

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 601**

51 Int. Cl.:

A61K 31/047 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C12Q 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2008 E 08001165 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1949894**

54 Título: **Mejora de inhibidores de fosfatasa conteniendo vanadio con polioles**

30 Prioridad:

25.01.2007 EP 07001593

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

03.11.2016

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**FERNHOLZ, ERHARD y
MAYR, DOROTHEA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 588 601 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

Mejora de inhibidores de fosfatasa conteniendo vanadio con polioles

5 El presente invento se refiere a la bioquímica de fosfatasas. Particularmente el invento trata sobre compuestos que pueden utilizarse como aditivos al lado de inhibidores conteniendo vanadio de diferentes enzimas de fosfatasa. Los compuestos de aditivos de conformidad con el invento proporcionan una mejora en el efecto inhibidor. Como consecuencia concentraciones inferiores de compuestos conteniendo vanadio pueden ser utilizadas para obtener una inhibición suficiente de fosfatasas.

10 Antecedentes del invento

15 La US 2006/0252683 A1 se refiere a la preparación de un compuesto peptídico su empleo para activar enzimas de proteína fosfatasa-2A para la desfosforilación de proteínas in vitro y en la células, y su empleo para inhibir la proliferación celular e inducción de muerte de células de cáncer cerebral y otras células de cáncer. En el documento se describe purificación de fosfatasa proteínica 2A de células Jurkat. El tampón de homogeneización contiene ortovanadato sódico. La WO 2003/029209 describe derivados de pirazolo-pirimidina y su empleo. En el documento se describe un ensayo que utiliza ortovanadato sódico como un inhibidor de tirosina fosfatasa. La WO 1999/58097 se refiere a formas variantes de prolactina humana que actúa como antagonistas en el receptor de prolactina. El documento describe un tampón de lisis celular que contiene ortovanadato sódico. La WO 2000/57184 se dirige a la caracterización de proteínas interactivas que se originan de *saccharomyces cerevisiae*. El documento describe un tampón de extracción de proteína de levadura con ortovanadato sódico. La EP 0051964 describe aditivos de forraje que contiene diferentes compuestos de vanadio. La WO 2004/052412 describe apósitos de heridas con vanadato y peroxovanadato orgánicamente acomplejado. La WO 2005/054257 describe compuestos de vanadio como inhibidores de fosfatasa, en combinación con ciertas sustancias de vehículo. La US 6299865 describe reducción de crecimiento de pelo mamario aplicando a la piel un inhibidor de fosfatasa alcalina. En una modalidad se utiliza orotovanadato sódico. La EP 0524633 se dirige a una composición farmacéutica apropiada para influenciar el sistema reticuloendotélico y para tratar mucoviscidosis y síndromes de dolor crónico derivado de enfermedades locomotoras degenerativas o acompañado de enfermedades de origen tumoral, conteniendo la composición farmacéutica vanadio en una forma acuosoluble farmacéuticamente aceptable. La US 5776714 describe peroxidasa de apo-rábano picante y entre otros productos, elementos analíticos secos que tienen una capa esparcida porosa que comprende sulfato de vanadilo.

35 Un fosfato es una enzima que hidroliza monoésteres de ácido fosfórico a un ión fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre. Esta acción se opone directamente a la de fosforilasas y kinasas, que unen grupos fosfato a sus substratos utilizando moléculas que conservan energía química como ATP.

40 Las fosfatasas pueden categorizarse en dos categorías principales: metaloenzimas (que son dependientes de la presencia de dos o mas iones de metal en sus sitios activos para actividad), y no metaloenzimas. Estas categorías pueden dividirse en sub-categorías adicionales. Las metaloenzimas con mucho comprenden la mayor masa de fosfatasas y contienen enzimas tales como fosfatasa alcalina (tres iones de metal, solo dos de los cuales son catalíticamente activos), las fosfatasas de serina treonina y monofosfatasa de inositol. De las no-metaloenzimas las mejor conocidas son las fosfatasas de proteína tirosina, que hidrolizan residuos de fosfo-tirosina.

45 La presencia o ausencia de un grupo fosfato en proteínas se sabe que juega un papel regulador en muchas trayectorias biomédicas y particularmente de transducción de señal. Los residuos de tirosina pueden etiquetarse con un grupo fosfato (fosforilado) mediante protein-quinasas. El residuo de tirosina en su estado fosforilado se refiere como fosfotirosina. La fosforilación de tirosina se considera una de las etapas clave en la transducción de señal y regulación de actividad enzimática. La fosfotirosina puede detectarse a través de anticuerpos específicos. 50 Conjuntamente, las quinatas y fosfatasas especializadas regulan la actividad de enzimas, receptores y otros componentes de trayectorias de transducción de señales, factores de transcripción, y otras proteínas funcionales.

Así pues, existen numerosos métodos bioquímicos que tienen por objeto la detección de proteínas fosforiladas en una muestra biológica. Por ejemplo material células muestreado se lisa y la fracción proteínica se somete a separación mono-dimensional (por ejemplo SDS-PAGE) o bi-dimensional (por ejemplo 1ª dimensión: enfoque isoelectrico, 2ª dimensión: SDS PAGE) separación de proteínas fosforiladas de bandas o puntos se detectan mediante anticuerpos específicos de fosfoserina o fosfotirosina. Otros métodos de detección específicos utilizan anticuerpos que ligan específicamente proteínas fosforiladas particulares. Estos anticuerpos se utilizan frecuentemente para la detección histocitoquímica de proteínas objetivo fosforiladas en secciones de tejido embebidas de parafina fijada con formalina de material de biopsia. 60

Independientemente del método de detección utilizado, el resultado de los análisis de proteínas fosforiladas se desea que reflejen el estado de fosforilación en el punto de tiempo que se inicia el experimento, o sea cuando las células son lisadas o el tejido se fija y secciona. Mas generalmente se desea conservar el estado de la fosforilación de proteínas en un cierto punto en el tiempo. La conservación se obtiene impidiendo que los fosfato ésteres se hidrolicen de sus proteínas objetivo. Para este fin el estado del arte proporciona una serie de sustancias aptas para 65

inhibir la actividad de la fosfatasa. Los inhibidores se aplican de forma rutinaria cuando se llevan a cabo ensayos para la detección de proteínas fosforiladas pero también cuando las proteínas fosforiladas han de purificarse en grandes cantidades.

