor EGFP-NK2R en las células HEK 293.

En las figuras 10A, 10B y 10C, se ha representado la fluorescencia del INDO-1 con 400 nm en función del tiempo en segundos.

Las respuestas se monitorizan con la ayuda de la sonda fluorescente sensible al calcio INDO-1. Para cada concentración de agonista NKA (1 nM , 5 nM y $1 \mu\text{M}$) se mide una respuesta de control (círculo blanco), y una respuesta en presencia de $50 \mu\text{M}$ de 805 (círculo negro) (figuras 10A, 10B y 10C). En todos los casos, se observa un aumento de la duración de la respuesta cálcica en presencia de 805, sin efecto significativo sobre la amplitud o sobre la cinética de establecimiento de la respuesta.

La figura 10D indica las variaciones de respuestas cálcicas obtenidas para una concentración de agonista fijo (5 nM de NKA), y de las concentraciones variables (10 y $50 \mu\text{M}$) de 805. Se ha representado la concentración de calcio normalizado en función del tiempo en segundos. La curva con los círculos blancos corresponde a una medida efectuada en presencia de 5 nM de NKA y sin 805; la curva con los círculos negros corresponde a una medida efectuada en presencia de 5 nM de NKA y $10 \mu\text{M}$ de 805; y la curva con los cuadros negros corresponde a una medida efectuada en presencia de 5 nM de NKA y $50 \mu\text{M}$ de 805.

En todos los casos, se observa un aumento de la duración de la respuesta cálcica en presencia de 805.

La figura 10E representa una cuantificación del tiempo de semi-retorno (tiempo necesario para que la concentración de calcio sea la mitad de su valor máxima) con el valor inicial de la respuesta cálcica monitorizada en presencia de $0,10$ y $50 \mu\text{M}$ de 805.

Las figuras 11A, 11B, 11C, 11D, 11E, 11F y 11G ilustran el efecto de 805 en la unión de neuroquinina truncada fluorescente (NKA4-19 TR7), marcada con el grupo fluorescente Texas red, y la respuesta cálcica asociada.

En las figuras 11A a 11D, las respuestas cálcicas con 106 (figura 11A), 50,3 (figura 11B), 26,5 (figura 11C) y 10,6 nM (figura 11D) de NKA4-10 TR7 (NKA4-10 marcada en posición 7 mediante Texas Red) se monitorizan en duplicado, en ausencia (curvas con los círculos blancos) y en presencia de 20 μ M de 805 (curvas con los círculos negros). Se ha representado la concentración de calcio normalizada en función del tiempo en segundos. Se observa que 805 provoca un aumento de la amplitud de la respuesta cálcica, y una persistencia de la señal.

La figura 11E representa la relación entre la amplitud de la respuesta cálcica y la concentración de agonista. Se ha representado la amplitud del pico de calcio normalizado con relación a la concentración de calcio extracelular, en función de la concentración de NKA4-10 TR7. La curva con los cuadros negros corresponde a la medida de testigo (sin 805), y la curva con los triángulos corresponde a la medida efectuada en presencia de 20 μ M de 805.

La figura 11F representa la disociación de la unión de NKA4-10 TR7. El eje de las abscisas representa el tiempo en segundos, y el eje de las ordenadas representa la fluorescencia. El complejo formado entre el receptor EGFP-NK2R y NKA4-10 TR7 (106 nM) está invertido (a 10°C) mediante NKA no fluorescente (20 μ M), en ausencia y en presencia de 10 μ M de 805. El análisis de la cinética de disociación hace aparecer dos relajaciones monoexponenciales cuyas constantes de velocidad (0,05 s⁻¹ y 0,013 s⁻¹) son idénticas en presencia y en ausencia de 805, pero cuyas amplitudes relativas cambian de manera que la disociación lenta represente 42% de la señal total en el control y 12% de la señal total en presencia de 805.

En la figura 11G, se ha representado el porcentaje de amplitud de la disociación rápida de NKA4-10 TR7 en función del logaritmo de la concentración de 805. La amplitud de la disociación rápida de NKA4-10 TR7 se mide en presencia de concentraciones variables de 805. La disociación rápida representa aproximadamente 40% de la disociación total en ausencia de 805, y hasta 90% de la amplitud de disociación con 100 μ M. La afinidad aparente para la variación de amplitud es del orden de 20 μ M.

Las figuras 12A, 12B, 12C y 12D representan las respuestas cálcicas originadas por la sustancia P (ligando endógeno) sobre el receptor NK1 humano (figura 12A y 12B), y mediante la neuroquinina A sobre el receptor NK2 humano (figuras 12C y 12D), en presencia y en ausencia de 805.

En las figuras 12A y 12B, se estimula una suspensión (1 x 10⁶ células/ml) de células HEK 293 que expresan el receptor NK1 humano salvaje, y cargadas en indo-1 (3 μ M) mediante 0,1 nM (figura 12A) o 10 nM (figura 12B) de sustancia P (SP) en presencia (círculos negros) y en ausencia (círculos blancos) de moléculas 805 (20 μ M).

En las figuras 12C y 12D, se estimula una suspensión (1 x 10⁶ células/ml) de células HEK 293 que expresa el receptor NK2 humano salvaje, y cargadas en indo-1 (3 μ M), mediante 10 nM (figura 12C) o 100 nM (figura 12D) de neuroquinina A (NKA) en presencia (círculos negros) y en ausencia (círculos blancos) de moléculas 805 (20 μ M).

En todos los casos, se observa que la molécula 805 provoca un aumento de la amplitud y de la duración de la respuesta cálcica originada para cada agonista.

Ejemplos

Ejemplo 1

Medida de la velocidad de asociación y de disociación de neuroquinina A marcada mediante el fluoróforo bodipy al receptor NK2 de las taquiquininas marcado con EGFP, mediante transferencia de energía de fluorescencia

Asociación (Figura 4A): Se suspenden las células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R (NK2R marcado con GFP), a una concentración de 2.000.000 células/ml en un tampón fisiológico de Hepes (en mM: 137,5 NaCl; 1,25 MgCl₂; 1,25 CaCl₂; 6 KCl; 5,6 glucosa; 10 Hepes; 0,4 NaH₂PO₄; 1% de BSA (v/v); pH 7,4), y se disponen en uno de los tanques del aparato de mezclamiento rápido. Se dispone una disolución de NKA-Bo (neuroquinina A marcada con Bodipy) (200 nM) en el mismo tampón, en el otro tanque del aparato de mezclamiento rápido. La cámara de observación se dispone en un espectrofluorómetro SPEX fluorolog 3. La temperatura de los depósitos de las jeringas así como de la cámara de mezclamiento y de observación se ajusta a 21°C. La longitud de onda de estimulación de la cámara de observación se fija a 470 nm, y la longitud de emisión de fluorescencia se fija a 510 nm. La frecuencia de muestreo de los puntos experimentales se ajusta a 50 Hz (1 punto cada 20 mseg.). El contenido de los tanques se propulsa hacia las cámaras de mezclamiento y de observación con la ayuda de un dispositivo neumático que permite un caudal de 4 ml/seg., y la evolución del mezclamiento se monitoriza en continuo a partir del momento de parada del avance de los pistones de los tanques. La reacción de asociación de NKA-Bo con el receptor EGFP-NK2R se detecta en forma de una disminución de la intensidad de fluorescencia de GFP portado por el receptor NK2R. La marca experimental se ajusta mediante una curva multiexponencial de tipo $y = \lambda_1 \exp(-k_{1ap} \times T) + \lambda_2 \exp(-k_{2ap} \times T) + \text{"recta"}$, en el que λ_1 , λ_2 , k_{1ap} , k_{2ap} , para una concentración de NKA-Bo final de 100 nM son, respectivamente, 67%; 32%; 0,6 s⁻¹ y 0,03 s⁻¹. El coeficiente de correlación del ajuste de la curva experimental es R = 0,989.

Disociación (figura 4B): Se suspenden las células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R, a una concentración de 1.000.000 células/ml en un tampón fisiológico de Hepes (en mM: 137,5 NaCl; 1,25 MgCl₂; 1,25 CaCl₂; 6 KCl; 5,6 glucosa; 10 Hepes; 0,4 NaH₂PO₄; 1% BSA (v/v); pH 7,4), y se disponen en una cubeta de 1 ml provista de un barrote de agitación magnético en el soporte de la cubeta de un espectrofluorímetro SPEX fluorolog 3. Se añaden 20 nM (concentración final) de NKA-Bo, y se deja la asociación alcanzar el equilibrio, durante 10 minutos. La medida de la cinética de disociación de NKA-Bo se inicia mediante adición manual de 10 μ M (concentración final) del antagonista competitivo SR 48968, y se monitoriza con 510 nm (estimulación: 470 nm), a razón de 1 punto cada 100 mseg. El ajuste de la curva experimental se obtiene con la ayuda de una suma de dos exponenciales que tienen como constantes de velocidad $k_1 = 0,052 \text{ s}^{-1}$ y $k_2 = 0,011 \text{ s}^{-1}$, y como amplitudes $\lambda_1 = 40\%$ y $\lambda_2 = 58\%$, respectivamente.

