



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 331**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 24/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03812412 .9**

96 Fecha de presentación : **05.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1511852**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

54 Título: **Uso de RMN de flúor para el rastreo de alto rendimiento.**

30 Prioridad: **05.06.2002 US 386897 P**
17.06.2002 US 389252 P
26.07.2002 US 398875 P
14.03.2003 US 454766 P
14.03.2003 US 454765 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2010

73 Titular/es: **NERVIANO MEDICAL SCIENCES S.R.L.**
Viale Pasteur, 10
20014 Nerviano, MI, IT

72 Inventor/es: **Dalvit, Claudio;**
Stockman, Brian, J.;
Flocco, Maria y
Veronesi, Marina

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 345 331 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

Uso de RMN de flúor para el rastreo de alto rendimiento.

5 Antecedentes de la invención

Muchos fármacos actualmente en el mercado se desarrollaron a partir de artículos principales identificados a partir del rastreo de alto rendimiento (HTS). Las dianas de interés terapéutico usadas en HTS a menudo son proteínas recombinante producidas a partir de genes clonados que pueden expresarse de diferentes modos. Típicamente se rastrea una gran colección de compuestos frente a estas proteínas para la identificación de inhibidores.

Durante los últimos diez años, ha aumentado exponencialmente el tamaño de la colección de compuestos de propietarios como resultado de la aplicación sistemática de química combinatoria a diferentes proyectos. La química combinatoria hoy en día genera grandes bibliotecas de compuestos que complementan otras bibliotecas de compuestos disponibles en la química de medicina tradicional y fuentes naturales. El desarrollo y aplicación de la robótica y la automatización han hecho factible ensayar grandes cantidades de compuestos en un corto periodo de tiempo. Se usan varios sistemas de detección nuevos para la identificación de moléculas principales potenciales.

Recientemente, ha surgido la resonancia magnética nuclear (RMN) como un procedimiento potente para la detección de pequeñas moléculas que interactúan con dianas de interés farmacéutico. Aunque la RMN no es una técnica sensible, tiene la ventaja de que está menos sometida a los artefactos observados con otros sistemas de detección. Los recientes avances en la tecnología criogénica de sondas de RMN han reducido el periodo de tiempo o la cantidad de proteína necesaria para el rastreo. Los procedimientos de RMN se han usado para rastrear una gran colección de compuestos frente a proteínas isotópicamente marcadas. Los cambios en el desplazamiento químicos de los picos de cruce en un espectro de HSQC de ^{15}N - ^1H de la proteína diana se controlan en presencia de una mezcla de compuestos. La deconvolución de la mezcla entonces provoca la identificación de la molécula que interactúa con la proteína (es decir, el compuesto responsable de los cambios de desplazamiento químico). Cuando se conoce la estructura tridimensional de la proteína y se han obtenido las asignaciones de RMN específicas de secuencia de las resonancias de la estructura proteica, el procedimiento proporciona información estructural importante del sitio de unión de ligando y el modo de unión del ligando.

Otro procedimiento para realizar rastreo de RMN se basa en la detección de las resonancias del ligando. Se han propuesto varios parámetros de RMN en la bibliografía como herramienta para la identificación de ligandos. Estas metodologías permiten la rápida deconvolución de las mezclas rastreadas y son particularmente adecuadas para la identificación de ligandos de afinidad media a baja.

Sin embargo, estas técnicas tienen algunos inconvenientes. Primero, no hay información estructural directamente disponible con respecto al sitio de unión. Segundo, los ligandos y moléculas de elevada afinidad que se unen covalentemente al receptor escapan de la detección a causa del gran exceso de compuesto de ensayo sobre la proteína típicamente usada en estos experimentos. Es decir, no se detectarán compuestos que interactúan de forma estrecha con la proteína o compuestos que tienen una cinética lenta porque el tiempo de residencia de estos compuestos dentro de la proteína es mayor que la ventana del tiempo de mezcla (por ejemplo, 1 a 2 segundos) empleada en los experimentos de RMN. Tercero, los compuestos con malas solubilidades que son ligandos potenciales son difíciles de detectar ya que el procedimiento requiere la observación de las señales del ligando.

Por tanto, los que se necesita son procedimientos de RMN adicionales que puedan usarse para detectar ligandos para moléculas diana, tales como proteínas, sin los inconvenientes asociados con experimentos típicos de rastreo de observación de ligando.

El artículo Dalvit C. y col., "NMR-Based Screening with Competition Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy Experiments: Detection of High-Affinity Ligands", J. Med. Chem. 2002, 45, 2610-2614 describe un procedimiento para identificar un ligando para una molécula diana, comprendiendo el procedimiento: proporcionar un compuesto de referencia que interacciona con la molécula diana; recoger un espectro de resonancia magnética nuclear 1D del compuesto de referencia en presencia de la molécula diana; proporcionar una muestra de ensayo que comprende al menos un compuesto de ensayo; recoger un espectro de resonancia magnética nuclear 1D del compuesto de referencia en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana; comparar el espectro del compuesto de referencia en presencia de la molécula diana con el espectro del compuesto de referencia en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana para determinar un cambio en una o más de las resonancias del compuesto de referencia; e identificar al menos un compuesto de ensayo que interactúe con la molécula diana, donde el compuesto de ensayo desplaza al compuesto de referencia.

El artículo Jenkins B.G., "Detection of Site-Specific Binding and Co-Binding of Ligands to Macromolecules using ^{19}F NMR", Life Sciences 1991, 48, 1227-1240 describe ventajas de usar espectroscopía de RMN de ^{19}F para observar interacciones de macromoléculas-ligandos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al diseño racional de fármacos. Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento de resonancia magnética nuclear (RMN) para rastrear compuestos que interaccionen con una molécula diana (por ejemplo, típicamente una proteína). El procedimiento implica el uso de RMN de ^{19}F , particularmente experimentos de unión competitiva de RMN de ^{19}F , para detectar la interacción de unión.

Los experimentos de unión competitiva implican el desplazamiento de un compuesto de referencia en presencia de una molécula competitiva. Preferiblemente, el compuesto de referencia se une a la molécula diana con una afinidad de unión en el intervalo micromolar. Preferiblemente, el compuesto de ensayo interacciona con la molécula diana con una afinidad de unión más fuerte que 1 micromolar (por ejemplo, en el intervalo nanomolar), aunque también puede evaluarse la unión de compuestos con afinidades de unión más débiles de (es decir, de más de) 1 micromolar usando los procedimientos de la presente invención.

La presente metodología, particularmente cuando implica experimentos de unión competitiva, puede usarse para realizar un rastreo de alto rendimiento (HTS) eficaz basada en experimentos de unión competitiva establecidos apropiadamente sin los inconvenientes asociados con experimentos típicos de rastreo de observación de ligando. Además, los procedimientos proporcionan una estimación de la K_D del ligando identificado usando una medición de un único punto. Con este enfoque, es posible rastrear miles de compuestos en un corto periodo de tiempo frente a una proteína o fragmentos de ADN y ARN, por ejemplo.

La presente invención también podría encontrar aplicaciones útiles para el rastreo rápido de mezclas químicas (es decir, mezclas de dos o más compuestos de ensayo) tales como extractos vegetales y fúngicos. Las técnicas de rastreo rápido típicamente implican proporcionar una pluralidad de muestras de ensayo, comprendiendo cada muestra de ensayo una mezcla de dos o más compuestos de ensayo.

Los procedimientos de la presente invención implican identificar un ligando para una molécula diana usando las etapas expuestas en la reivindicación 1.