5 Entre los inhibidores conteniendo vanadio de actividad de fosfatasa el pervanadato y vanadato son las sustancias mas ampliamente utilizadas. El vanadato es un análogo de fosfato que imita el estado de transición de la hidrólisis de fosfato y se considera, por consiguiente, como un inhibidor de fosfatasa general. Sin embargo, el vanadato se reconoce como particularmente apropiado para inhibir las fosfatasas de tirosina (Huyer, G., y col., J. Biol. Chem. 272 (1997) 843-851) y fosfatasas alcalinas (por ejemplo Stankiewicz, P.J., y col., en Met.Ions Biol. Syst. 31 (1995) 287-10 324). Pero también se ha reportado la inhibición de otra fosfatasa como ATPases, fosfatasa de glucosa-6, fosfatasa de ácido o fructosa-2,6-bisfosfatasa.

Sin embargo, una desventaja es que con el fin de proporcionar una cantidad efectiva de vanadato ha de estar en una concentración en el rango micromolar o aún milimolar. A este respecto, una "cantidad efectiva" se entiende como estando entre 1x (una vez) y 50x (cincuenta veces) en la concentración del inhibidor en una solución acuosa que a una concentración 1x reduce la actividad de una fosfatasa mediante el factor de 20. En contraste al vanadato se conocen otros inhibidores de actividad de fosfatasa que son efectivos a concentraciones nanomolares. Un ejemplo es Cantharidin.

20 Sin embargo se ha reportado, no obstante, que el efecto inhibidor puede mejorarse con la formación de complejos conteniendo vanadato estables. Por ejemplo bisperoxo de potasio (bipiridina) oxovanadato (V) y bisperoxo potásico (1,10 fenantrolina) oxovanadato (V) son ambos mas potentes que el ortovanadato. Sin embargo la complejación del vanadato no es necesariamente un prerrequisito para mejorar la potencia. Por ejemplo, la hidroxilamina o dimetilhidroxilamina forman espontáneamente complejos con vanadato. La potencia de estos complejos permanece igual o se reduce en cierta medida (Cuncic., y col., Biopchem. Pharmacol. 58 (1999) 1859—1867). En ensayos a base de células se encontró que estos dos compuestos aumentan la absorción del vanadato en el lumen celular (Nxumalo, F., y col., J. Biol. Inorg. Chem. 3 (1998) 534-542; Cuncic, C., y col., Biochem. Pharmacol. 58 (1999) 1859-1867).

30 Se conoce también que en presencia de ciertos reactivos formadores de complejos como EDTA el efecto inhibidor de fosfatasa del vanadato se reduce según un factor de alrededor de 1.000 (Huyer, G., et al., J. Biol. Chem 272 (1997) 843-851). Esto es particularmente desventajoso debido a que el EDTA se utiliza frecuentemente en bioquímica como un estabilizador y como un inhibidor de metaloenzimas tal como fosfatasas y proteasas. Otro estabilizador de importancia para uso en la preparación de lisados celulares es ditiotreitól (DTT). Los inventores han encontrado que el DTT reduce también hasta una extensión significativa el efecto inhibidor del vanadato o fosfatasas.

40 En vista de las desventajas del estado del arte constituye un objeto del presente invento el proporcionar compuestos alternativos que mejoren el efecto inhibidor de los compuestos conteniendo vanadato sobre enzimas con actividad de fosfatasa. Constituye otro objeto del invento el proporcionar compuestos que contrarresten los efectos negativos de EDTA y DTT sobre los compuestos que contienen vanadato.

45 Los inventores han encontrado, sorprendentemente, que en presencia de un poliol se potencia el efecto inhibidor del vanadato sobre las fosfatasas y particularmente sobre fosfatasas de fosfotirosina específicas. Este efecto se observó aún con un poliol muy simple como el glicerol, pero también con alcoholes de azúcar como manitol. Aún mas sorprendentemente, los efectos negativos de EDTA y DTT sobre el vanadato se encontraron reducidos significativamente o aún abolidos por completo.

50 Resumen del invento

Una primera modalidad del invento es una composición líquida que comprende un disolvente acuoso, una enzima con actividad de fosfatasa, ortovanadato, manitol y ditiotreitól, caracterizada porque la concentración de manitol se encuentra entre 1 mM y 100 mM, y la relación molar de manitol y ortovanadato es igual o superior a 1:1. Una segunda modalidad del invento es un uso in vitro de un alcohol de azúcar acuosoluble con 4-100 átomos de carbono para mejorar el efecto inhibidor de un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y sus mezclas sobre una enzima con actividad de fosfatasa apta para hidrolizar el enlace de fosfoéster de un residuo de fosfotirosina en el péptido de SEQ ID NO:1 disuelto en una solución acuosa tamponada con un pH neutro y conteniendo iones de Ca^{2+} a una concentración entre 0,7 mM y 1,2 mM. Una tercera modalidad del invento es un método in vitro para mejorar el efecto inhibidor de un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y sus mezclas sobre una enzima con actividad de fosfatasa apta para hidrolizar el enlace de fosfoéster de un residuo de fosfotirosina en el péptido SEQ ID NO:1 disuelto en una solución acuosa tamponada con un pH neutro y conteniendo iones de Ca^{2+} en una concentración entre 0,7 mM y 1,2 mM, que comprende las etapas de (a) disolver en un disolvente acuoso una composición que comprende (i) el compuesto iónico, y (ii) un alcohol de azúcar soluble en agua con 4-100 átomos de carbono, con lo que la relación molar del alcohol de azúcar en el compuesto iónico es igual o superior a 1:1, y (b) poner en contacto la enzima con actividad de fosfatasa con la solución de la etapa (a). Una cuarta modalidad del invento es un juego de partes que

comprenden material de envasado y una composición que comprende (i) un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y sus mezclas, (ii) un alcohol de azúcar soluble en agua con 4-100 átomos de carbono, con lo que la relación molar del alcohol de azúcar y el compuesto iónico es igual o superior a 1:1.