Ejemplo 2

Identificación de la molécula G6 que se comporta como un ligando competitivo, mediante transferencia de energía de fluorescencia entre NKA-Bo y el receptor EGFP-NK2R

Se incuban 10⁶ células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R en un mililitro de tampón de Hepes, con 20 nM de NKA-Bo, durante 15 minutos. Después, la mezcla se dispone en una cubeta de espectrofluorimetría y la inversión de la interacción entre EGFP-NK2R y NKA-Bo se evalúa tras adición de molécula G6 (véase tabla 1) en una concentración creciente (Figura 5A). Después, la cuantificación de la fracción de complejo invertido se efectúa tras adición de una cantidad saturante de NKA (10 μ M) que da acceso al valor de 100% de inversión de la unión.

La comparación de la cinética de disociación de NKA-Bo mediante NKA, en presencia y en ausencia de molécula G6 (50 μ M), muestra que la molécula G6 no altera la velocidad de disociación de NKA-Bo (figura 5B). Las dos curvas experimentales están correctamente ajustadas con la ayuda de dos exponenciales con una constante de velocidad rápida $k_1 = 0,04 \text{ s}^{-1}$ y una constante de velocidad lenta $k_2 = 0,01 \text{ s}^{-1}$.

El experimento de control presentado en la figura 5C indica que una molécula conocida, competitiva para la interacción de NKA-Bo con su sitio, ie SR48968, provoca una disociación de NKA-Bo con una cinética idéntica a la que se monitoriza cuando la NKA-Bo se desplaza por el NKA. En las distintas concentraciones ensayadas de SR 48968, se observa que la disociación de NKA-Bo se realiza según un proceso bifásico que incluye una etapa de disociación rápida ($k_1 = 0,04 \text{ s}^{-1}$) y lenta ($k_2 = 0,008 \text{ s}^{-1}$). La amplitud relativa de cada etapa sigue siendo constante para cada concentración de SR 48968, tal como lo muestran las relaciones de amplitudes rápida/lenta cercanas de 45/55.

El análisis cuantitativo de la disociación de NKA-Bo en presencia de un intervalo de concentraciones crecientes de SR 48968 revela que para cada concentración de SR 48968, la disociación se produce no sólo según un proceso bifásico con dos constantes de velocidad (véase figura 5C), pero además que la relación de amplitud de la disociación rápida y de la disociación lenta sigue siendo constante (figura 5D). La disociación lenta representa siempre aproximadamente 43% de la señal “disociación rápida + disociación lenta”.

Ejemplo 3

Identificación de una molécula que se comporta como un efector alostérico del receptor NK2 de las taquiquininas

Se incuban 10⁶ células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R en un mililitro de tampón de Hepes, con 20 nM de NKA-Bo, durante 15 minutos. Después, la mezcla se dispone en una cubeta de espectrofluorimetría y se evalúa la inversión de la interacción entre EGFP-NK2R y NKA-Bo mediante adición de molécula A11 con una concentración creciente (Figura 6A). Después, la estimación de la fracción de complejo invertido se mide tras adición de una cantidad saturante de NKA (10 μ M). Se observa que la molécula A11 desplaza sólo una baja fracción (29%) de NKA-Bo unido a su sitio. Por lo contrario, se observa que durante la disociación de NKA-Bo por NKA no fluorescente, la presencia de A11 tiene por efecto acelerar la velocidad de disociación de NKA-Bo. Este fenómeno se ilustra en la figura 6B, en la que la cinética de disociación de NKA-Bo por NKA se mide en presencia y en ausencia de molécula A11. Las dos cinéticas de disociación se describen mejor mediante una suma de dos relajaciones exponenciales cuyas velocidades son, respectivamente, $K_1 = 0,052 \text{ s}^{-1}$ para la etapa rápida y $k_2 = 0,011 \text{ s}^{-1}$ para la etapa lenta. Tendiendo en cuenta la velocidad de asociación de NKA-Bo a su receptor ($k_{on} = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), se deduce que la NKA-Bo se une a dos poblaciones de sitios cuyas constantes de disociación ($K_D = k_{off}/k_{on}$) son, respectivamente, 10 nM (disociación rápida - $0,011 \text{ s}^{-1}$) y 2 nM (disociación lenta - $0,052 \text{ s}^{-1}$). La amplitud de cada relajación se proporciona entonces mediante el ajuste de las marcas experimentales. Para la disociación de control (sin A11), la relajación rápida representa 41% y la lenta 59%. Tras adición de A11 (50 μ M), la relajación rápida representa 78% de la señal y la relajación lenta 22%. La molécula A11 tiene por lo tanto como efecto, estabilizar una fracción de los receptores en un estado de más baja afinidad que la en la que la NKA-Bo solamente lo estabiliza. En cuanto a la molécula A11, ésta se une de manera preferencial a la conformación del receptor que presenta una afinidad más modesta para la NKA-Bo. La unión de NKA-Bo no está inhibida por A11. Aquella se produce en los mismos estados de conformación del receptor, pero las proporciones de estos dos estados conformacionales están modificados por la presencia de A11. Da como resultado que la cinética de disociación de NKA-Bo es más rápida en presencia de A11 que en su ausencia. Esta aceleración de la cinética de disociación de NKA-Bo no resulta de un cambio de las afinidades intrínsecas de las conformaciones para la NKA-Bo, pero de una modificación de las proporciones relativas de los estados de alta y de baja afinidad.

El análisis del efecto de la molécula A11 sobre la cinética de asociación de NKA-Bo (Figura 6C) revela una aceleración modesta pero detectable. La unión rápida de NKA-Bo, monitorizada con una concentración de 20 nM con la ayuda del equipo de mezclado rápido, se descompone en una suma de dos exponenciales cuyas velocidades (k_{ap}) difieren con un factor 10. La unión rápida de NKA-Bo ($k_{ap} = 0,095 \text{ s}^{-1}$) representa 44% de la señal total de unión, en ausencia de A11 (50 μM), mientras que representa 52% de la señal total en presencia de A11. La unión lenta se efectúa en los dos casos con una velocidad aparente (k_{ap}) igual a $0,0095 \text{ s}^{-1}$, y una amplitud igual a 66% en ausencia de A11, y 48% en presencia de A11. Estos resultados se interpretan según un modelo descrito en Palanché *et al.* (2001) en los siguientes términos:

- la unión rápida tal como la unión lenta se efectúan de una manera que se controlan mediante difusión de NKA-Bo en el medio,
- la velocidad aparente de la unión rápida aumenta de manera lineal con la concentración de NKA-Bo. Se trata por lo tanto de una unión controlada exclusivamente mediante la difusión,
- la velocidad aparente de la unión lenta aumenta de manera no lineal con la concentración de NKA-Bo, y satura a concentraciones de ligando del orden de 500 nM. Esta cinética lenta refleja la interconversión lenta de un estado conformacional de baja afinidad para NKA-Bo hacia un estado de más alta afinidad del cual se detecta la ocupación.

Así, el receptor existe en por lo menos dos estados conformacionales de los cuales uno preexiste con la adición de agonista, y el otro aparece lentamente a lo largo del tiempo en presencia de agonista.

La molécula A11, estabilizando los estados de baja afinidad del receptor aumenta la proporción de unión rápida (de baja afinidad) al detrimento de la unión lenta que refleja la estabilización de un estado de más alta afinidad.

Ejemplo 4

Identificación, mediante análisis de la unión de NKA-Bo, de otras moléculas que se comportan como efectores alostéricos del receptor NK2R de las taquiquininas

La identificación de otros efectores alostéricos del receptor NK2R de las taquiquininas se realiza mediante el análisis de la cinética de disociación de NKA-Bo unido al receptor.

Se suspenden 10^6 células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R en un tampón de Hepes (véase más arriba), y se incuban con NKA-Bo (20 nM), y una de las siguientes moléculas: 805, NP246, A11, H10, G11, F7, F3 y NP 234. Las moléculas A11 y el antagonista competitivo conocido SR 48968 se introducen en el experimento como controles positivos. La disociación de NKA-Bo se monitoriza en una cubeta de espectrofluorometría provista de una agitación magnética, tras haber añadido 10 μM de NKA no fluorescente para expulsar la NKA-Bo unida. La cinética de disociación de NKA-Bo se monitoriza en presencia de concentraciones crecientes de cada una de las moléculas antes citadas.

La figura 7A muestra un experimento típico de medida de la velocidad de disociación de NKA-Bo en presencia de concentraciones crecientes de la molécula 805. Estas determinaciones permiten medir varios parámetros experimentales: i) la velocidad de disociación de NKA-Bo que, después, se descompondrá en una suma de relajaciones exponenciales, y ii) la amplitud relativa de cada relajación exponencial que dará la medida de la concentración fraccional de cada uno de los estados conformacionales detectados en el experimento. Así, se determina que la disociación de NKA-Bo se produce en dos etapas caracterizadas por constantes de velocidad $k_1 = 0,04 \text{ s}^{-1}$ y $k_2 = 0,008 \text{ s}^{-1}$ y amplitudes λ_1/λ_2 variables: $\lambda_1/\lambda_2 = 30/70$ (sin 805); $\lambda_1/\lambda_2 = 35/65$ (1 μM de 805); $\lambda_1/\lambda_2 = 9/31$ (10 μM de 805) y $\lambda_1/\lambda_2 = 80/20$ (50 μM de 805).

Las figuras 7B a 7I muestran, para cada molécula ensayada, la variación de amplitud de unión de NKA-Bo y la variación de amplitud de la disociación rápida. Estas figuras muestran que todas las moléculas indicadas se comportan como efectores alostéricos porque provocan un aumento de la amplitud de la disociación rápida de NKA-Bo.