Preferiblemente, los procedimientos de la presente invención incluyen una etapa de identificar el compuesto de referencia que comprende: recoger un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY de un compuesto de referencia potencial en ausencia de la molécula diana; recoger un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY del compuesto de referencia potencial en presencia de la molécula diana; y comparar los espectros WaterLOGSY para identificar si el compuesto de referencia potencial interacciona con la molécula diana.

Para ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el compuesto de referencia se proporciona en combinación con una señal ERETIC con anchura de línea, amplitud, y frecuencia definidos. Para estos procedimientos, la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F con la señal ERETIC en presencia de la molécula diana; y la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F con la señal ERETIC en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana.

Para ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el compuesto de referencia marcado con ^{19}F se proporciona en combinación con un compuesto no de interacción marcado con ^{19}F . Para estos procedimientos, la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F y el compuesto no de interacción marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana; y la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D y el compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F y el compuesto no de interacción marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diferencia en la anchura de línea debido a la interacción de CSA de la señal de ^{19}F de una molécula pequeña libre en solución y cuando está unida a una gran molécula como función de la frecuencia de Larmor de ^{19}F . Esta estimulación se realizó usando el último término de la ecuación 1 en la suposición de un tensor de CSA axialmente simétrico con una CSA de ^{19}F de 100 ppm y un tiempo de correlación τ_c de 200 ps para la molécula pequeña cuando está libre en solución. Se consideraron diferentes tiempos de correlación para la macromolécula correspondientes a diferentes tamaños de la macromolécula (valores indicados con las curvas). Las líneas verticales discontinuas indican algunos de los espectrómetros disponibles en el mercado. El valor correspondiente a la frecuencia de Larmor de ^1H de estos espectrómetros se indica con las líneas verticales.

Figura 2. Rastreo de RMN y deconvolución realizadas con 50 μM del ligando de afinidad débil Compuesto A ($K_D = 10 \mu\text{M}$) de la quinasa activada p21. La molécula de referencia contiene un grupo CF_3 unido a un anillo aromático de seis miembros. Los desplazamientos químicos están referenciados a TFA. Los dos espectros se registraron sin (izquierda) y con un esquema espín-eco con $\tau = 0,1 \text{ s}$ (derecha). Los espectros se obtuvieron en presencia de 1,5 μM de

la proteína para la molécula informadora sola (a), en presencia de una mezcla de siete compuestos 20 μM que contiene las moléculas SPECS AB-323/25048456 (suministrada por SPECS, Rijswijk, Holanda) 2-quinoxalinacarboxilato de etilo, isoquinolina-3-carboxilato de metilo, 7-fenil-4-pteridinol, 2-amino-6-metilquinazolin-4-ol, 5-metilbencimidazol y Compuesto B (b), en presencia de la mezcla química sin Compuesto B (c), en presencia de solamente Compuesto B (d). El espectro del compuesto de referencia en PBS en ausencia de la proteína se muestra en (e). Se obtuvo un total de 128 exploraciones con un tiempo de repetición de 3,1 s para cada experimento.

Figura 3. Espectros de ^{19}F unidimensionales registrados en presencia del ligando de afinidad débil Compuesto A para la quinasa activada p21 y la molécula no de interacción ácido trifluoroacético (TFA). Los desplazamientos químicos están referenciados a TFA. Se obtuvo un total de 128 exploraciones con un tiempo de repetición de 3,1 s para cada experimento. La concentración de Compuesto A y TFA eran 50 y 15 μM , respectivamente. Los espectros se registraron en ausencia (a) y presencia de 1,5 μM de la proteína (b). El espectro en (c) corresponde a la diferencia de los dos espectros en (a) y (b). La única señal presente en el espectro de diferencia está originada por la molécula informadora.

Figura 4. HTS y deconvolución realizadas con un espectros de ^{19}F unidimensionales en presencia del ligando de afinidad débil Compuesto A para la quinasa activada p21 y la molécula no de interacción ácido trifluoroacético (TFA). Los desplazamientos químicos están referenciados a TFA. (a-d) Rastreo de RMN y deconvolución realizadas con 50 μM de Compuesto A y 15 μM de TFA. (a) Espectro registrado en ausencia de la proteína, (b-d) espectros registrados en presencia de 1,5 μM de la proteína, (b) espectro registrado en ausencia de la mezcla, (c) espectro registrado en presencia de una mezcla de seis compuestos 20 μM que contiene las moléculas SPECS AB-323/25048456, 2-quinoxalinacarboxilato de etilo, isoquinolina-3-carboxilato de metilo, 7-fenil-4-pteridinol, 2-amino-6-metilquinazolin-4-ol, 5-metilbencimidazol, (d) espectro registrado en presencia de la misma mezcla química con la adición de Compuesto B 20 μM . La presencia de la molécula competidora Compuesto B provoca un desplazamiento casi completo del compuesto de referencia de la proteína (d) y el espectro es similar al espectro para las dos moléculas en PBS (a).

Figura 5. Porcentaje de moléculas que contienen un átomo de F dentro de la biblioteca MDDR. La búsqueda se realizó del año 1981 al año 2000 en intervalo de tiempo de cinco años. El porcentaje para cada intervalo está indicado por encima de las barras.

Figura 6. Espectros espín-eco de ^{19}F registrados como una función de la concentración de HSA. La resonancia de CF_3 de la molécula de control (2) está a +15,46 ppm y la resonancia de CF_3 de la molécula informadora (1) está a +14,62 ppm. Los espectros se obtuvieron con un periodo total de espín-eco de 320 ms con un intervalo entre los pulsos a 180° (2τ) de 40 ms. Se obtuvo un total de 96 exploraciones con un tiempo de repetición de 3,5 s y una anchura espectral de 25 ppm para cada espectro. Los datos se multiplicaron con una función exponencial de 1 Hz antes de la transformación de Fourier. La concentración de las dos moléculas era de 25 μM mientras que la concentración para HSA era de la parte superior a la inferior, 0, 300, 500, 700 y 900 nM. La proporción de la intensidad de señal $I(1)/I(2)$ es de la parte superior a la inferior, 0,86, 0,66, 0,38, 0,21 y 0,07.

Figura 7. Espectros espín-eco de ^{19}F registrados como una función de la concentración de HSA. La resonancia de CF de la molécula de referencia (3) está a -64,06 (espectros inferiores) y la resonancia de CF_3 de la molécula de control (2) está a +15,46 ppm (espectros superiores). Los espectros se obtuvieron con un periodo total de espín-eco de 80 ms con un intervalo entre los pulsos a 180° (2τ) de 40 ms. Se registró un total de 96 exploraciones para los espectros inferiores y 64 exploraciones para los espectros superiores con un tiempo de repetición de 3,5 s y una anchura espectral de 25 ppm. Los datos se multiplicaron con una función exponencial de 1 Hz antes de la transformación de Fourier. La concentración de (3) y (2) era de 50 y 25 μM , respectivamente, mientras que la concentración para HSA era de izquierda a derecha, 0, 150, 300, 450, 600 nM. La proporción de la intensidad de señal $I(3)/I(2)$ y la intensidad de escala representada es de izquierda a derecha, 0,94, 0,69, 0,53, 0,36 y 0,25.