5

Descripción detallada del invento

Ciertos términos se utilizan con significado particular, o se definen por primera vez, en esta descripción del presente invento. Para fines de entendimiento del presente invento los términos utilizados para describir el invento se definen por sus definiciones aceptadas en el arte, cuando estas existen, excepto cuando estas definiciones están en desacuerdo o están parcialmente en desacuerdo con las definiciones expuestas a continuación. En el caso de un desacuerdo en la definición el significado de los términos se definen primero por las definiciones expuestas a continuación.

El término "comprendiendo" se utiliza en la descripción del invento y en las reivindicaciones para significar "que incluye, pero no necesariamente limitado a". El artículo indefinido "a" en combinación con un término que denota un compuesto químico tal como un inhibidor o un aditivo se utiliza para denotar "uno o mas". Un "inhibidor de fosfatasa" es una sustancia que es efectiva para inhibir la hidrólisis de fosfoésteres mediante actividad enzimática de fosfatasa, y por consiguiente la liberación de iones de fosfato de una molécula objetivo. Una solución "acuosa" se entiende como una solución en donde el disolvente líquido es un disolvente acuoso que comprende por lo menos 80% (v/v) de agua, mas preferido 95% (v/v), aún mas preferido 99% (v/v), todavía aún mas preferido 100% (v/v). El experto aprecia que la solución comprende además uno o mas de otros compuestos tales como una sal, un tampón, un inhibidor, un aditivo, y una molécula biológica, con lo que el uno o mas compuestos se disuelven en el disolvente líquido.

25

Una composición de conformidad con la presente revelación comprende un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadilo (II), vanadato (IV), vanadato (V), vanadato oligomérico (V), y sus mezclas. Muy preferido, el compuesto conteniendo vanadio iónico es ortovanadato (V) y sus oligómeros. Un oligómero preferido se elige del grupo constituido por un ión di-, tri-, y tetravanadato. Otro compuesto iónico muy preferido en la composición de conformidad con el invento es un ión de peroxovanadato. Sin embargo mas preferido es el ortovanadato (VO_4^{3-}).

30

El "poliol" en la composición de conformidad con el invento es un compuesto orgánico soluble en agua en donde dos o mas grupos hidroxilo se enlazan covalentemente con átomos de carbono. Se prefiere que dos de los grupos hidroxilo del poliol de conformidad con el invento se enlacen a dos átomos de carbono adyacentes. Dicho de otro modo, el poliol preferido comprende dos grupos hidroxilo vecinales. Sin embargo los polioles con mas de dos grupos hidroxilo vecinales son preferidos. Muy bien conocido de conformidad con el invento reivindicado los polioles con grupos hidroxilo vecinos son alcoholes de azúcar. Un "alcohol de azúcar" es una forma hidrogenada de carbohidrato, cuyo grupo carbonilo (aldehído o cetona) se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario.

35

La forma no hidrogenada del carbohidrato es también referida como un azúcar "reductor".

40

La composición de conformidad con el invento comprende un alcohol de azúcar con 4-100 átomos de carbono. A este respecto son muy preferidos mono-, di-, tri- y tetrasacáridos no reductores.

Un alcohol de azúcar muy preferido es un monosacárido no reductor. Un alcohol de azúcar de esta índole puede ser un alcohol de azúcar C4 y elegido, de preferencia, del grupo constituido por treitol y eiritol. También muy preferido el alcohol de azúcar es un alcohol de azúcar C5 y de preferencia elegido del grupo constituido por ribitol, arabitol, xilitol y lixitol. También muy preferido, el alcohol de azúcar es un alcohol de azúcar deoxi C5 y de preferencia elegido del grupo constituido por deoxiribitol y deoxiarabitol. También muy preferido, el alcohol de azúcar es un alcohol de azúcar C6 y de preferencia elegido del grupo constituido por alitol, altritol, manitol, glucidol, glutol, iditol, galactitol y talitol.

50

De conformidad con el invento un alcohol de azúcar deoxi está abarcado por el término alcohol de azúcar con la condición que el azúcar deoxi proporcione cuatro o mas pares de grupos hidroxilo vecinos. Un alcohol de azúcar muy preferido es un alcohol de azúcar deoxi C6 y elegido de preferencia del grupo constituido por deoxiglucitol, y deoximanitol. También el alcohol de azúcar muy preferido es un alcohol de azúcar con otros sustituyentes en la posición C2 de la que un ejemplo preferido es N-acetil glucitol amina 2, con otros sustituyentes en la posición C2 como N-acetil glucitol amina-2.

55

Los disacáridos y monosacáridos pueden formar ambos alcoholes de azúcar; sin embargo los alcoholes de azúcar derivados de disacáridos (por ejemplo maltitol y lactitol) no están totalmente hidrogenados porque debido al enlace glicosídico solo está disponible para reducción un grupo aldehído. Lo mismo es aplicable a los trisacáridos y sacáridos superiores. Así pues, un di- o trisacárido no reducible o un oligosacárido superior sin reducción con hasta 100 átomos de C puede utilizarse con gran ventaja para la práctica del invento. La sacarosa es un alcohol de azúcar altamente preferido. Lo que es notorio sobre la sacarosa es que a diferencia de la mayoría de polisacáridos, el enlace glicosídico se forma entre los extremos reductores de ambos glucosa y fructosa, y no entre el extremo

65

reductor de uno y el extremo no reductor del otro. El efecto de esto inhibe el enlace adicional a otras unidades de sacárido. Debido a que no contiene átomo de carbono anomérico, es un azúcar no reductor.

5 De conformidad con el invento la relación molar preferida entre el poliol y el compuesto conteniendo vanadio iónico es superior a 1:1. Con mucha preferencia la relación molar se encuentra entre 70:1 y 5:1. Aún mas preferido la relación molar se encuentra entre 50:1 y 10:1.

10 Tomando la actividad de fosfatasa en una muestra en ausencia de inhibidor conteniendo vanadio como una referencia (100%) la combinación de un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadilo(II), vanadato (IV), vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y un poliol de conformidad con el invento, cuando se adiciona a la muestra, es capaz de reducir sustancialmente dicha actividad de fosfatasa. De preferencia dicha actividad se reduce hasta un valor entre 1,5% y 40%, mas preferido hasta un valor de entre 1,5% y 30%, aún mas preferido hasta un valor de entre 1,5% y 20%, aún mas preferido hasta un valor de entre 1,5% y 10%.