El aumento de amplitud de la disociación rápida refleja la capacidad de las moléculas para estabilizar una fracción más importante de los receptores en el estado de baja afinidad. Así, se observa que la fracción inicial de receptores en el estado de baja afinidad cambia de aproximadamente 25% en ausencia de efector a 60-75% en presencia de las moléculas 805, NP234, A11, G11, F7, F3 y H10 (con 100 μM de efector), y prácticamente 100% en presencia de A11 y NP246.

Ejemplo 5

Estudio de la inhibición de la unión del antagonista competitivo SR 48968 radioactivo mediante el agonista NKA y el efector alostérico 805

Se incuban 25.000 células que expresan el receptor EGFP-NK2R durante 3 horas a 4°C en un volumen final de 500 μl de tampón de Hepes, en presencia de 1 nM de $[^3\text{H}]$ SR 48968 y de concentraciones variables de NKA o de

805. Al final de la incubación, las mezclas de reacción se filtran sobre filtros GF/C (Whatmann) de fibra de vidrio previamente incubados en un tampón de Hepes complementados de 1% (v/v) de leche en polvo semidesnatada, y se aclaran tres veces mediante 5 ml de tampón de Hepes a 4°C. Después, los filtros se disponen en viales de contador de centelleo en los que se añaden 3 ml de cóctel de centelleo. La radioactividad se mide después de 16 horas en un contador de radioactividad. La figura 8A muestra que el agonista NKA desplaza cuantitativamente la unión de SR 48968 con una afinidad aparente $K_i = 22$ nM. Por lo contrario, el efector 805 es incapaz de desplazar la totalidad del SR 48968 unido, incluso cuando su concentración es del orden del milimolar. Éste invierte solamente 27-33% de la unión del radioligando con una afinidad aparente $K_i = 5$ μ M. El efecto de 805 sobre la unión de SR 48968 no refleja ninguna interacción competitiva, pero más bien de naturaleza no competitiva.

Ejemplo 6

Cuantificación del efecto de la molécula 805 sobre la respuesta de acumulación de cAMP en células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R

Se tratan con colágeno cajas de cultivo celular de 6 pocillos de 30 mm, y después se siembran con 50.000 células que expresan el receptor EGFP-NK2R. Después de dos a tres días de cultivo, el medio se sustituye por un tampón de Hepes que contiene un inhibidor de fosfodiesterasa IBMX (isobutil-metil-xantina), y se incuban durante 30 minutos con concentraciones crecientes de NKA en presencia o ausencia i) de inhibidor H8565 (1 μ M), o ii) de efector 805 (10 ó 50 μ M). La cantidad de cAMP producida (expresada en pmoles/pocillo) se determina según un procedimiento radioinmunológico descrito en Gicquiaux *et al.* (2002). Dando como resultado una medida de la curva concentración-efecto de NKA (Figura 9A).

La NKA sola es capaz de estimular la producción de cAMP en las células que expresan el receptor EGFP-NK2R con una EC_{50} próxima a 100 nM.

En presencia de una concentración fija del antagonista competitivo H8565, se observa una disminución de la afinidad aparente de NKA ($EC_{50} = 300$ nM) sin que el nivel máximo de la respuesta sea afectado (respuesta más. = 100%).

En presencia del efector 805 a 10 ó 50 μ M, no se detecta ninguna variación de la EC_{50} de NKA ($EC_{50} = 100$ nM), pero la respuesta máxima nunca alcanza el valor del control ($R_{\max} = 0,7$ para [805] = 10 μ M y $R_{\max} = 0,3$ para [805] = 50 μ M). El valor de la concentración de 805 que lleva a 50% de disminución de la respuesta máxima de AMPc es del orden de 6 μ M (figura 9C). Así, la afinidad aparente para la respuesta, pero no su amplitud máxima, está disminuida en presencia de antagonista competitivo, mientras que la amplitud máxima de la respuesta, pero no su afinidad aparente, está disminuida mediante un efector alostérico negativo.

Ejemplo 7

Cuantificación del efecto de la molécula 805 sobre la respuesta de acumulación de calcio evocada por NKA-Bo en células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R

Se monitorizan las respuestas cálcicas originadas por el agonista NKA-Bo en células que expresan el receptor EGFP-NK2R después de cargar las células con la sonda fluorescente sensible al calcio: indo-1, según el protocolo descrito en Vollmer *et al.* (1999). Las células se suspenden a razón de 500.000 células/ml en un tampón de Hepes, y se disponen en una cuba de espectrofluorometría. La longitud de onda de estimulación se ajusta a 338 nm, y la emisión se monitoriza a 400 y 470 nm. Las respuestas marcadas son las relaciones de las señales 400/470. Las figuras 10A, 10B y 10C muestran que el compuesto 805 (50 μ M) aumenta la duración de las respuestas cálcicas originadas por 1,5 y 1000 nM de NKA. De la misma manera, el compuesto 805, con las concentraciones de 10 y 50 μ M, aumenta la duración de la respuesta cálcica originadas por 5 nM de NKA (figura 10D).

El compuesto 805 se comporta por lo tanto como un efector alostérico positivo de las respuestas cálcicas originadas por el agonista NKA-Bo que aumenta la duración de la respuesta. Esto se indica en la figura 10E, en la que se puede observar que el tiempo necesario para volver a 50% de la respuesta máxima pasa de 91 segundos en ausencia de 805 a 105 y después a 115 segundos cuando la concentración de 805 es de 10 y después de 50 μ M.

Ejemplo 8

Cuantificación del efecto de la molécula 805 en la respuesta de acumulación de calcio evocada por NKA4-10 TR7, en las células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R

Se monitorizan las respuesta cálcicas originadas por el agonista troncado NKA4-10 TR7 en las células que expresan el receptor EGFP-NK2R después de cargar células con la sonda fluorescente sensible al calcio: indo-1 según el protocolo descrito en Vollmer *et al.* (1999). Las células se suspenden a razón de 500.000 células/ml en un tampón de Hepes, y se disponen en una cubeta de espectrofluorometría. La longitud de onda de estimulación se ajusta a 355 nm, y la emisión se monitoriza a 375 y 405 nm. Las respuestas marcadas son la relación de las señales 375 nm/405 nm. Las figuras 11A a 11D muestran que el compuesto 805 (20 μ M) aumenta la amplitud de la respuesta evocada por NKA4-10 TR7 (106, 50,3, 26,5 y 10,6 nM). La variación da amplitud mediante 805 se ilustra en el panel B de la figura

11 para concentraciones de 5, 10, 25, 50 y 106 nM de NKA4-10 TR7. El compuesto 805 demuestra ser un efector alostérico positivo de las respuestas cálcicas originadas por NKA4-10 TR7 que disminuye la dosis eficaz hasta 50% de aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 15 nM.

5 Ejemplo 9

Cuantificación del efecto de la molécula 805 en la disociación de NKA4-10 TR7 del receptor EGFP-NK2R

10 La NKA4-10 corresponde a una forma truncada de NKA que se encuentra en los fluidos de los tumores del intestino medio. La NKA4-10 fluorescente se modifica en posición 7 para introducir una cisteína que, después, se marca mediante el grupo fluorescente Texas Red. NKA4-10 fluorescente es, tal como NKA fluorescente, un agonista del receptor EGFP-NK2R, con la diferencia que es incapaz de evocar respuestas de acumulación de AMPc (Palanche *et al.*, 2001).

15 La unión de NKA4-10 fluorescente se realiza según un proceso monoexponencial al que se asocia el desarrollo de una respuesta cálcica en las células HEK 293 que expresan el receptor EGFP-NK2R (Palanche *et al.*, 2001).

20 A 10°C, la disociación de NKA4-10 que se ha hecho fluorescente con la ayuda del grupo Texas red introducida en posición 7 del péptido (NKA4-10 TR7) se desarrolla según un proceso bifásico caracterizado mediante las constantes de velocidad rápida, y 42% para la disociación lenta (figura 11F). En presencia de 10 μ M de 805, se observa una aceleración de la disociación caracterizada por una modificación de las amplitudes de las etapas rápidas (88%) y lentas (12%) de disociación. Se observa una relación entre el aumento de velocidad de disociación de NKA4-10 TR7 y la concentración de 805 (figura 11G). La concentración de 805 que provoca un aumento de 50% de la amplitud de la disociación rápida de NKA4-10 TR7 es del orden de 20 μ M.

25 Ejemplo 10

Potenciación de las respuestas cálcicas de los receptores NK1 y NK2 humanos salvajes mediante la molécula 805

30 Las respuestas cálcicas originadas por los agonistas siguientes: sustancia P (SP) y neuroquinina A (NKA), sobre células que expresan el receptor NK1 humano salvaje o NK 2 humano salvaje se monitorizan después de cargar células con la sonda fluorescente sensible al calcio: indo-1 (3 μ M) según el protocolo descrito en Vollmer *et al.* (1999). Las células se suspenden a razón de 1.000.000 células/ml en un tampón de Hepes (citado anteriormente), y se disponen en una cubeta de espectrofluorometría. La longitud de onda de estimulación se ajusta a 338 nm, y la emisión se monitoriza a 400 nm. Las respuestas marcadas son las señales monitorizada a 400 nm. Las figuras 12A y 12B muestran que el compuesto 805 (20 μ M) aumenta la amplitud de la respuesta evocada por la neuroquinina A (10 ó 100 nM).

El compuesto 805 demuestra ser un efector alostérico positivo de las respuestas cálcicas originadas por la neuroquinina A en el receptor NK2 humano salvaje, y de las respuestas originadas por la sustancia P en el receptor NK1 humano salvaje.