Figura 8. Representación de la proporción de la intensidad de señal (eje x) de las dos señales de ^{19}F de la figura 7 como una función de la fracción de molécula de referencia unida ($[\text{EL}]/[\text{L}_{\text{TOT}}]$) (eje y). El último punto en la derecha corresponde al valor en ausencia de la proteína. Las proporciones ($[\text{EL}]/[\text{L}_{\text{TOT}}]$) se calcularon como se ha descrito previamente usando los límites del valor K_D derivado de ITC de $41 \pm 3,3 \mu\text{M}$ para (3). Los valores indicados por círculos se calcularon con un K_D de 44,3 μM , los valores indicados por cuadrados se calcularon con un K_D de 37,7 μM . Las curvas representan los mejores ajustes de los puntos experimentales.

Figura 9. Rastreo de RMN de ^{19}F realizada con la molécula de control (2) (parte superior) y la molécula informadora (3) (parte inferior). Los espectros se registraron con un periodo total de espín-eco de 160 ms con un intervalo entre los pulsos a 180° (2τ) de 40 ms. Se registró un total de 96 exploraciones con un tiempo de repetición de 3,5 s y una anchura espectral de 25 ppm. Los datos se multiplicaron con una función exponencial de 1 Hz antes de la transformación de Fourier. La concentración de (3) y (2) era 50 y 25 μM , respectivamente. Los espectros a la izquierda se registraron en ausencia de proteína mientras que todos los demás espectros se registraron en presencia de HSA 600 nM. Los últimos se registraron en ausencia de una mezcla química (2° desde la izquierda), en presencia de 5- CH_3 D,L Trp 50 μM y sacarosa (3° desde la izquierda) y en presencia de 5- CH_3 D,L Trp 50 μM , sacarosa y 25 μM de (4) (derecha).

Figura 10. Límites de detección de rastreo de RMN de ^{19}F . Experimentos realizados con la molécula de control (2) (parte superior) y la molécula informadora (3). Los espectros se registraron con un periodo total de espín-eco de

320 ms (parte superior) y 1,2 s (parte inferior) con un intervalo entre los pulsos a 180° (2τ) de 40 ms. Se registró un total de 64 (parte superior) y 128 (parte inferior) exploraciones con un tiempo de repetición de 3,5 s y una anchura espectral de 25 ppm. Los datos se multiplicaron con una función exponencial de 1 Hz antes de la transformación de Fourier. La concentración de (3) y (2) era 50 y 25 μM , respectivamente. Los espectros en la izquierda se registraron en ausencia de proteína mientras que todos los demás espectros se registraron en presencia de solamente HSA 150 nM. Los últimos se registraron en ausencia de la mezcla química (2° desde la izquierda), y en presencia de una mezcla que contenía 25 μM de (4) (derecha).

Figura 11. Rastreo de RMN de ^{19}F realizada en presencia de tampones no deuterados y detergentes. (Parte superior) espectro de protones de una solución 600 nM de HSA en HEPES 100 mM y glicerol al 1% y en presencia de 50 μM de la molécula informadora (3) y 25 μM de la molécula de control (2). Después de la supresión del agua, las únicas señales visibles son las del tampón y el glicerol. Se registró un total de 128 exploraciones con un tiempo de repetición de 2,7 s. (Parte inferior) espectros de ^{19}F registrados para la misma solución en ausencia (1° y 3° espectros desde la izquierda) y en presencia (2° y 4° espectros desde la izquierda) de una mezcla que contiene (4) 25 μM . Los espectros se registraron con un periodo total de espín-eco de 160 ms con un intervalo entre los pulsos a 180° (2τ) de 40 ms. Se registró un total de 64 (izquierda) y 128 (derecha) exploraciones con un tiempo de repetición de 3,5 s y una anchura espectral de 25 ppm. Los datos se multiplicaron con una función exponencial de 1 Hz antes de la transformación de Fourier.

Figura 12. Estructuras de los Compuestos 1-4.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas de la invención

La presente invención se refiere al uso de RMN de ^{19}F , particularmente experimentos de unión competitiva de RMN de ^{19}F . Es decir, la presente invención se refiere a rastreo basado en ligando (preferiblemente, rastreo competitivo) usando experimentos de ^{19}F . La detección de flúor-19 tiene muchas ventajas sobre la detección de protones en estos experimentos.

El flúor es un núcleo favorable para estos experimentos a causa de la significativa contribución de Anisotropía de Desplazamiento Químico (CSA del inglés Chemical Shift Anisotropy) de la relajación transversal de ^{19}F de la señal del ligando cuando está unido a una proteína. Es decir, la contribución de CSA a la relación transversal de ^{19}F hace a la señal del flúor especialmente sensible a los efectos de la formación de complejos con la diana. Puede usarse un ligando con afinidad de baja a moderada que contenga un átomo de ^{19}F como molécula de referencia para la detección y caracterización de nuevos ligandos. Además, la detección de flúor reduce significativamente o incluso elimina el problema de solapamiento espectral, que sucede en RMN de protones (^1H), ya que la inmensa mayoría de los compuestos a ensayar no contendrán un átomo de flúor. Como la RMN de protones, la RMN de ^{19}F es altamente sensible y es susceptible a una rápida recogida de datos, posibilitando el rastreo de alto rendimiento de grandes bibliotecas de compuestos. El flúor se usa a menudo en esfuerzos de diseño de fármacos para potenciar las propiedades farmacocinéticas de compuestos biológicamente activos. Como aproximadamente el 12% de las moléculas que comprenden los Compuestos de Rastreo del Directorio Químico Disponible (ACD-SC del inglés Available Chemical Directory Screening Compounds) contienen un átomo de flúor, típicamente puede obtenerse un compuesto de referencia para el rastreo competitivo sin recurrir a síntesis química. De hecho, el resto fluoro-benceno y trifluorometil-benceno se encuentran en aproximadamente 150.000 y aproximadamente 40.000 moléculas, respectivamente.

Los experimentos de unión competitiva implican el desplazamiento de un compuesto de referencia en presencia de una molécula competitiva. Preferiblemente, el compuesto de referencia se une a la molécula diana con una afinidad de unión en el intervalo micromolar. Preferiblemente, el compuesto de ensayo se une a la molécula diana con una afinidad de unión más fuerte que (es decir, menor de) 1 micromolar (por ejemplo, en el intervalo nanomolar), aunque también pueden evaluarse compuestos que se unen con una afinidad de unión más débil que (es decir, mayor de) 1 micromolar usando los procedimientos de la presente invención.

Aunque los procedimientos descritos en este documento son particularmente útiles para identificar ligandos que son agentes de unión relativamente fuertes para la molécula diana, pueden usarse para identificar ligandos de un amplio intervalo de afinidades de unión. Los agentes de unión relativamente fuertes se definen típicamente como los que tienen una constante de unión de disociación K_D de menos de aproximadamente 1 micromolar, preferiblemente menos de aproximadamente 500 nM, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 nM.

Los experimentos de unión competitiva no están limitados a rastrear bibliotecas de compuestos que son muy solubles en tampón acuoso. Típicamente, solamente el compuesto de referencia tiene que ser soluble en agua, y los compuestos con solubilidad limitada aún pueden detectarse por su efecto indirecto sobre la señal del compuesto de referencia. La molécula de referencia (que, por su papel, se llama la *molécula informadora*) es generalmente soluble en agua para evitar los artefactos que se originan por posibles interacciones no específicas de la molécula de referencia con el receptor y con moléculas de las mezclas a rastrear. Típicamente primero se realizan experimentos de RMN de valoración con la molécula de referencia a diferentes concentraciones de ligando y una concentración fija de proteína o a diferentes concentraciones de proteína y una concentración fija de ligando (C. Dalvit y col., J. Am. Chem. Soc., 124, 7702-7709 (2002)). Estos experimentos se usan para la optimización de las condiciones de preparación del rastreo y para derivar la constante de unión de los aciertos de RMN identificados a partir de una medición de un único punto.