15 Por una parte el poliol mejora el efecto inhibidor del compuesto que contiene vanadio iónico sobre la actividad de la fosfatasa. Por otra parte el poliol reduce el efecto negativo de los agentes formadores de complejo. Es decir la inhibición de la actividad de la fosfatasa no se afecta adversamente por la presencia de un agente quelante para iones de metal cargados positivamente divalentes o trivalentes. La formación compleja de los iones divalentes pueden prevenir por ejemplo por consiguiente la actividad indeseada de una serie de proteasas sin efectos secundarios. Por este motivo la composición del invento comprende adicionalmente un agente quelante para iones de metal con carga positiva divalente o trivalente. Un agente quelante preferido se elige del grupo constituido por EDTA, citrato, EGTA y 1,10-fenantrolina. La concentración preferida del agente quelante en la composición de conformidad con el invento se encuentra entre 0,1 mM y 50 mM, mas preferentemente entre 0,2 mM y 10 mM, y mas preferentemente a alrededor de 1 mM.

25 Además, el poliol en la composición reduce el efecto negativo de reducir agentes sobre el compuesto que contiene vanadio iónico. Particularmente el DIT reduce la inhibición de la actividad de la fosfatasa mediante ortovanadato. Sin embargo, en la presencia de un poliol la reducción se invierte. Un agente reductor preferido se elige del grupo constituido por DTT (ditiotreitól), beta-mercaptoetanol, glutathiona y tioredoxina. La concentración preferida del agente reductor en la composición de conformidad con el invento se encuentra entre 0,1 mM y 30 mM, mas preferentemente entre 0,2 mM y 10 mM y mas preferido a alrededor de 1 mM.

35 En otra modalidad del invento la composición se proporciona para el usuario final en una forma conveniente. Para esto un ejemplo es un envase que contiene una cantidad medida de la composición. El material de envasado se elige de preferencia para impedir el contacto con el agua de vapor de agua. En adición puede almacenarse uno o mas envases en presencia de material secante tal como gel de sílice u otras sustancias apropiadas. La composición puede adoptar forma de un granulado suelto. Aún mas preferido, la composición adopta forma de una tableta. En este caso la composición puede contener en adición otros materiales que faciliten la formación de la tableta.

40 En adición, la composición del invento puede contener uno o mas inhibidores de fosfatasa adicionales que es un compuesto distinto de un compuesto que contiene vanadio. El uno o mas inhibidores de fosfatasa adicionales es de preferencia un inhibidor iónico como NaF. Asimismo preferido el inhibidor es un compuesto de bajo peso molecular elegido del grupo constituido por cantridin, naftil fosfato, y microcistin. Se prefiere también que el inhibidor sea un compuesto peptídico elegido del grupo constituido por péptido autoinhibidor de calcineurin, e inhibidor de protein fosfatasa 2.

50 Debido al efecto sorprendente de la presencia de un poliol en adición al compuesto que contiene vanadato, la composición de conformidad con el invento es apropiada para la inhibición de una enzima con actividad de fosfatasa. La composición es particularmente apropiada para inhibir una fosfatasa elegida del grupo constituido por una fosfatasa de ácido, una fosfatasa alcalina, una fosfatasa de fosfotirosina, una ATPasa, una fosfatasa de fosfoserina/trionina y una fosfatasa dual. Mas preferido, la composición se utiliza para inhibir una fosfatasa de tirosina proteínica, o sea para hidrolizar el éster de fosfato de un radical de fosfotirosina, con lo que el radical de fosfotirosina es parte de un polipéptido fosforilado. Ejemplos de polipéptidos que pueden contener un radical de tirosina fosforilado y que son un sustrato para una fosfatasa de proteína fosfotirosina-específica son el receptor fosforilado de eritropoyetina, pErk1, pErk2 y pJak2.

60 Otra modalidad de la presente divulgación es por tanto un método para inhibir una enzima con actividad de fosfatasa, que comprende las etapas de (a) disolver en un disolvente acuoso una composición que comprende (i) un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadilo (II), vanadato (IV), vanadato (V), vanadato oligomérico (V), y sus mezclas, y (ii) un poliol, y (b) poner en contacto la enzima con actividad de fosfatasa con la solución de la etapa (a).

65 Otra modalidad de la divulgación presente es por tanto una composición líquida que comprende la composición de conformidad con el invento y un disolvente acuoso. El pH de la composición líquida corresponde de preferencia a un valor pH en donde es activa una enzima de fosfatasa (una o mas fosfatasas objetivo). El pH está de preferencia en el rango de pH 5,5-pH 8,5, mas preferido en el rango de pH6,7-pH8,0.

Los ejemplos que siguen, figuras y listado de secuencias se proporcionan para ayudar al entendimiento del presente invento, cuyo alcance efectivo se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

5
Figura 1 Inhibición de una proteína fosfatasa de fosfotirosina-específica con ortovanadato en presencia o ausencia de un poliol. Para el principio del experimento se hace referencia al Ejemplo 1. La ordenada indica actividad de fosfatasa residual. Las barras indican los resultados obtenidos para las composiciones siguientes: (1) sin inhibidor adicionado (control, actividad residual 100%); (2) ortovanadato 1 mM; (3) ortovanadato 2 mM; (4) ortovanadato (1 mM), manitol 27 mM; (5) ortovanadato 1 mM, glicerol 54 mM.

10
Figura 2 Inhibición de una proteína fosfatasa de fosfotirosina-específica con ortovanadato en presencia o ausencia de un poliol y en presencia de EDTA y DTT. Para el principio del experimento se hace referencia al ejemplo 2. La ordenada indica actividad de fosfatasa residual. Las barras indican los resultados obtenidos para las composiciones siguientes: (1) sin adición de inhibidor (control, actividad residual 100%); (2) ortovanadato 1 mM; (3) ortovanadato 2 mM; (4) ortovanadato 1 mM, manitol 27 mM; (5) ortovanadato 1 mM, glicerol 54 mM.