40 Ejemplo 11

Identificación de efectores alostéricos del receptor muscarínico M1 de la acetilcolina

45 El receptor muscarínico M1 fluorescente se obtiene por fusión de su ADNc con aquel de YFP, así como se describe en Llien *et al.* (2003), y se expresa de manera estable en células HEK 293. Las células se suspenden con una concentración de 1.000.000 células/ml en un tampón fisiológico de Hepes (en mM: 137,5 NaCl; 1,25 MgCl₂; 1,25 CaCl₂; 6 KCl; 5,6 glucosa; 10 Hepes; 0,4 NaH₂PO₄; 1% de BSA (v/v); pH 7,4), y se disponen en una cubeta de fluorescencia de 1 ml, ella misma dispuesta en el portador agitante de un espectrofluorímetro. La suspensión de células se excita a 470 nm, y la emisión de fluorescencia se monitoriza a 510 nm (EGFP) o a 530 nm (EYFP). La adición de 70 nM de bodipy(558-568)-pirenzepina provoca una disminución de emisión de fluorescencia de la proteína fluorescente portada por el receptor que refleja la etapa de asociación del ligando al receptor. El transcurso del tiempo de esta etapa de disociación se monitoriza a 510 ó 530 nm. Para identificar un efector alostérico del receptor muscarínico M1 de la acetilcolina, se preincubaban las células con una, o varias, molécula(s) conocida(s) o no conocida(s), y se monitoriza el transcurso del tiempo de la etapa de asociación y/o la etapa de disociación. Después, las cinéticas monitorizadas se ajustan mediante una curva multiexponencial de tipo $y = \lambda_1 \exp(-k_{1ap} \times T) + \lambda_2 \exp(-k_{2ap} \times T) + \text{"recta"}$, en el que λ_1 y λ_2 son las amplitudes de las relajaciones rápidas y lentas, k_{1ap} y k_{2ap} son las constantes de velocidad aparente de asociación o de disociación rápida o lenta, T es el tiempo y "recta" es una corrección matemática de la deriva de la señal. Un efector alostérico o bien acelera, o bien ralentiza el transcurso del tiempo bien de la etapa de asociación, o bien de la etapa de disociación, o bien de las dos. Esto se traduce por una variación relativa de las amplitudes de asociación (o de disociación) rápida y lenta, en comparación a la condición experimental de control (sin efector).

65

Ejemplo 12

Identificación de efectores alostéricos del receptor CXCR4 de las quimioquinas

El receptor CXCR4 fluorescente se obtiene por fusión de su ADNc con aquel de EGFP así como se describe en Valenzuela *et al.* (2001) y en Palanché *et al.* (2001), y se expresa de manera estable en células HEK 293. Las células se suspenden a una concentración de 1.000.000 de células /ml en un tampón fisiológico de Hepes (en mM: 137,5 NaCl; 1,25 MgCl₂; 1,25 CaCl₂; 6 KCl; 5,6 glucosa; 10 Hepes; 0,4 NaH₂PO₄; 1% de BSA (v/v); pH 7,4), y se disponen en una cubeta de fluorescencia de 1 ml, ella misma dispuesta en el portador agitante de un espectrofluorímetro. La suspensión de células se excita a 470 nm, y la emisión de fluorescencia se monitoriza a 510 nm. La adición de 50 nM de Texas Red-SDF1 α provoca una disminución de la emisión de fluorescencia de la proteína fluorescente portada por el receptor que refleja la etapa de asociación del ligando al receptor. El transcurso del tiempo de esta etapa se continúa por una monitorización de la emisión a 510 nm. Alternativamente, el complejo entre el receptor y Texas Red-SDF1 α se forma en una cubeta de fluorescencia dispuesta en el espectrofluorímetro antes de añadir un exceso (500 nM) de SDF1 α para iniciar la etapa de disociación del complejo receptor ligando. El transcurso del tiempo de esta etapa de disociación se monitoriza a 510 nm. Para identificar un efector alostérico del receptor CXCR4, se preincuban las células con una, o varias, molécula(s) conocida(s) o no conocida(s), y se monitoriza el transcurso del tiempo de la etapa de asociación y/o de la etapa de disociación. Después, las cinéticas monitorizadas se ajustan mediante una curva multiexponencial de tipo $y = \lambda_1 \exp(-k_{1ap} \times T) + \lambda_2 \exp(-k_{2ap} \times T) + \text{“recta”}$, en el que λ_1 y λ_2 son las amplitudes de las relajaciones rápidas y lentas, k_{1ap} y k_{2ap} son las constantes de velocidad aparente de asociación o de disociación rápida o lenta, T es el tiempo y “recta” es una corrección matemática de la deriva de la señal. Un efector alostérico o bien acelera, o bien ralentiza el transcurso del tiempo bien de la etapa de asociación, o bien de la etapa de disociación, o bien de las dos. Esto se traduce por una variación relativa de las amplitudes de asociación (o de disociación) rápida y lenta, en comparación a la condición experimental de control (sin efector).

Referencias

- Alber y Kawasaki (1982) *J. Mol. Appl. Gen.*, **1**, 419-434,
- Baulmann *et al.* (2000) *Neuroscience*, **95**, 813-820,
- Beaucage y Caruthers (1981) *Tett. Lett.*, **22**, 1859-1869,
- Befort *et al.* (1996) *Neurochem. Res.*, **11**, 1301-1307,
- Birdsall *et al.* (1999) *Mol. Pharmacol.*, **55**, 778-786,
- Brisco, J. *et al.* (1996) *Phylos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **351**, 167-171,
- Bruns & Ferguns (1990) *Mol. Pharmacol.*, **38**, 939-949,
- Burstein *et al.* (1997) *Mol. Pharmacol.*, **51**, 312-319,
- Chalfie (1995) *Photochem. Photobiol.*, **62**, 651-656,
- Clegg (1995) *Current Opinion in Biotechnol.*, **6**, 103-110,
- Cormack *et al.* (1995) *Gene*, **173**, 33-38,
- Cormack *et al.* (1996) *Gene*, **173**, 1246-1251,
- Cramer *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.*, **14**, 315-319,
- Ehrig *et al.* (1995) *FEBS Lett.*, **367**, 163-166
- Fawzi *et al.* (2001) *Mol. Pharmacol.*, **59**, 30-37,
- Förster (1951) *En Fluoreszenz organischer Verbindung*. Vandenhoeck and Rupprecht, Göttingen,
- Galzi & Alix (1997), *Solicitud Internacional WO 98/55873*,
- Galzi *et al.* (1996) *EMBO J.*, **15**, 5824-5832,
- Galzi *et al.* (1996) *PNAS*, **93**, 1853-1858,
- Gicquiaux *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 6645-6655,
- Haas *et al.* (1996) *Curr. Biol.*, **6**, 315-323,

- **Hall** (2000) *Mol. Pharmacol.*, **58**, 1412-1423,
- **Hausdorff et al.** (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 1388-1393,
- 5 - **Heim & Tsien** (1996) *Current Biology*, vol. n° 6, p 178-182,
- **Heim, Cubitt y Tsien** (1995) *Nature*, **373**, 663-664,
- **Hille, B.** (1992) en *Ion channels of excitable membranes*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachussets,
- 10 - **Hitzeman et al.** (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 12073-12080,
- **Hoare & Strange** (1995) *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 92S,
- 15 - **Hoare et al.** (2000) *British J. Pharmacol.*, **130**, 1045-1059,
- **Honneger et al.** (1988) *EMBO J.*, **7**, 3053-3060,
- **Ihle, J.N.** (1995) *Nature*, **377**, 591-594,
- 20 - **Ilien et al.** (2003) *J. Neurochem.*, **85**, 768-778,
- **Jakubik et al.** (1997) *Mol. Pharmacol.*, **52**, 172-179,
- 25 - **Ko et al.** (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 357-369,
- **Kostenis y Mohr** (1996), *Trends in Pharmacol. Sci.*, **17**, 280-283,
- **Krause et al.** (1997) *Mol. Pharmacol.*, **53**, 283-294,
- 30 - **Lakey et al.** (1991) *J. Mol. Biol.*, **218**, 639-653,
- **Lazareno & Birdsall** (1995) *Mol. Pharmacol.*, **48**, 362-378,
- 35 - **Lefkowitz** (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 18677-18680,
- **Mangelsdorf et al.** (1995), *Cell*, **83**, 835-839,
- **Massot et al.** (1996), *Mol. Pharmacol.*, **50**, 752-762,
- 40 - **McKnight et al.** (1985) *EMBO J.*, **4**, 2093-2099,
- **Miyawaki et al.** (1997) *Nature*, vol. 388, p 882-887,
- 45 - **Monod et al.** (1965) *J. Mol. Biol.*, **12**, 88-118,
- **Moutou et al.** (1994) *Tet. Lett.*, **35**, 6883-6886,
- **Mulle et al.** (1992) *Neuron.*, **8**, 937-945,
- 50 - **Nicolini et al.** (1995) *Biosens. Bioelection.*, **10**, 723-733,
- **Nunnari et al.** (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 12387-12392,
- 55 - **Palanché et al.** (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 34853-34861,
- **Pan et al.** (2001) *Aneastesiology*, **95**, 416-420,
- **Prasher et al.** (1992) *Gene*, **111**, 229-233,
- 60 - **Reichel et al.** (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 5888-5893,
- **Rubin y Changeux** (1966) *J. Mol. Biol.*, **21**, 265-274,
- 65 - **Russell** (1985) *Gene*, **40**, 125-130,
- **Subramani et al.** (1981) *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 854-864,