ES 2 345 331 T3

Los ligandos fuertes se identifican fácilmente debido a su gran efecto sobre la molécula informadora. Sin embargo, una limitación de los actuales procedimientos de rastreo competitivo de RMN de ^1H puede estar representada por la existencia de solapamiento espectral entre los compuestos de referencia y ensayo particularmente cuando se rastrean grandes mezclas químicas. El uso de detección de RMN de otros núcleos (por ejemplo, ^{19}F) reduce significativamente estos problemas.

De acuerdo con la invención, se usan las siguientes etapas: proporcionar un compuesto de referencia marcado con ^{19}F que interacciona con la molécula diana; recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana; proporcionar al menos una muestra de ensayo (preferiblemente una pluralidad de muestras de ensayo), comprendiendo cada muestra de ensayo al menos un compuesto de ensayo; recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana; comparar el espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana con el espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana para determinar un cambio en una o más de las resonancias del compuesto de referencia marcado con ^{19}F ; e identificar al menos un compuesto de ensayo que interacciona con la molécula diana, donde el compuesto de ensayo desplaza el compuesto de referencia marcado con ^{19}F (típicamente, esto sucede porque el compuesto de ensayo tiene una afinidad de unión al menos tan ajustada como la del compuesto de referencia).

Típicamente, un cambio en una o más de las resonancias del compuesto de referencia marcado con ^{19}F implica un aumento en la intensidad de señal en al menos una resonancia de referencia. Preferiblemente, un cambio en una o más resonancias del compuesto de referencia marcado con ^{19}F implica que se acentúa al menos una resonancia de referencia.

Si se desea, antes de la obtención de los espectros de ^{19}F , pueden aplicarse filtros espín-eco, como se describe en la Sección de Ejemplos.

Las condiciones experimentales óptimas para cualquiera de los procedimientos descritos en este documento pueden determinarse como se describe en la Sección de Ejemplos. Específicamente, esto típicamente implica las siguientes etapas que se realizan antes de recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana para su uso en la etapa de comparación: recoger espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana a diferentes concentraciones de la molécula diana o a diferentes concentraciones del compuesto de referencia marcado con ^{19}F . La información recogida se usa para determinar las condiciones experimentales óptimas para identificar al menos un compuesto de ensayo que interacciones con la molécula diana.

Puede usarse una amplia diversidad de secuencias de pulsos cuando se recoge el espectro de RMN de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de muestra de ensayo y la molécula diana. Para una comparación eficaz de los espectros, es deseable tener las mismas condiciones experimentales; sin embargo, las concentraciones del compuesto diana y la molécula de referencia marcada con ^{19}F pueden variarse siempre que se hayan generado gráficos con los experimentos de valoración antes del rastreo. Generalmente, las condiciones de temperatura y tampón son las mismas, porque un cambio en estas condiciones experimentales puede afectar a la constante de unión del compuesto de referencia.

En el procedimiento generalizado descrito anteriormente para mezclas de dos o más compuestos de ensayo, la identificación de al menos un compuesto de ensayo puede implicar preferiblemente registrar diferentes espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno del compuesto de ensayo y la molécula diana. Esto viene seguido de la comparación del espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana con el espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno del compuesto de ensayo y la molécula diana para determinar un cambio en la resonancia del compuesto de referencia marcado con ^{19}F seleccionado. Las secuencias de pulsos de estos experimentos generalmente son iguales. Dichos experimentos son conocidos típicamente para los especialistas en la técnica como experimentos de deconvolución.

La constante de disociación (es decir, la afinidad de unión) de un compuesto de ensayo y/o un compuesto de referencia puede determinarse usando técnicas de RMN si se desea, aunque pueden usarse otras técnicas bien conocidas también (por ejemplo, calorimetría de valoración isotérmica). Preferiblemente, la afinidad de unión del compuesto de referencia se evalúa usando calorimetría de valoración isotérmica o espectroscopía de fluorescencia, cuyos detalles específicos son bien conocidos para los especialistas en la técnica y se describen en la Sección de Ejemplos.

Por ejemplo, en un procedimiento basado en RMN, además de las etapas enumeradas anteriormente en el procedimiento generalizado, pueden recogerse espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana a diferentes concentraciones del compuesto de referencia marcado con ^{19}F . Como alternativa o adicionalmente, pueden recogerse espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana a diferentes concentraciones de la molécula diana. Esta información puede usarse para determinar la constante de disociación del compuesto de ensayo como se describe en los ejemplos.

Para aumentar la precisión de uno cualquiera de los procedimientos de la presente invención, pueden usarse diversas técnicas. Típicamente, puede usarse un control interno, que puede ser un compuesto no de interacción.

Una alternativa al uso de una molécula no de interacción es el uso del procedimiento ERETIC (S. Akoka y col., Anal. Chem., 71, 2554-2557 (1999); y V. Silvestre y col., S. Anal. Chem., 73, 1862-1868 (2001)). Esta técnica depende de la generación electrónica de una señal de una frecuencia, anchura de línea y amplitud definidas. Se obtiene un pseudo-FID, originándose el FID por la muestra. La amplitud de esta señal artificial se ajusta para que llegue a ser comparable con la intensidad de la señal del compuesto de referencia registrada en ausencia de la proteína. Este valor de amplitud después se usa para la valoración y los experimentos de rastreo de RMN y se mide la proporción de la intensidad de señal de la señal real y artificial. Añadir una señal ERETIC es como añadir una señal falsa para normalizar las señales.

Para ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el compuesto de referencia se proporciona en combinación con una señal ERETIC con anchura de línea, amplitud, y frecuencia definidas. Para estos procedimientos, la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F con la señal ERETIC en presencia de la molécula diana; y la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F con la señal ERETIC en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana.

Para ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el compuesto de referencia marcado con ^{19}F se proporciona en combinación con un compuesto no de interacción marcado con ^{19}F . Para estos procedimientos, la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F y el compuesto no de interacción marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana; y la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana incluye recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F y el compuesto no de interacción marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana. Dichos compuestos no de interacción actúan como controles porque no se unen a la molécula diana a las concentraciones evaluadas.

En combinación con los experimentos de unión competitiva de la presente invención, puede usarse el procedimiento WaterLOGSY para identificar el compuesto de referencia, así como otros procedimientos tales como ensayos espectroscópicos o bioquímicos, que son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Preferiblemente, el compuesto de referencia puede identificarse por las siguientes etapas: recoger un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY de un compuesto de referencia potencial en ausencia de la molécula diana; recoger un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY del compuesto de referencia potencial en presencia de la molécula diana; y comparar los espectros WaterLOGSY para identificar si el compuesto de referencia potencial interacciona con la molécula diana.

El procedimiento WaterLOGSY (también conocido como Ligando Acuoso Observado mediante Espectroscopia Y de Gradiente) se basa en la transferencia de magnetización desde los protones de agua a granel a los protones de compuestos que interaccionan con moléculas diana (por ejemplo, proteína). Usando técnicas WaterLOGSY, se distinguen compuestos de unión de agentes no de unión por la señal opuesta de sus efectos Overhauser nucleares (NOE) de ligando acuoso. El procedimiento WaterLOGSY se describe en mayor detalle en la Publicación Internacional N° WO 01/23330 (publicada el 5 de abril de 2001), en C. Dalvit y col., J. Biomol. NMR, 18, 65-68 (2000).