15
Figura 3 Inhibición de una proteína fosfatasa de fosfotirosina-específica con ortovanadato en presencia o ausencia de un poliol y en presencia de EDTA, con o sin DTT. Para el principio del experimento se hace referencia al ejemplo 3. La ordenada indica actividad de fosfatasa residual. Las barras indican los resultados obtenidos para las composiciones siguientes: ortovanadato(1) mM, tampón Hepes con EDTA; (2) ortovanadato, 1 mM, tampón con EDTA, en presencia de 27 mM de manitol; (4) ortovanadato 1 mM, tampón Hepes con EDTA y DTT, en presencia de manitol 27 mM; (5) ortovanadato 1 mM, tampón Hepes con EDTA, en presencia de glicerol 54 mM; (6) ortovanadato 1 mM, tampón Hepes con EDTA y DTT, en presencia de glicerol 54 mM.

20
Figura 4 Inhibición de actividad de fosfatasa en lisado celular de insecto con ortovanadato en presencia o ausencia de manitol. Para el principio del experimento se hace referencia al ejemplo 5. La ordenada indica la actividad de fosfatasa residual. Las barras indican los resultados obtenidos para las composiciones siguientes: (1) sin inhibidor añadido (control, actividad residual al 100%); (2) ortovanadato 1 mM; (3) ortovanadato 1 mM, manitol 27 mM.

25
Figura 5 Inhibición de actividad de fosfatasa en lisado celular COS7 con ortovanadato en presencia o ausencia de manitol. Para el principio del experimento se hace referencia al ejemplo 6. La ordenada indica la actividad de fosfatasa residual. Las barras indican los resultados obtenidos para las composiciones siguientes: (1) sin inhibidor añadido (control, actividad residual al 100%); (2) ortovanadato 1 mM; (3) ortovanadato 1 mM, manitol 27 mM.

Ejemplo 1

30
Inhibición de una proteína fosfatasa de fosfotirosina específica

35
Se diluye una solución madre de una proteína fosfatasa de fosfotirosina específica producida de forma recombinante (célula T humana; Calbiochem, Nº, Cat 539732) se diluye en la relación 1:200 en un tampón conteniendo 0,1 mM de CaCl_2 , Tris 50 mM pH 7,0. En tubos de reacción separados se preparan las mezclas siguientes (a-e): 36 μl de solución enzimática diluida y 4 μl de (a) agua (como una referencia para el 100%) una solución de (b) 10 mM de ortovanadato; (c) 20 mM ortovanadato; (d) 10 mM de ortovanadato, 270 mM de manitol; (e) 10 mM de ortovanadato, 540 mM de glicerol. Cada mezcla se incuba a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos. A continuación se transfiere una parte alícuota de 10 μl de cada mezcla a la placa de micropocillos. Se adiciona a cada pocillo 5 μl de una solución de un péptido de ensayo conteniendo un residuo de fosfotirosina (teniendo el péptido una secuencia R-R-L-I-E-D-A-E-pY-A-A-R-G; 1 mM en agua) y 10 μl de un tampón conteniendo 0,1 mM de CaCl_2 , 50 mM de Tris pH 7,0 y se incuba durante 30 minutos a 37°C. El fosfato libre resultante de la hidrólisis enzimática del enlace de fosfoéster se somete a una reacción de detección siguiendo la adición de 100 μl de una solución de HCl 1M conteniendo adicionalmente 0,034% [p/v] de verde de malaquita, 10 mM de molibdato sódico y 3,4% [v/v] de etanol. La reacción de detección se lleva a cabo durante 10 minutos a TA mientras se agita constantemente la placa de micropocillos. Las concentraciones relativas de fosfato se detectan siguiendo la determinación de la extinción (620 nm) de cada pocillo de reacción.

Ejemplo 2

40
Inhibición de proteína fosfatasa de fosfotirosina específica en presencia de EDTA y DTT

45
Se diluye una solución madre de una proteína fosfatasa de fosfotirosina específica (célula T humana; Calbiochem, nº Cat 539732) en la relación de 1:200 en un tampón conteniendo 25 mM DE HEPES, 50 MM DE NaCl, 2,5 mM de EDTA, 5 mM de DTT, pH 7,2. En tubos de reacción separados se prepararon las mezclas (a-e) siguientes: 36 μl de

5 solución de enzima diluida y 4 μ l de (a) agua (como una referencia para 100%) una solución de (b) 10 mM de ortovanadato, 540 mM de glicerol. Se incuba cada mezcla a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos. A continuación se transfiere una alícuota de 10 μ l de cada mezcla a una placa de micropocillos. Se adiciona a cada pocillo 5 μ l de una solución de un péptido de ensayo conteniendo un residuo de fosfotirosina (teniendo el péptido la secuencia R-R-L-I-E-D-A-E-pY-A-A-R-G; 1 mM en agua) y 10 μ l de un tampón conteniendo 25 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, 2,5 mM de EDTA, 5 mM de DTT, pH 7,2 y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Fosfato libre resultante de la hidrólisis enzimática del enlace fosfoéster se somete a una reacción de detección siguiendo la adición de 100 μ l de una solución de HCl 1M conteniendo adicionalmente 0,034% [p/v] de verde de malaquita, 10 mM de molibdato sódico, y 3,4 % [v/v] de etanol. La reacción de detección se lleva a cabo durante 10 minutos a TA mientras se agita constantemente la placa de micropocillos. Las concentraciones relativas de fosfato se detectan siguiendo la determinación de extinción (620 nm) de cada pocillo de reacción.

Ejemplo 3

15 Inhibición de una proteína fosfatasa de fosfotirosina específica en presencia de EDTA, por lo que DTT está presente adicionalmente o ausente