- Tucek y Proska (1995) *TIPS*, **16**, 205-212,
- Valenzuela *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 26550-26558,
- 5 - Vasuvedan *et al.* (1992) *FEBS Lett.*, **311**, 7-11,
- Vlack *et al.* (1988) *J. Gen. Virol.*, **69**, 765-776,
- Vollmer *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 37915-37922,
- 10 - Vuong y Chabre (1990) *Nature*, **346**, 71-74,
- Ward *et al.* (1980) *Photochem. Photobiol.*, **31**, 611-615,
- 15 - Waugh *et al.* (1999) *J. Pharm. Exp. Ther.*, **291**, 1164-1171,
- Weill *et al.* (1999) *J. Neuro. Chem.*, **73**, 791-801,
- Wu y Brand (1994) *Anal. Biochem.*, **218**, 1-13,
- 20 - Wurtz, J. L. *et al.* (1996) *Nature Struct. Biol.*, **3**, 206,
- Yan *et al.* (1996) *Nucleic Ac. Res.*, **24**, 4592-4593,
- 25 - Yarden, Y. y Ullrich, A. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3113-3119,
- Young *et al.* (1982) en Genetic Engineering of microorganisms for chemicals (Hollaender *et al.* eds), *Plenum Press*, NY 1982,
- 30 - Yuan *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 2157-2164,
- Zolotukhin *et al.* (1996) *J. Virol.*, **70**, 4646-4654.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de un efector alostérico de un receptor, mediante determinación de la variación:

- de la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con respecto a la cinética de disociación y/o de asociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,
- y/o de la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con respecto a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,

con la condición de que cuando la variación de dicha amplitud es negativa, se detecta igualmente la existencia de la variación de dicha cinética,

estando dicho receptor y dicho ligando implicados en por lo menos una respuesta biológica en condiciones fisiológicas apropiadas, y siendo el efector alostérico capaz de modular por lo menos una de las respuestas,

siendo dicho receptor marcado mediante una proteína fluorescente seleccionada de entre las proteínas fluorescentes que proceden o derivan de proteínas autofluorescentes de nematocistos, cuyo coeficiente de extinción molecular es superior a aproximadamente $14000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, y el rendimiento cuántico de fluorescencia es superior a aproximadamente 0,38,

estando el ligando marcado mediante un marcador constituido:

- o bien por una molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente,
- o bien por una sustancia fluorescente,

llevándose a cabo dichas determinaciones de la variación de la cinética de disociación y/o de asociación y de la variación de la amplitud, mediante transferencia de energía de fluorescencia:

- entra la proteína fluorescente mencionada anteriormente y dicha sustancia fluorescente, siendo la sustancia fluorescente de tal manera que, o bien es excitable a la longitud de onda de emisión de la proteína fluorescente mencionada anteriormente, o bien emite a la longitud de estimulación de la proteína fluorescente mencionada anteriormente, o
- entre la proteína fluorescente mencionada anteriormente y dicha molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, siendo dicho receptor marcado por una proteína fluorescente seleccionado de entre:

- la proteína fluorescente verde (GFP o EGFP), la proteína fluorescente cian (CFP o ECFP), la proteína fluorescente amarilla (YFP o EYFP) o GFPUV, o
- variantes derivadas de GFP, de CFP, de YFP o de GFPUV, por adición, supresión o sustitución de uno o varios aminoácidos, con la condición de que estas variantes conservan la propiedad de fluorescencia,
- o fragmentos de GFP, CFP, YFP o GFPUV, o fragmentos de dichas variantes, con la condición de que estos fragmentos conservan la propiedad de fluorescencia,

estando dicho ligando marcado mediante un marcador constituido por:

- o bien una molécula susceptible de absorber la luz emitida por la proteína fluorescente,
- o bien una sustancia fluorescente,

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque el ligando es un antagonista.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque el ligando es un agonista.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque se determina:

- la variación de la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con respecto a la amplitud de la unión formada entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector,

y porque dicha variación es negativa, lo que necesita la determinación de:

- la variación de la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y uno de sus ligandos en presencia de dicho efector alostérico, con relación a la cinética de disociación del complejo formado entre dicho receptor y dicho ligando, en ausencia de dicho efector.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicha variación de cinética de disociación es positiva o negativa, lo que implica que el compuesto ensayado es un efector alostérico.