Las moléculas diana que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención incluyen una amplia diversidad de moléculas, particularmente macromoléculas, tales como polipéptidos (preferiblemente, proteínas), polinucleótidos, polímeros orgánicos, y similares. Estos pueden estar dentro de una célula viva o en un lisado.

“Polinucleótido” como se usa en este documento se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, y incluye ADN y ARN tanto monocatenario como bicatenario. Un polinucleótido puede incluir regiones tanto codificantes como no codificantes, y puede obtenerse directamente de una fuente natural (por ejemplo, un microbio), o puede prepararse con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas, o químicas. Un polinucleótido puede ser de topología lineal o circular. Un polinucleótido puede ser, por ejemplo, una parte de un vector, tal como un vector de expresión o clonación, o un fragmento.

“Polipéptido” como se usa en este documento se refiere a un polímero de aminoácidos y no se referencia a una longitud específica de un polímero de aminoácidos. Por tanto, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína, y enzima se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Este término también incluye modificaciones después de la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares.

El compuesto de referencia es uno que interacciona con la molécula diana selecciona con una afinidad de unión suficientemente baja. Los compuestos de referencia de interacción relativamente débil se definen típicamente como aquellos que tienen una constante de unión de disociación K_D de al menos 10 micromolar.

Los compuestos de ensayo que pueden evaluarse pueden ser cualquiera de una amplia diversidad de compuestos, que tienen potencialmente una amplia diversidad de afinidades de unión por la diana. Significativamente, el procedimiento de la presente invención tiene la capacidad de detectar compuestos que son agentes de unión relativamente fuertes. Los agentes de unión relativamente fuertes se definen típicamente como aquellos que tienen una constante de unión de disociación K_D de menos de aproximadamente 1 micromolar. Los compuestos que pueden rastrearse usando el procedimiento de la presente invención incluyen, por ejemplo, extractos vegetales, extractos fúngicos, otros productos naturales, y bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas.

La presente invención puede rastrear ligandos de una biblioteca de compuestos que tienen un ancho intervalo de solubilidades (los procedimientos son particularmente modificables para compuestos que tienen solubilidades muy bajas). De forma significativa y ventajosa, para ciertas realizaciones, la presente invención preferiblemente implica realizar un ensayo de unión a concentraciones relativamente bajas de la diana (es decir, la molécula diana). Por tanto, realizaciones preferidas de la presente invención permiten la detección de compuestos que son solamente marginalmente solubles. Típicamente estos compuestos tienen una solubilidad en agua de no más de aproximadamente 10 μM .

Preferiblemente, la concentración de cada compuesto de ensayo en cada muestra no es mayor de aproximadamente 100 μM , aunque pueden usarse concentraciones mayores si se desea. Sin embargo, una ventaja significativa del procedimiento de la presente invención es que pueden usarse concentraciones muy bajas de ligando (por ejemplo, no mayores de aproximadamente 10 μM).

Las concentraciones y proporciones de compuesto de ensayo a molécula diana exactas usadas pueden variar dependiendo del tamaño de la molécula diana, la cantidad de molécula diana disponible, el límite de detección de la afinidad de unión, y la velocidad deseada de recogida de datos. Preferiblemente, la concentración de molécula diana es de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 μM .

Los disolventes usados para las mezclas de ensayo pueden ser cualquiera de una amplia diversidad siempre que no degraden (por ejemplo, desnaturalicen) la diana. Típicamente se usan agua y DMSO. Pueden usarse disolventes protonados y detergentes.

Si se desea, pueden añadirse otros componentes (por ejemplo, tampones) a las mezclas de ensayo para ciertas ventajas, como saben bien los especialistas en la técnica.

La presente invención también podría encontrar aplicaciones útiles para el rastreo rápido de mezclas químicas (es decir, mezclas de dos o más compuestos de ensayo). Las técnicas de rastreo rápido típicamente implican proporcionar una pluralidad de muestras de ensayo, comprendiendo cada muestra de ensayo una mezcla de dos o más compuestos de ensayo.

Una vez que se ha identificado y confirmado un ligando (preferiblemente un ligando de alta afinidad), se usa su estructura para identificar compuestos disponibles con estructuras similares a ensayar para la actividad o afinidad, o para dirigir la síntesis de compuestos estructuralmente relacionados a ensayar para la actividad o afinidad. Estos compuestos después se obtienen del inventario o se sintetizan. Más a menudo, después se ensayan para la actividad usando ensayos enzimáticos. En el caso de dianas moleculares que no son enzimas o que no tienen un ensayo enzimático disponible, estos compuestos pueden ensayarse para la afinidad usando técnicas de RMN similares a las descritas anteriormente, o por otros procedimientos físicos tales como calorimetría de desnaturalización isotérmica. Los compuestos identificados en esta etapa con afinidades para la diana molecular de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ M o mejor típicamente se consideran moldes químicos principales.

En algunos casos, la unión del ligando se estudia adicionalmente usando experimentos de RMN más complejos u otros procedimientos físicos tales como calorimetría o cristalografía de rayos X.

La tecnología de criosonda optimizada para la detección de ^1H y ^{19}F podría potenciar adicionalmente el rendimiento de este procedimiento de rastreo. En este caso, el factor limitante será el tiempo necesario para cambiar la muestra, equilibrar la temperatura de la muestra, y cargar la muestra.

Ejemplos

Los objetivos y ventajas de esta invención se ilustran adicionalmente por los siguientes ejemplos, pero los materiales particulares y cantidades de los mismos enumerados en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no deben interpretarse de forma excesivamente limitante de esta invención.

Materiales y procedimientos

Para la primera serie de experimentos en el Ejemplo (I), se expresó el dominio quinasa (PM aproximadamente 34000) de una serie/treonina quinasa p21 activada como una proteína de fusión a GST en *E. coli* y se purificó hasta homogeneidad después de eliminar la marca GST. Las muestras de RMN estaban en solución salina tamponada con

ES 2 345 331 T3

fosfato (PBS, código: P-3813, Lote 100K8211 de Sigma) pH 7,4. Se añadió D₂O a la solución (concentración final del 8%) para la señal de cierre. Las moléculas pequeñas se prepararon en soluciones madre concentradas en DMSO deuterado y se almacenaron a 253 K.

Para la segunda serie de experimentos en el Ejemplo (II), se adquirió albúmina sérica humana libre de ácidos grasos (A-3782) de Sigma y se usó sin purificación adicional. Las muestras de RMN estaban en solución salina tamponada con fosfato (PBS, código: P-3813, Lote 100K8211 de Sigma) pH 7,4 en presencia de EDTA 5 μ M. Se añadió D₂O a la solución (concentración final del 8%) para la señal de cierre. Las moléculas pequeñas se prepararon en soluciones madre concentradas en DMSO deuterado o agua y se almacenaron a 253 K.

RMN

Para la primera serie de experimentos en el Ejemplo (I), todos los espectros de RMN se registraron a 293 K con un espectrómetro de RMN Varian Inova 600 MHz (564 MHz para ¹⁹F) equipado con un toma muestras automático Sample Management System (SMS). La supresión del agua en los experimentos detectados de ¹H se consiguió con la secuencia de esculpido de excitación (T.-L. Hwang, J. Magn. Reson. A, 112, 275-279 (1995)). Los dos pulsos de 1801° cuadrados selectivos de agua y los cuatro gradientes de campo pulsado del esquema fueron de 2,6 y 1 milisegundos (ms) de duración, respectivamente.