20 Se diluye una solución madre de una proteína fosfatasa de fosfotirosina específica (célula T humana; Calbiochem, nº Cat 539732) en la relación de 1:200 en un tampón conteniendo 25 mM de Hepes, 50 MM DE NaCl, 2,5 mM de EDTA, 5 mM de DTT, pH 7,2. (solución de enzima (i) o en un tampón con la misma composición pero sin DTT (solución de enzima (ii). En tubos de reacción separados se preparan las mezclas (a-f) siguientes: 36 μ l de solución de enzima diluida (i) o (ii) y 4 μ l de una solución de (a, d) 10 mM de ortovanadato; (b, e) 10 mM de ortovanadato, 270 mM de manitol; (c,f) 10 mM de ortovanadato, 540 mM de glicerol. Se incuba cada mezcla a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos. A continuación se transfiere una alícuota de 10 μ l de cada mezcla a una placa de micropocillos. Se adiciona a cada pocillo 5 μ l de una solución de un péptido de ensayo conteniendo un residuo de fosfotirosina (teniendo el péptido la secuencia R-R-L-I-E-D-A-E-pY-A-A-R-G; 1 mM en agua) y 10 μ l de un tampón conteniendo 25 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, 2,5 mM de EDTA, 5 mM de DTT, pH 7,2 (reacciones con solución de enzima (i) o 10 μ l de un tampón conteniendo 25 mM de Hepes, 50 mM de NaCl, 2,5 mM de EDTA, pH 7,2 (reacciones con solución de enzima (ii) se adicionan a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Fosfato libre resultante de la hidrólisis enzimática del enlace fosfoéster se somete a una reacción de detección siguiendo la adición de 100 μ l de una solución de HCl 1M conteniendo adicionalmente 0,034% [p/v] de verde de malaquita, 10 mM de molibdato sódico, y 3,4 % [v/v] de etanol. La reacción de detección se lleva a cabo durante 10 minutos a TA mientras se agita constantemente la placa de micropocillos. Las concentraciones relativas de fosfato se detectan siguiendo la determinación de extinción (620 nm) de cada pocillo de reacción.

Ejemplo 4

Inhibición de una proteína fosfatasa de fosfotirosina específica con ortovanadato

40 Tabla 1

45 Actividad de fosfatasa residual en presencia de composiciones que contienen ortovanadato y otros compuestos en tampones acuosos como se indica. Los datos expuestos se refieren a las representaciones gráficas dadas en las figuras 1-3.

	Tampón	Actividad
Figura 1		
1) Sin inhibidor	50 mM Tris; 0,1 mM CaCl ₂ pH 7,0	100%
2) Na ₃ VO ₄ 1 mM	50 mM Tris; 0,1 mM CaCl ₂ pH 7,0	16,6%
3) Na ₃ VO ₄ 2 mM	50 mM Tris; 0,1 mM CaCl ₂ pH 7,0	15,7%
4) Na ₃ VO ₄ 1 mM + manitol 27 mM	50 mM Tris; 0,1 mM CaCl ₂ pH 7,0	8,5%
5) Na ₃ VO ₄ 1 mM + glicerol 54 mM	50 mM Tris; 0,1 mM CaCl ₂ pH 7,0	9,7%
Figura 2:		
1) Sin inhibidor	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5mM DTT pH 7,2	100%
2) Na ₃ VO ₄ 1 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5mM DTT pH 7,2	87,7%
3) Na ₃ VO ₄ 2 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5mM DTT pH 7,2	58,0%
4) Na ₃ VO ₄ 1 mM + manitol 27 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5mM DTT pH 7,2	12,4%
5) Na ₃ VO ₄ 1 mM + manitol 54 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5mM DTT pH 7,2	9,3%
Figura 3		
1) Na ₃ VO ₄ 1 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; pH 7,2	29,5%
2) Na ₃ VO ₄ 1 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTTpH 7,2	46,3%
3) Na ₃ VO ₄ 1 mM + manitol 27 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; pH 7,2	14,1%
4) Na ₃ VO ₄ 1 mM + manitol 27 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT pH 7,2	5,8%
5) Na ₃ VO ₄ 1 mM + glicerol 54 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; pH 7,2	14,9%
5) Na ₃ VO ₄ 1 mM + glicerol 54 mM	25mM Hepes; 50 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 5 mM DTT pH 7,2	7,3%

Ejemplo 5

Inhibición de fosfatasa en lisado de celular de insecto

5 Se recogieron 270 mg de células de insecto (SF9), se lavaron 3 veces con 50 mM de Hepes, 50 mM de NaCl pH 7,0 y lisaron utilizando 2,5 ml de M-Per (Pierce) durante 10 minutos. después de centrifugación se recogió el lisado como el sobrenadante.

10 Prueba para actividad de fosfotirosina: a 45 µl del lisado se adicionaron 5 µl de agua u ortovanadato (10 mM) u ortovanadato/mannitol (10 mM/270 mM) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

15 A continuación se transfirió una parte alícuota de 10 µl de cada mezcla a un pocillo de una placa de micropocillos. Se adicionaron 5 µl de una solución de un péptido de prueba (R-R-L.I.E-D-A-E-pY-A-A-R-G; 1 mM en agua) y 10 µl de un tampón conteniendo 0,1 mM de CaCl₂, 50 mM de Tris pH 7,0 a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego se detecto el fosfato libre resultante de la hidrólisis enzimática vía la adición de 100 µl de una solución de HCl 1M conteniendo adicionalmente 0,034% [p/v] de verde de malaquita, 10 mM de molibdato sódico y 3,4% [v/v] de etanol. La detección se llevó a cabo durante 10 minutos a temperatura ambiente mientras se agitaba constantemente la placa de micropocillos. Las concentraciones relativas del fosfato libre se detectaron siguiendo la

20 determinación de la extinción (620 nm) de cada pocillo de reacción.

Tabla 2

25 Actividad de fosfato residual en presencia de composiciones que contienen ortovanadato y otros compuestos en tampones acuosos como se indica. Los datos tabulados se refieren a las representaciones gráficas expuestas en la figura 4.

	actividad de fosfatasa
sin inhibidor (control de agua)	100%
1 mM de ortovanadato	14%
1 mM de ortovanadato/27 mM de manitol	2%

Ejemplo 6

Inhibición de fosfatasa en lisado celular COS7

5 Se recogieron células COS7, se lavaron 3 veces 50 mM de Hepes 50 mM de NaCl pH 7,0 y se lisó utilizando 5 ml de M-Per (Pierce) durante 10 minutos. Después de centrifugación se recogió el lisado como el sobrenadante.