FIGURA 1

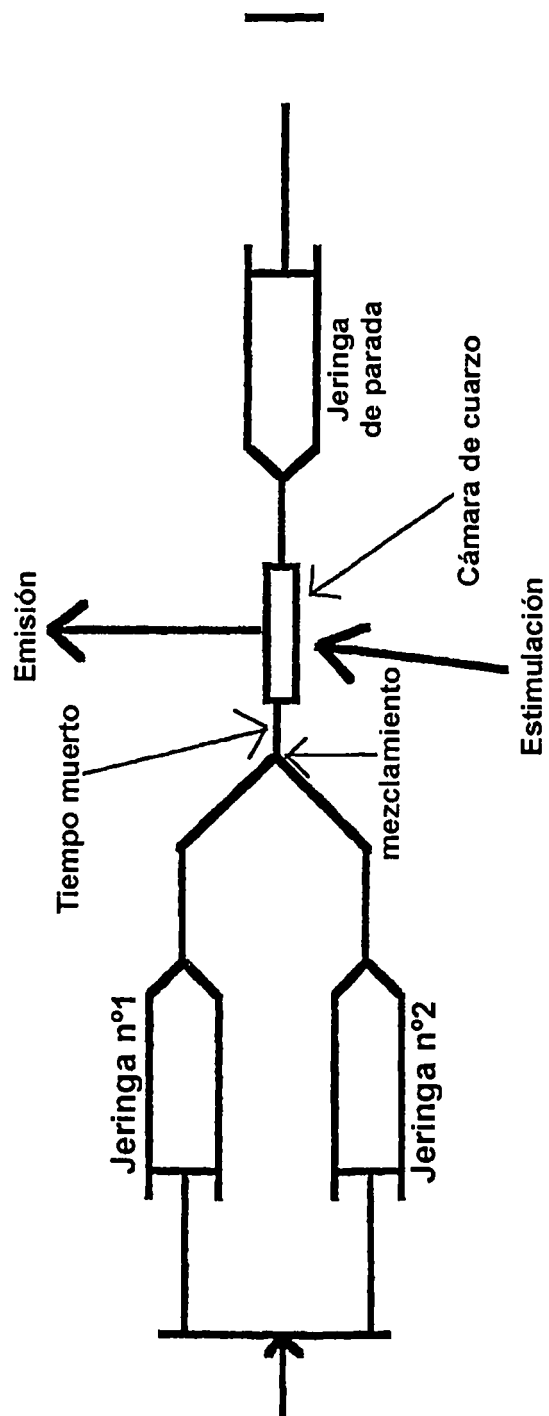


FIGURA 2

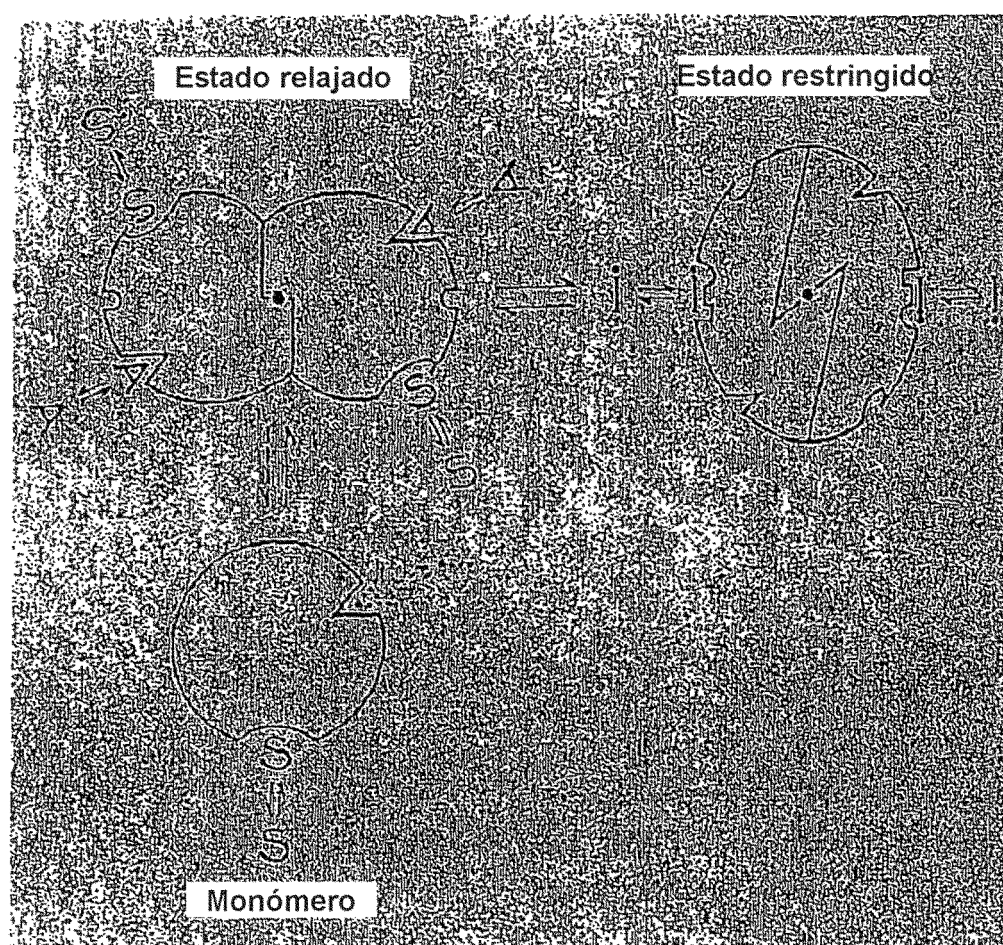


FIGURA 3A

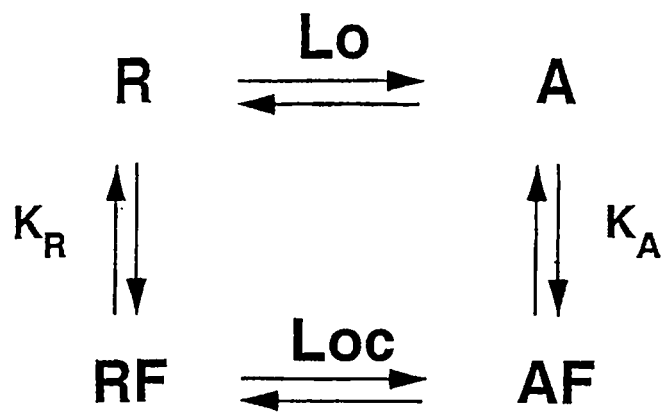


FIGURA 3B

$$Lo' = Lo [(1+\beta d)/(1+\beta)]^n, \text{ con } \beta = K_A/K_R \text{ y } d = F/K$$