Para la segunda serie de experimentos en el Ejemplo (II), todos los espectros de RMN se registraron a 300 K con un espectrómetro de RMN Bruker Avance 600 que funciona a una frecuencia de Larmor de ¹⁹F de 564 MHz. Se usó una sonda de doble bobina {¹⁹F}-{¹H} con la bobina interna sintonizada para la frecuencia ¹⁹F y la bobina externa sintonizada para la frecuencia de ¹H. El fondo de flúor background de estas sondas no interfiere con las mediciones. Estas señales son anchas y por lo tanto no son visibles en los espectros de la molécula de referencia y de control registrados con un esquema espín-eco. Todos los espectros se registraron con un desacoplamiento de protones Waltz-16 débil aplicado durante el periodo de obtención. Típicamente se registraron 4-8 exploraciones falsas para el equilibrado de la temperatura. Se usaron esquemas de Carr-Purcell-Meibom-Gill de diferente longitud y de intervalo 2 τ largo antes del periodo de obtención. Los desplazamientos químicos están referenciados a ácido trifluoroacético.

Fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J-715 usando un tubo fotomultiplicador auxiliar colocado perpendicular al haz de excitación. La longitud de onda de excitación era de 310 nm (con una anchura de banda de 5 nm) y se empleó un filtro de corte de 385 nm. Las mediciones de afinidad se hicieron usando la misma fuente de HSA libre de ácidos grasos que la usada para los experimentos de RMN. Se prepararon soluciones de analito y HSA en solución salina tamponada con fosfato (PBS, código: P-3813, Lote 100K8211 de Sigma) pH 7,4 en presencia de EDTA 5 μ M. El tampón se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m antes del uso. La afinidad de la albúmina se determinó formando alícuotas de 2,0 ml de una solución 3 μ M de analito en una cubeta de cuarzo, longitud de paso de 1,0 cm, y valorando la solución con HSA (concentración madre de 250 μ M).

Experimentos ITC

Los experimentos de calorimetría de valoración isotérmica se realizaron usando un microcalorímetro de valoración OMEGA de Microcal, Inc. (Northampton, MA). El microcalorímetro de valoración constaba de una celda de muestra y de referencia mantenidas en un alojamiento adiabático. La celda de referencia se llenó con PBS. Se puso una solución 23 μ M de HSA en PBS + DMSO al 2% en la celda de muestra de 1,37 ml. El analito a 0,8 mM en el mismo tampón se mantuvo en una jeringa de 250 μ l. Se hicieron treinta inyecciones (8 μ l cada una y 12 segundos/inyección) de analito por un motor de velocidad gradual controlado por ordenador en la celda de muestra mantenida a 25°C. La velocidad de agitación de la jeringa era de 400 rpm. Se midió el calor absorbido o liberado con cada inyección por un dispositivo termoelectrónico conectado a un preamplificador de nanovoltios Microcal. Las isotermas de valoración para las interacciones de unión estaban compuestas del flujo de calor diferencial para cada inyección. El calor de dilución obtenido por inyectar el analito en PBS era insignificante. Las isotermas de unión se ajustaron a un modelo de único sitio de unión (T. Wiseman y col., Anal. Biochem., 179,131-137 (1989)) usando un algoritmo de mínimos cuadrados no lineal iterativo incluido con el instrumento.

Ejemplo I

Resultados y análisis

Teoría de Relajación de ¹⁹F

La relajación longitudinal de ¹⁹F no es un buen parámetro para los experimentos de unión competitiva ya que carece de dependencia directa de τ_c necesaria para identificar pequeñas moléculas que interaccionan con una macromolécula. Sin embargo, la velocidad de relajación transversal R₂ representa un excelente parámetro ya que contiene

densidades espectrales calculadas a frecuencia 0 (M. Goldman, Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids, Clarendon Press, Oxford, (1988)) para las interacciones bipolares heteronucleares ^{19}F - ^1H y para la interacción de anisotropía de desplazamiento químico (CSA) de ^{19}F como se describe por la ecuación:

$$R_2^F = \frac{\gamma_F^2 \gamma_H^2 \hbar^2 \tau_c}{20} \sum_{H_i} \frac{1}{r_{FHi}^6} \left\{ 4 + \frac{1}{1 + (\omega_F - \omega_H)^2 \tau_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_F^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + \omega_F^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_F + \omega_H)^2 \tau_c^2} \right\} + \frac{2}{15} \Delta\sigma^2 B_0^2 \gamma_F^2 \tau_c \left\{ \frac{2}{3} + \frac{1}{2(1 + \omega_F^2 \tau_c^2)} \right\} \quad (1)$$

La H_i corresponde a todos los protones del compuesto de referencia y de la proteína cercana en el espacio al átomo de flúor, $\Delta\sigma$ es la CSA del átomo de ^{19}F y B_0 es la fuerza del campo magnético, γ_H y γ_F son las proporciones giromagnéticas de los protones y el flúor, respectivamente, ω_H y ω_F son las frecuencias de Larmor de los protones y el flúor, respectivamente, τ_c es el tiempo de correlación y r_{FHi} es la distancia internuclear entre el protón H_i y el átomo de flúor.

Debido al gran CSA de ^{19}F (tanto como unos pocos cientos de ppm) (J.T. Gerig, Methods in Enzymol., 177, 3-23 (1989); y J.T. Gerig, Prog. NMR Spectrosc, 26, 293-370 (1994)) contribuirá significativamente a la relajación transversal de la fracción de ligando unido. La contribución de CSA a la relajación es directamente proporcional al cuadrado del campo magnético. Por lo tanto, el efecto es más pronunciado a campos magnéticos mayores. Esto puede apreciarse en la simulación de la Figura 1 donde se representa la diferencia en la anchura de línea de ^{19}F debida a la contribución de CSA para una molécula pequeña libre en solución y cuando está unida a una gran macromolécula de diferentes tamaños como una función de la frecuencia de Larmor. Se usaron una $\Delta\sigma$ de 100 ppm y un τ_c de 200 ps para la pequeña molécula libre en solución para la simulación. Como puede apreciarse a partir de la Figura 1, los campos magnéticos más fuertes disponibles hoy día no son óptimos para los experimentos de ^{19}F de ligandos unidos a proteínas fuertemente y de proteínas marcadas selectivamente con ^{19}F debido a la fuerte contribución de CSA. En contraste, los fuertes campos magnéticos son particularmente adecuados para los experimentos de HTS de unión competitiva realizados con una molécula de referencia de afinidad débil. La diferencia en la anchura de línea de resonancia de ^{19}F de la molécula de referencia entre el estado libre y unido aumenta con la fuerza del campo magnético. Además, la diferencia de desplazamiento químico para la resonancia del ligando con flúor entre el estado libre y unido ($\delta_{\text{libre}} - \delta_{\text{unido}}$) llega a ser más grande. Esto provoca una contribución significativa del término de intercambio $R_{2,ex}$

$$R_{2,ex} = \frac{[EL]}{[L_{TOT}]} \left(1 - \frac{[EL]}{[L_{TOT}]} \right)^2 \frac{4\pi^2 (\delta_{\text{libre}} - \delta_{\text{unido}})^2}{K_{-1}} \quad (2)$$

para la anchura de línea de ^{19}F del compuesto de referencia (J.W. Peng., J. Magn. Reson., 153, 32-47 (2001)). $[EL]/[L_{TOT}]$ es la fracción de ligando unido y $1/K_{-1}$ es el tiempo de residencia del ligando unido a la proteína.