10 Prueba para actividad de fosfotirosina: a 45 µl del lisado diluido (1+4 con M-Per (Pierce) se adicionaron 5 µl de agua u ortovanadato (10 mM) u ortovanadato/mannitol (10 mM/270 mM) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

15 A continuación se transfirió una parte alícuota de 10 µl de cada mezcla a una placa de micropocillos. Se adicionó a cada pocillo 10 µl de un tampón conteniendo 0,1 mM de CaCl₂, 50 mM de Tris pH 7,0 y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Luego se detectó el fosfato libre resultante de la hidrólisis enzimática vía la adición de 100 µl de una solución de HCl 1M conteniendo adicionalmente 0,034% [v/v] de verde de malaquita, 10 mM de molibdato sódico y 3,4 [v/v] de etanol. La detección se llevó a cabo durante 10 minutos TA mientras se agitaba constantemente la placa de micropocillos. Las concentraciones relativas de fosfato libre se detectaron siguiendo la determinación de la extinción (620 nm) de cada pocillo de reacción.

20 Tabla 3

Actividad de fosfatasa residual en presencia de composiciones que contienen ortovanadato y otros compuestos en tampones acuosos como se indica. Los datos tabulados se refieren a las representaciones gráficas dadas en la figura 5.

25

	actividad de fosfatasa
sin inhibidor (control de agua)	100%
1 mM de ortovanadato	52%
1 mM de ortovanadato/27 mM de manitol	36%

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
5
<120> Mejora de inhibidor de fosfatasa conteniendo vanadio
<130> 24107
<150> EP 07001593.8
<151> 2007-01-25
10 <160> 1
<170> Versión PatentIn 3.2
<210> 1
<211> 14
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> substrato de fosfatasa proteínica

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> en el substrato peptídico se fosforila el residuo de Tirosina
<400> 1
25 Arg Arg Leu Glu Asp Ala Glu Pro Tyr Ala Ala Arg Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición líquida que comprende un disolvente acuoso, una enzima con actividad de fosfatasa, ortovanadato, manitol y ditiotreititol, caracterizada porque la concentración de manitol se encuentra entre 1 mM y 100 mM, y la relación molar de manitol y ortovanadato es igual o superior a 1:1.
2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la concentración de ortovanadato se encuentra entre 0,1 mM y 10 mM.
- 10 3. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la concentración de ortovanadato se encuentra entre 0,5 mM y 5 mM.
4. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la composición comprende adicionalmente un agente quelante para iones de metal divalentes o trivalentes cargados positivamente.
- 15 5. Uso in vitro de un alcohol de azúcar soluble en agua con 4-100 átomos elegidos del grupo constituido por treitol, eritritol, ribitol, arabitol, xilitol, lixitol, deoxirribitol, deoxiarabitol, alitol, altritol, manitol, glucitol, gulitol, iditol, galactitol, talitol, deoxiglucitol, deoximanitol, N-acetil glucitol-amina-2, maltitol, y lactitol para mejorar el efecto inhibitorio de un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y sus mezclas en una enzima con actividad de fosfatasa capaz de hidrolizar el enlace de fosfoéster de un radical de fosfotirosina en el péptido de la SEQ ID NO:1 disuelto en una solución acuosa tamponada con un pH neutro y conteniendo iones de Ca^{2+} a una concentración de entre 0,7 mM y 1,2 mM.
- 20 6. El uso de conformidad con las reivindicación 5, caracterizado porque la actividad de la fosfatasa se reduce hasta un valor de entre 1,5% y 40%.
- 25 7. Un método in vitro para mejorar el efecto inhibitorio de un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y sus mezclas sobre una enzima con actividad de fosfatasa capaz de hidrolizar el enlace fosfoéster de un residuo en el péptido de la SEQ ID NO:1 disuelto en una solución acuosa tamponada con un pH neutro y conteniendo iones de Ca^{2+} a una concentración de entre 0,7 mM y 1,2 mM, que comprende las etapas de
- 30 (a) disolver en un disolvente acuoso una composición que comprende (i) el compuesto iónico, y (ii) un alcohol de azúcar soluble en agua con 4-100 átomos de carbono elegido del grupo constituido por treitol, eritritol, ribitol, arabitol, xilitol, lixitol, deoxirribitol, deoxiarabitol, alitol, altritol, manitol, glucitol, gulitol, iditol, galactitol, talitol, deoxiglucitol, deoximanitol, N-acetil glucitol-amina-2, maltitol y lactitol, con lo que la relación molar del alcohol de azúcar y el compuesto iónico es igual a o superior a 1:1, y
- 35 (b) poner en contacto la enzima con actividad de fosfatasa con la solución de la etapa (a).
8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la concentración del alcohol de azúcar en la solución se encuentra entre 1 mM y 100 mM.
- 45 9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, caracterizado porque la concentración del ortovanadato en la solución se encuentra entre 0,1 mM y 10 mM.
10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 y 9, caracterizado porque el compuesto iónico y el alcohol de azúcar se adicionan como materia seca a una muestra acuosa que contiene la enzima con actividad de fosfatasa.
- 50 11. Un juego de partes que comprenden material de envasado y una composición que comprende (i) un compuesto iónico elegido del grupo constituido por vanadato (V), vanadato oligomérico (V) y sus mezclas, (ii) un alcohol de azúcar soluble en agua con 4-100 átomos de carbono, con lo que la relación molar del alcohol de azúcar y el compuesto iónico es igual o superior a 1:1.
- 55 12. El juego de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la composición comprende adicionalmente un agente reductor y/o un agente quelante para iones de metal divalentes o trivalente cargados positivamente.
- 60 13. El juego de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado porque la composición se proporciona como materia seca en forma de un comprimido.