FIGURA 4A

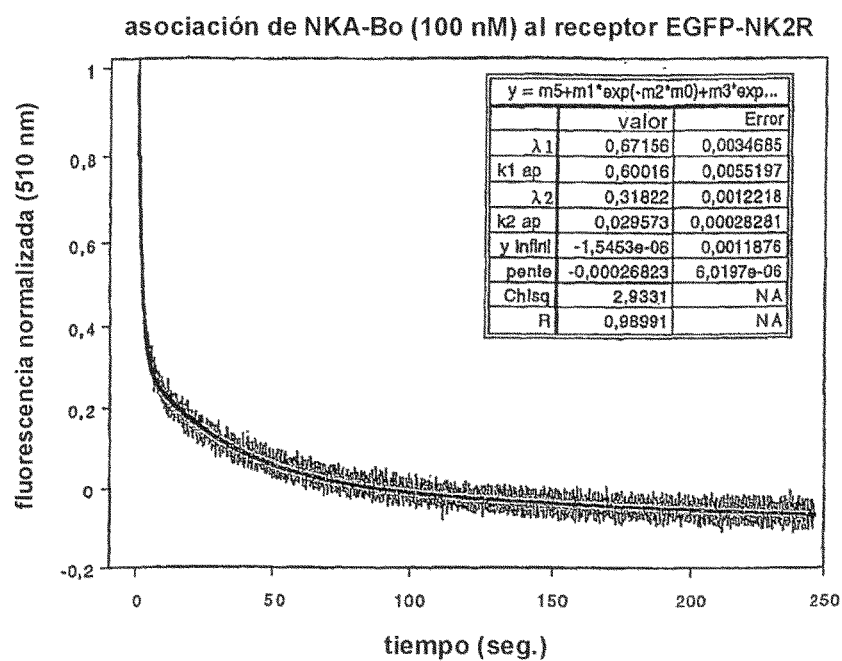


FIGURA 4B

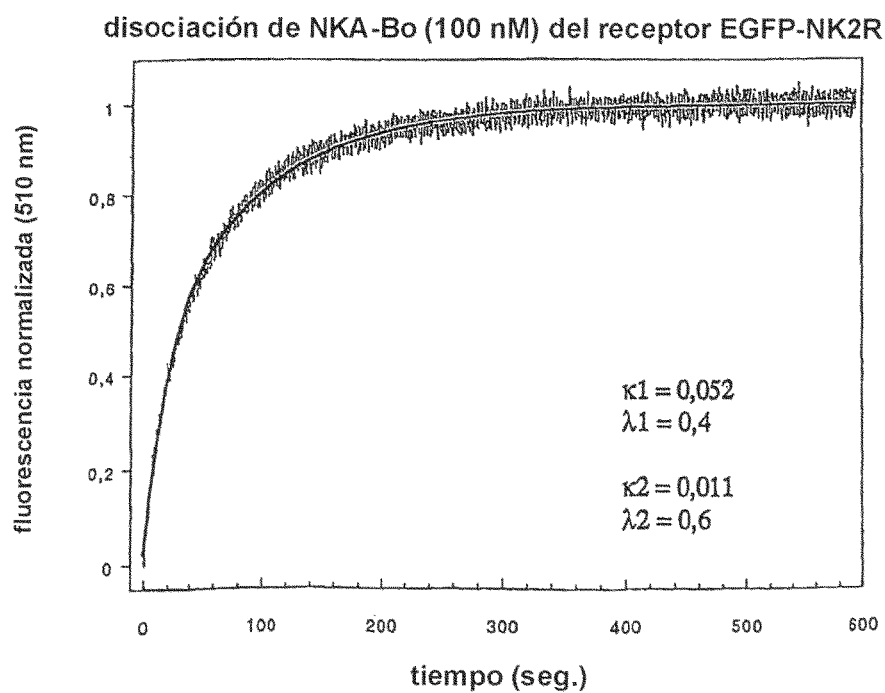


FIGURA 5A

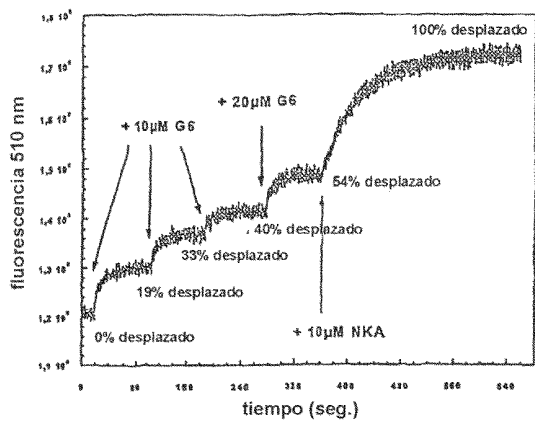


FIGURA 5B

Disociación de NKA-Bo en presencia de SR48968

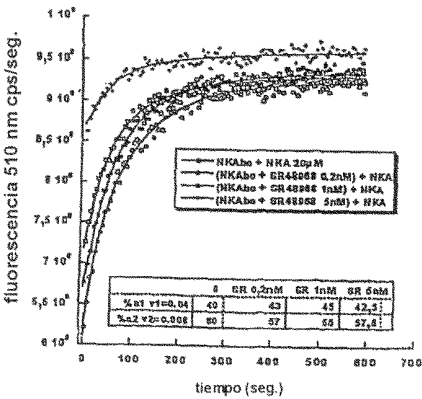


FIGURA 5C

Disociación de NKA-Bo en presencia y en ausencia de G6

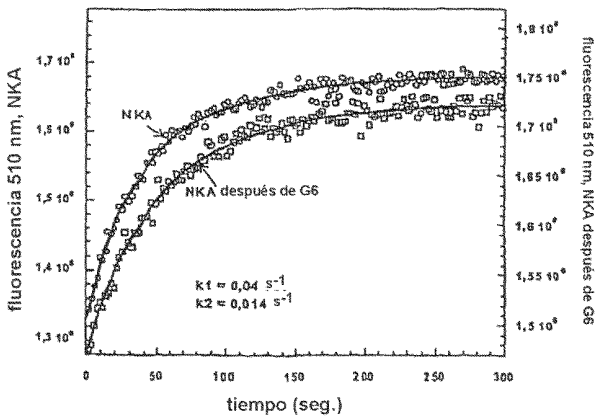


FIGURA 5D

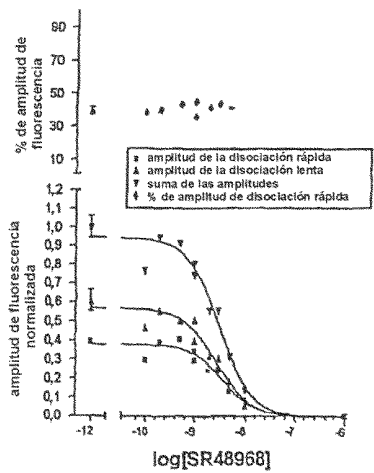


FIGURA 6A

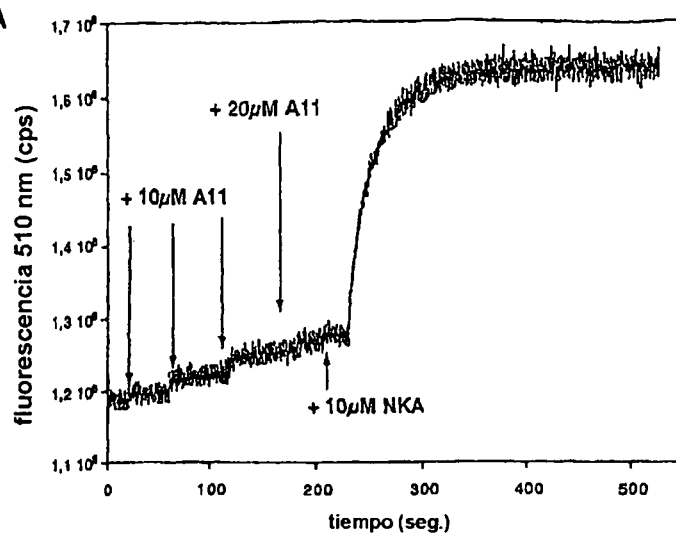


FIGURE 6B

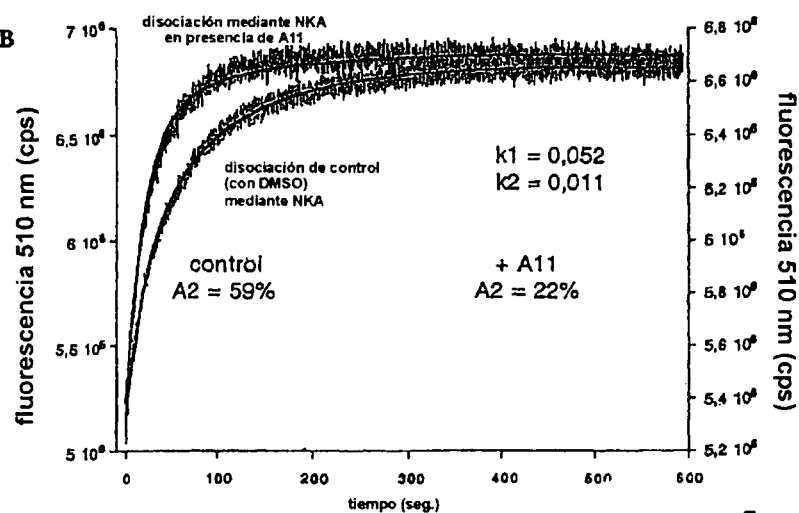


FIGURE 6C

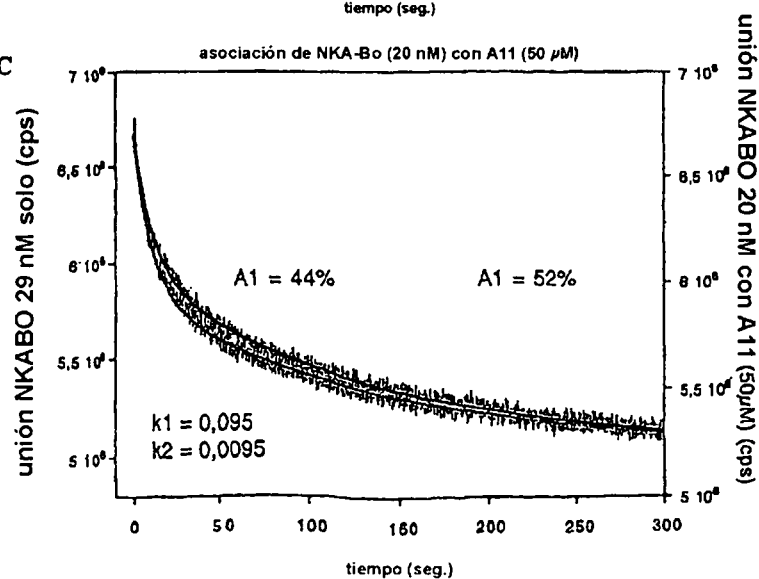


FIGURA 7A

Disociación de NKA-Bo
en presencia de 805

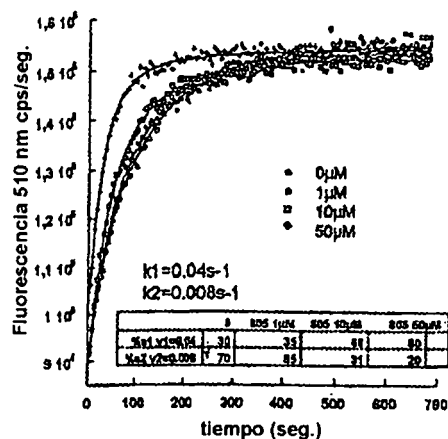


FIGURA 7B

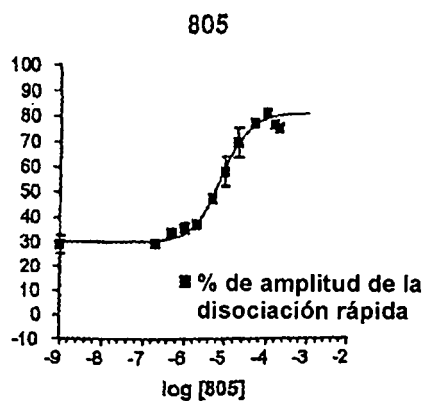


FIGURA 7C

NP246

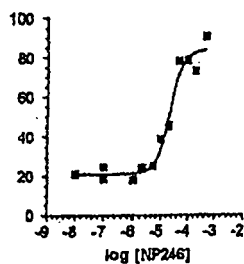


FIGURA 7D

A11

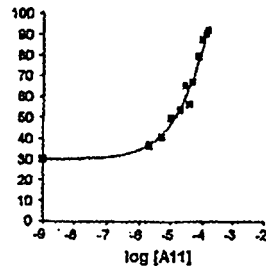


FIGURA 7E

H10

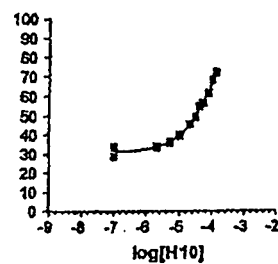


FIGURA 7F

G11

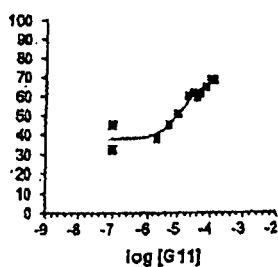


FIGURA 7G

F7

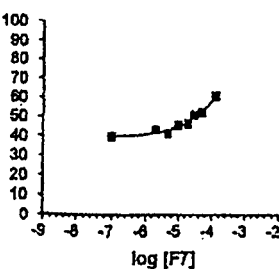


FIGURA 7H

F3

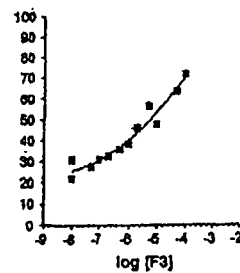
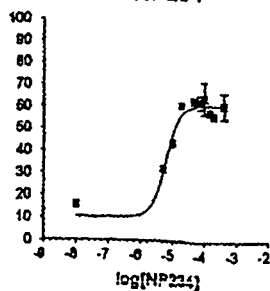