Selección del Compuesto de Referencia y los Parámetros de Rastreo

Como los experimentos de rastreo de RMN típicamente se realizan con un exceso de factor 10-100 de ligando sobre la proteína (que provoca solamente una fracción pequeña de ligando unido), los términos en la sección precedente ($\Delta\sigma$, B_0 , $\delta_{\text{libre}} - \delta_{\text{unido}}$, $1/K_{-1}$, etc.) llegan a ser importantes en la selección del compuesto de referencia. El desplazamiento químico de la señal de ^{19}F del compuesto de referencia unido a la proteína puede ser muy diferente cuando se compara con el desplazamiento químico del ligando libre debido a la contribución del cambio inducido por la proteína (J.T. Gerig, Prog. NMR Spectrosc, 26, 293-370 (1994); y J. Feeney y col., J. Am. Chem. Soc, 118, 8700-8706 (1996)). Por lo tanto, incluso moléculas que tienen una afinidad de unión media en el intervalo μM podrían presentar un espectro de ^{19}F con dos resonancias distintas, una para la forma unida y la otra para la forma libre. Esto surge del hecho de que la diferencia en el desplazamiento químico de las dos resonancias es más grande cuando se compara con la velocidad de intercambio entre la especie libre y unida. En la HTS solamente se controlará la señal a la frecuencia del ligando libre ya que la concentración de la proteína es demasiado baja (unos pocos cientos nM a 1-5 μM) para permitir la observación de la resonancia muy ancha de la forma unida.

Para evaluar la idoneidad de cualquier ligando fluorado dado para el rastreo competitivo y para determinar los parámetros experimentales óptimos, se realizan experimentos de valoración para la molécula candidata como una función de la fracción de ligando unido (C. Dalvit y col., J. Am. Chem. Soc, 124, 7702-7709 (2002)) obteniendo experimentos R_2 filtrados de ^{19}F 1D o simplemente experimentos de ^{19}F 1D. Para una mejor sensibilidad, los experimentos se registran con desacoplamiento de ^1H durante el periodo de obtención. Los compuestos candidatos y las condiciones experimentales se examinan para su sensibilidad y para la presencia de una resonancia de un único flúor que muestre perturbaciones significativas después de la unión de la diana.

Una vez se ha identificado un ligando adecuado y se han establecido las condiciones experimentales, puede entonces realizarse el rastreo controlando los cambios en la relajación transversal (mediante los experimentos R_2 filtrados realizados con CPMG o esquemas espín-eco o simplemente por análisis de la anchura de línea) de la señal de ^{19}F de la molécula de referencia como se muestra en la Figura 2.

En este caso, se usó $50\ \mu\text{M}$ del ligando de afinidad moderada Compuesto A ($K_D = 10\ \mu\text{M}$) como el compuesto de referencia en presencia de $1,5\ \mu\text{M}$ de PAK4. Se observó un aumento significativo en la señal del Compuesto A después del esquema espín-eco en presencia de una mezcla de compuestos que contenía un ligando de alta afinidad (Compárese la Figura 2a con 2b). Este aumento en la señal indica una disminución en la unión de la molécula de referencia Compuesto A debido a la competición con una molécula contenida en la mezcla. Los experimentos de deconvolución simple (2c y 2d) permiten la identificación del Compuesto B como la molécula activa.

Cuando se usan secuencias tipo espín-eco, se recomienda usar un retardo suficientemente largo entre los pulsos fuertes a 180° para aprovechar el término de intercambio de la ecuación (2). Esto es posible ya que no hay acoplamientos de escala homo-nucleares y la evolución en los acoplamientos de escala heteronucleares se reconcentran. Sin embargo, el retardo no debe ser muy largo para evitar la relajación derivada de la inhomogeneidad del campo magnético estático.

Además del compuesto de referencia fluorado, es ventajoso incluir una pequeña molécula fluorada que no interaccione con el receptor (un compuesto de control). La Figura 3 muestra este principio donde los espectros de ^{19}F de la molécula informadora y de la molécula no de interacción se registran en ausencia y presencia de la proteína. Aunque la señal de la molécula informadora experimenta cambios espectrales, la señal de la pequeña molécula no cambiará. Esto puede apreciarse en el espectro de diferencia de la Figura 3. La señal de la molécula no de interacción representa una referencia interna que puede usarse para calibrar con un único experimento los cambios en la señal de la molécula informadora. Debe señalarse que incluso si la pequeña molécula tuviera una débil interacción (intervalo mM) con el receptor esto no interferiría con las mediciones. La concentración de la pequeña molécula ($10\text{-}30\ \mu\text{M}$) es órdenes de magnitud más pequeña en comparación con la constante de unión débil y por lo tanto la fracción de compuesto unido al receptor es insignificante. Para demostrar esto, se eligió ácido trifluoroacético (TFA) como la molécula pequeña que no interacciona con el receptor. Debe observarse que algunos compuestos en el rastreo pueden contener trazas de TFA. Por tanto, aunque es válido para la prueba de hipótesis presentada en este documento, debe seleccionarse un compuesto de control alternativo para una aplicación más general. La utilidad de usar tanto una molécula informadora como un compuesto de control para la identificación de artículos principales a través de HTS y deconvolución se muestra en la Figura 4. La mezcla seis compuestos no afecta a la anchura de línea de la molécula informadora (Figura 4c) y la señal del compuesto de referencia Compuesto A es claramente menos intensa en comparación con la señal de TFA. Sin embargo, la presencia de una molécula competidora fuerte (Compuesto B) en la mezcla de siete compuestos provoca una acentuación de la resonancia de la molécula informadora (Figura 4d) y las dos señales tienen ahora una intensidad comparable.

Como se describe por C. Dalvit y col., J. Am. Chem. Soc, 124, 7702-7709 (2002), es posible obtener la constante de unión acierto de RMN identificado a partir de la proporción de la intensidad de señal de las dos resonancias de ^{19}F representadas como una función de la fracción de ligando unido y la medición del cambio en la intensidad de señal de la molécula de referencia en presencia de una molécula competidora. En este caso específico, la constante de unión para el acierto de RMN Compuesto B se determinó a $200 \pm 100\ \text{nM}$. Cuando se usan experimentos de ^{19}F para la HTS también es importante registrar los espectros de ^1H para estimar la concentración de los compuestos que comprenden las mezclas químicas y por lo tanto obtener un valor fiable para la constante de unión de los aciertos de RMN.

También puede aplicarse una etapa de NOE ^1H a ^{19}F en los experimentos de ^{19}F antes del periodo de obtención para transferir magnetización de los protones al espín del flúor. Esta etapa puede realizarse de diferentes modos. Se observa una potenciación de la señal de ^{19}F para una pequeña molécula que no interacciona con el receptor grande: Se observa una potenciación de señal muy débil o una reducción de señal, dependiendo de la fracción de ligando unido, el tiempo de correlación de la proteína y cómo se realiza la etapa de NOE para una molécula que interacciona de forma débil con el receptor. Estas diferencias del NOE heteronuclear pueden usarse de forma constructiva en experimentos de HTS de unión competitiva. Cuando la *molécula informadora* se desplaza del receptor en presencia de una molécula competidora, su señal de ^{19}F llega a ser más intensa a causa de una anchura de línea más pequeña y potenciación de señal mediante NOE heteronuclear.

Ejemplo II

Resultados y análisis

Teoría

La sensibilidad de la señal de RMN de ^{19}F es proporcional a $(\gamma_{\text{F}}/\gamma_{\text{H}})^3$ donde γ_{F} y γ_{H} son la proporción giromagnética del flúor y el protón, respectivamente. Debido al hecho de que ^{19}F es el único isótopo de flúor estable y tiene un espín $1/2$, su sensibilidad es elevada, es decir, 0,83 veces la del protón. Las señales de flúor aparecen como resonancias de singlete en presencia de desacoplamiento de protones y por lo tanto son intensas.