Fig. 1

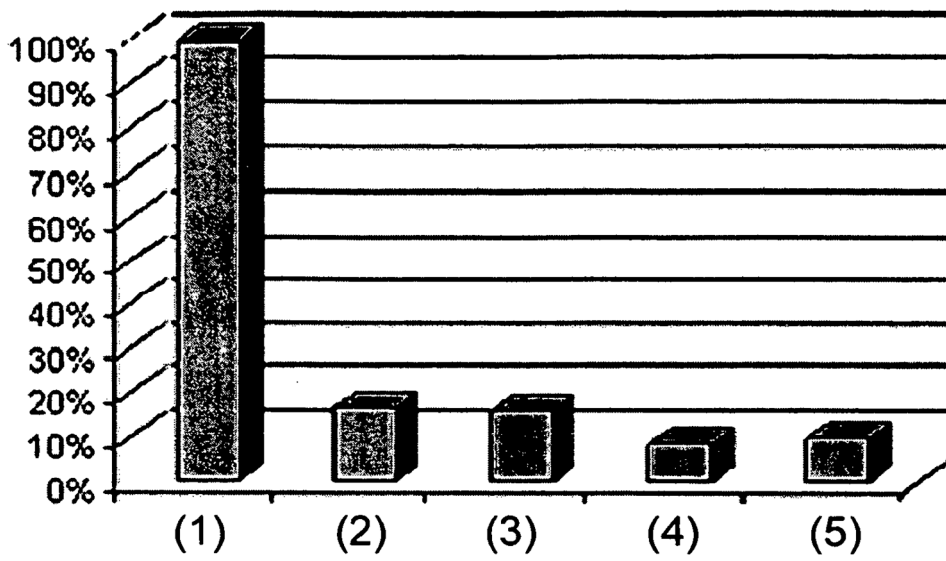


Fig. 2

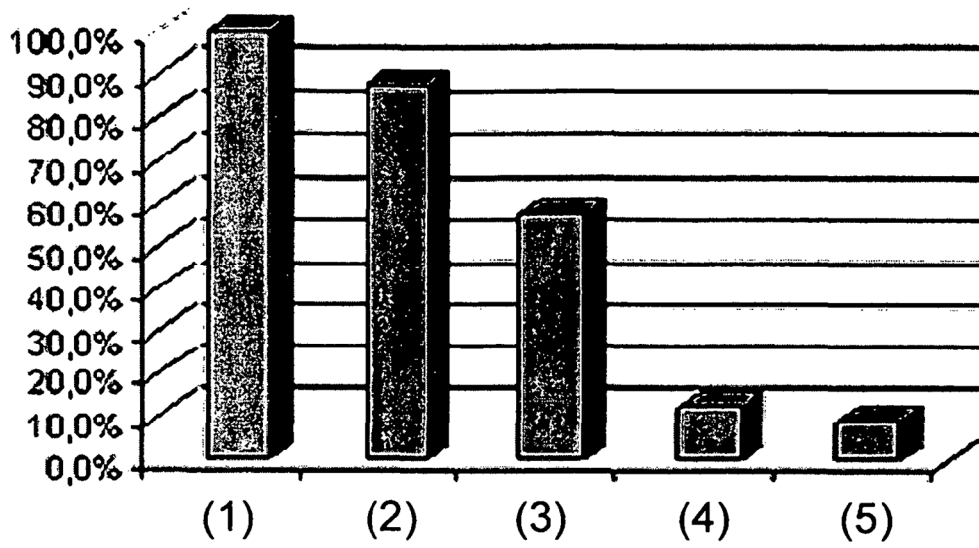


Fig. 3

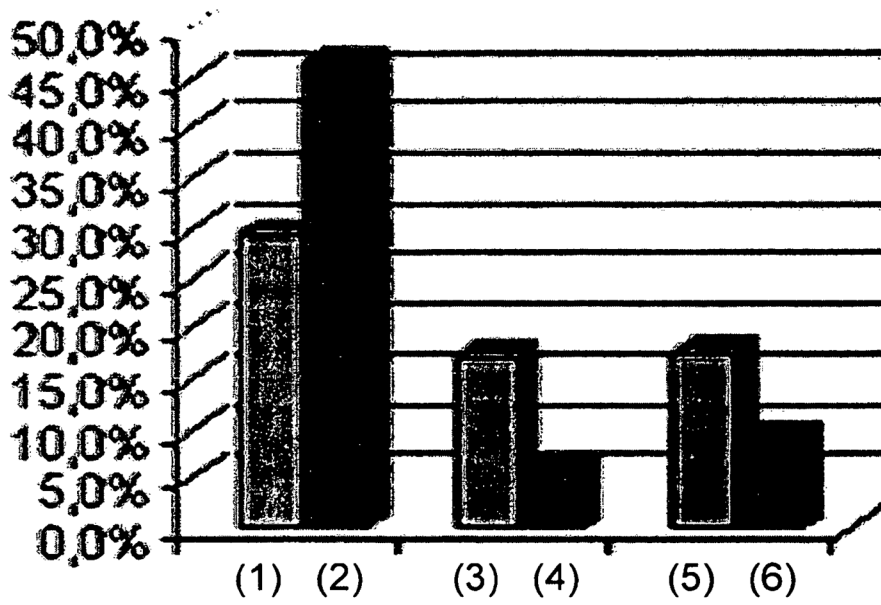


Fig. 4

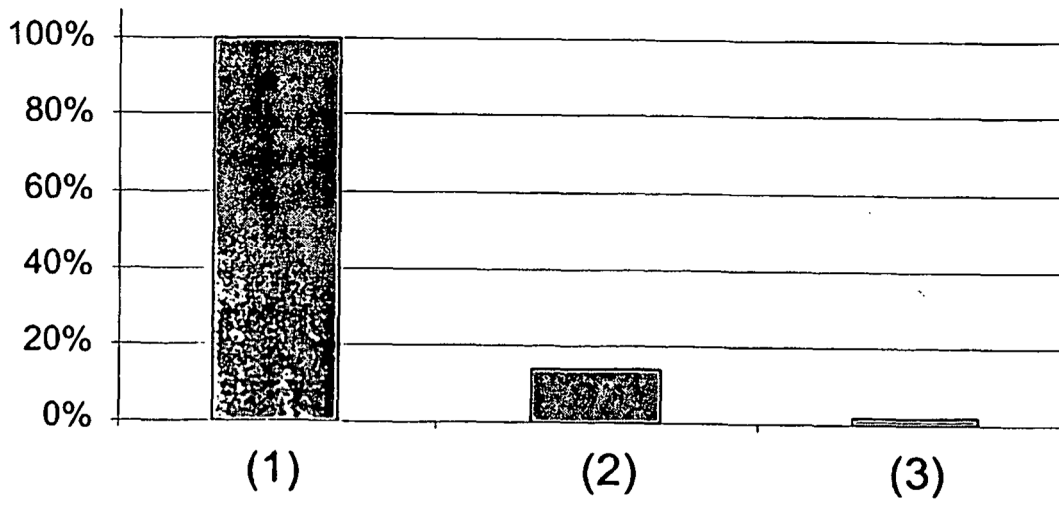


Fig. 5