FIGURA 7I

NP234



■ % de amplitud de la
disociación rápida

FIGURA 8A

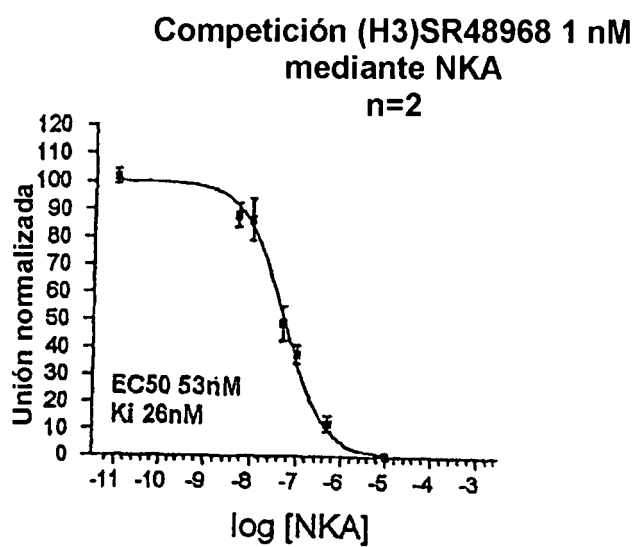


FIGURA 8B

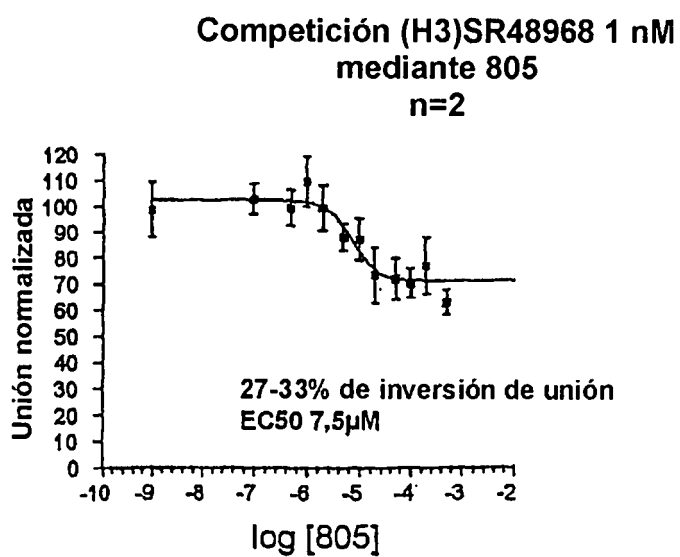


FIGURA 9A

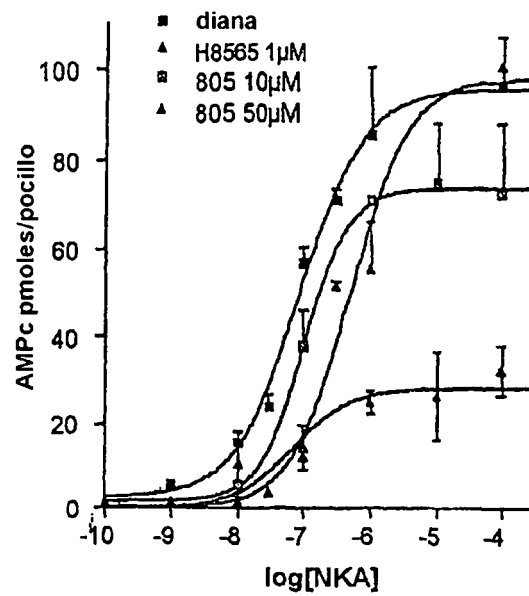


FIGURA 9B

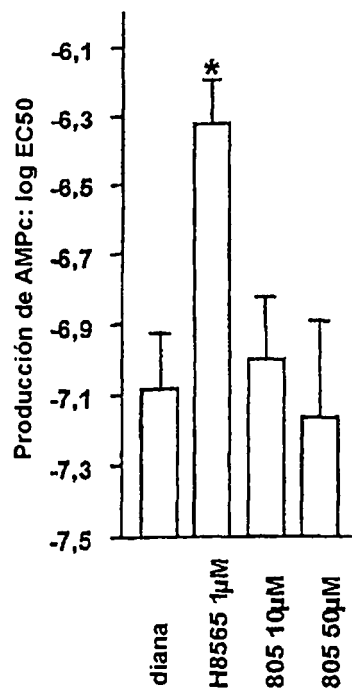


FIGURA 9C

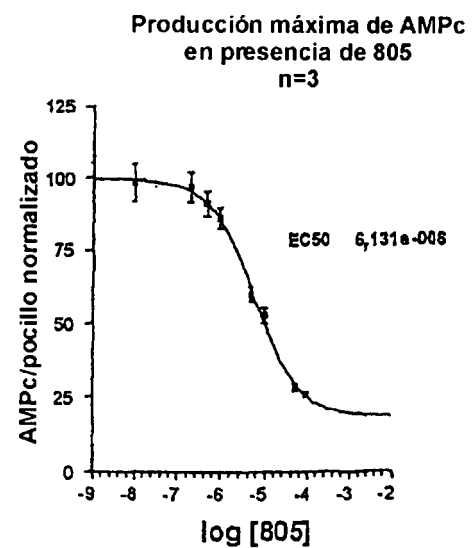


FIGURA 10A

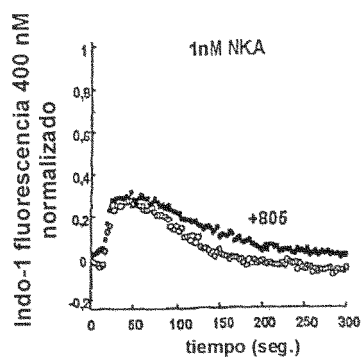


FIGURA 10B

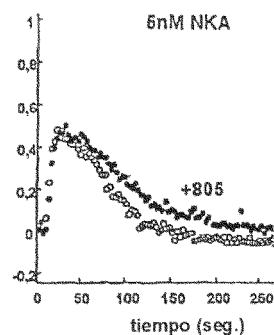


FIGURA 10C

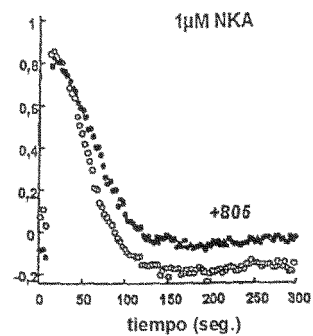


FIGURA 10D

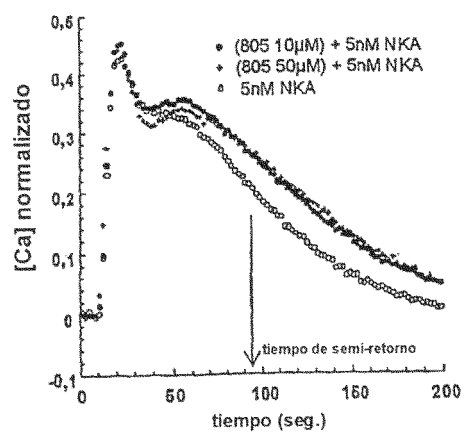
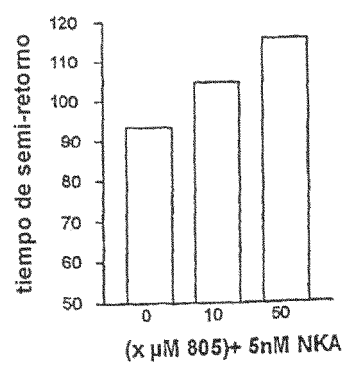


FIGURA 10E



Respuesta cálcica con NKA4-10 TR7
en presencia y en ausencia de 20 μ M 805

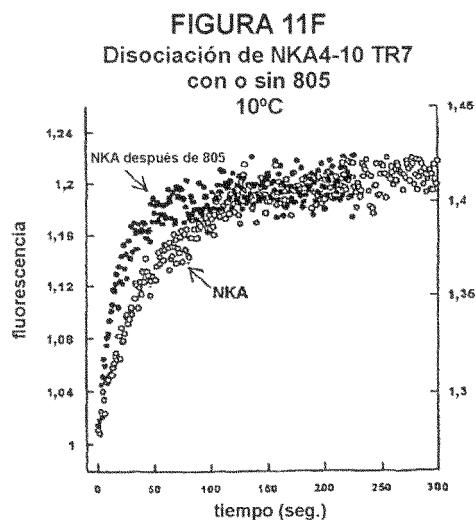
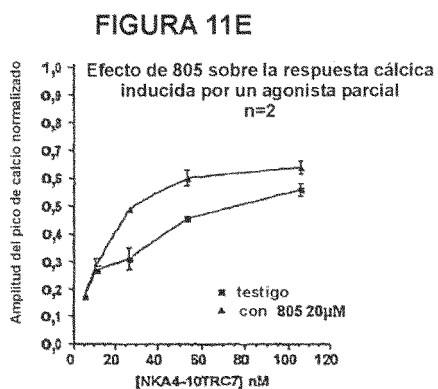
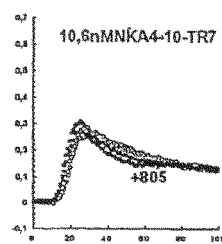
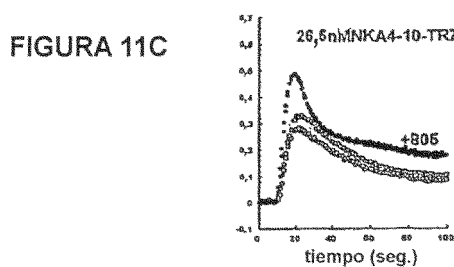
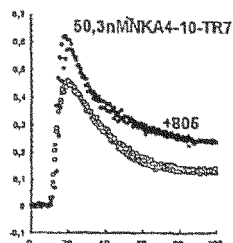
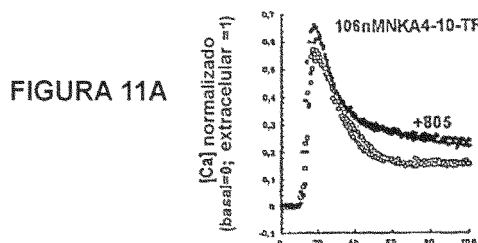


FIGURA 11G

Disociación de NKA4-10 TR7
en presencia de 805

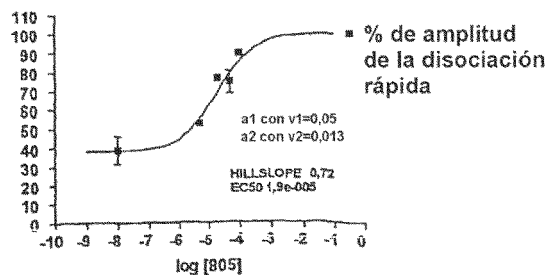


FIGURA 12A

FIGURA 12B

Respuesta cálcica sobre NK1 humano con la sustancia P
en presencia y en ausencia de 20 μ M805

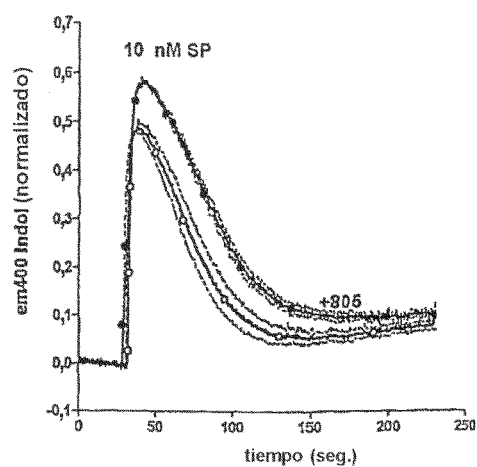
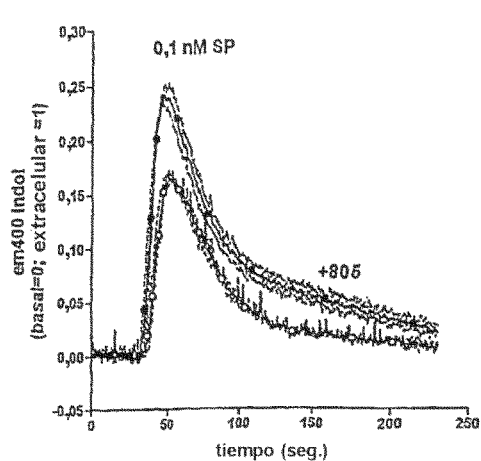


FIGURA 12C

FIGURA 12D

Respuesta cálcica sobre NK2 humano con la NKA
en presencia y en ausencia de 20 μ M805