La relajación transversal de ^{19}F representa un excelente parámetro a controlar para el rastreo realizado con experimentos de unión competitiva. Una interacción dipolar entre el flúor y un protón localizado a cierta distancia es muy similar en magnitud (0,88 veces) a una interacción dipolar entre dos protones separados por la misma distancia. Por lo tanto, las contribuciones dipolares a la anchura de línea de una señal de flúor o protones de una molécula de referencia son similares. La velocidad de relajación transversal R_2 de la señal de flúor tiene una contribución adicional originada por la gran interacción de CSA del átomo de ^{19}F y se da por la siguiente ecuación (D. Canet, Nuclear Magnetic Resonance Concepts and Methods, John Wiley & Sons, Chichester, (1996)):

$$R_2^{\text{CSA}} = \frac{2}{15} \Delta\sigma^2 \left(1 + \frac{\eta_{\text{CSA}}^2}{3} \right) B_0^2 \gamma_{\text{F}}^2 \tau_c \left\{ \frac{2}{3} + \frac{1}{2(1 + \omega_{\text{F}}^2 \tau_c^2)} \right\} \quad (3)$$

en la que $\Delta\sigma$ es la CSA del átomo de ^{19}F y se da por $\Delta\sigma = \sigma_{zz} - (\sigma_{xx} + \sigma_{yy})/2$. Los diferentes σ son los componentes del tensor de desplazamiento químico. El parámetro de asimetría $\eta_{\text{CSA}} = (3/2)(\sigma_{xx} - \sigma_{yy})/\Delta\sigma$ y para un tensor de desplazamiento químico axialmente simétrico $\eta_{\text{CSA}} = 0$. B_0 es la fuerza del campo magnético, γ_{F} es la proporción giromagnética del flúor, ω_{F} es la frecuencia de Larmor del flúor, y τ_c es el tiempo de correlación.

Como se ha analizado anteriormente en la primera serie de experimentos (I), la simulación realizada suponiendo un tensor de CSA axialmente simétrico y suponiendo una CSA igual para el estado libre y unido de un ligando, como se muestra en la Figura 1, indica que la diferencia en la anchura de línea de la señal de ^{19}F de la molécula de referencia entre el estado libre y unido de justo la contribución de CSA sola puede ser muy grande (C. Dalvit y col., Comb. Chem. HTS, 5, 605-611 (2002) y el Ejemplo (I) anterior). Esta diferencia aumenta con el tamaño del receptor y con el cuadrado de la fuerza del campo magnético. Altos campos magnéticos pueden conducir a anchuras de línea extremadamente amplias (>200 Hz) para señales flúor de cualquier macromolécula (por ejemplo, una proteína marcada selectivamente con ^{19}F) o ligandos unidos a proteína fuertemente (W.E. Hull y col., J. Mol. Biol., 98, 121-153 (1975); J.T. Gerig, Methods in Enzymol., 177, 3-23 (1989); y J.T. Gerig, Prog. NMR Spectrosc, 26, 293-370 (1994)). Dichas anchuras de línea hacen que la detección directa de resonancias de flúor de la macromolécula o ligandos de alta afinidad sea inaplicable para los propósitos de rastreo. En contraste, los fuertes campos magnéticos son particularmente adecuados para experimentos de unión competitiva realizados con una molécula de referencia de afinidad débil donde la población que varía entre los estados libre y unido producen una anchura de línea observada que puede manipularse y controlarse (C. Dalvit y col., Comb. Chem. HTS, 5, 605-611 (2002) y el Ejemplo (I) anterior).

Las secuencias de pulsos típicamente usadas emplean un esquema espín-eco de Carr-Purcell Meibom Gill (CPMG) (H.Y. Carr y col., Phys. Rev., 94, 630-638 (1954); y S. Meiboom y col., Rev. Sci. Instrum., 29, 688 (1958)) antes del periodo de obtención. La intensidad de señal de la molécula de referencia al final de esquema espín-eco $I_{(n2\tau)}$ se da por la siguiente ecuación (T.C. Farrar y col., Pulse and Fourier Transform NMR, Introduction to Theory and Methods, Academic Press, Nueva York, 1971):

$$I_{(n2\tau)} = I_0 e^{-\gamma_{\text{F}}^2 G^2 D_{\text{obs}} (n2\tau) \frac{\tau^2}{3e} - n2\pi R_{2,\text{obs}}} \quad (4)$$

en la que I_0 es la intensidad de señal después del pulso inicial a 90° , 2τ es el intervalo entre la serie de pulsos a 180° , G es la inhomogeneidad del campo magnético estático, γ_{F} es la proporción giromagnética del flúor, y n es la cantidad de ciclos del esquema espín-eco. D_{obs} , el coeficiente de difusión de conversión observado para la molécula de referencia de afinidad débil, está dada por la ecuación:

$$D_{\text{obs}} = \frac{[\text{EL}]}{[\text{L}_{\text{TOT}}]} D_{\text{unido}} + \left(1 - \frac{[\text{EL}]}{[\text{L}_{\text{TOT}}]} \right) D_{\text{libre}} \quad (5)$$

en la que D_{unido} y D_{libre} son los coeficientes de difusión de la molécula de referencia en los estados unido y libre, respectivamente. $[\text{EL}]/[\text{L}_{\text{TOT}}]$ y $(1-[\text{EL}]/[\text{L}_{\text{TOT}}])$ son la fracción de ligando unido y libre, respectivamente.

$R_{2,obs}$, la velocidad de relajación transversal para la molécula de referencia de afinidad débil, está dada por la ecuación:

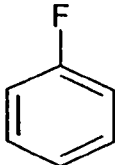
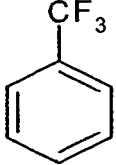
$$R_{2,obs} = \frac{[EL]}{[L_{TOT}]} R_{2,unido} + \left(1 - \frac{[EL]}{[L_{TOT}]}\right) R_{2,libre} + \frac{[EL]}{[L_{TOT}]} \left(1 - \frac{[EL]}{[L_{TOT}]}\right)^2 \frac{4\pi^2 (\delta_{libre} - \delta_{unido})^2}{K_{-1}} \quad (6)$$

en la que $R_{2,unido}$ y $R_{2,libre}$ son las constantes de velocidad de relajación transversal para el ligando en los estados unido y libre, respectivamente. El último término es el término de intercambio donde δ_{unido} y δ_{libre} son los desplazamientos químicos isotrópicos de la resonancia de flúor de la molécula de referencia en los estados unido y libre, respectivamente y $1/K_{-1}$ es el tiempo de residencia del ligando unido a la proteína. La ecuación (6) es válida solamente cuando los experimentos se realizan con un largo periodo 2τ (donde $\tau \gg 1/K_{-1}$). Los experimentos registrados con $\tau < 5/K_{-1}$ provocan una contribución reducida del término de intercambio a la velocidad de relajación transversal observada (Z. Luz y col., J. Chem. Phys., 39, 366-370 (1963); y A. Allerhand y col., H.S. J. Chem. Phys., 41, 2115-2126 (1964)).

Por lo tanto, el rastreo se realiza usando un largo periodo 2τ . Esto es posible porque la evolución en los acoplamientos de escala ^1H - ^{19}F heteronucleares se reconcentran al final del esquema. Sin embargo, el periodo 2τ no debe ser muy largo para reducir la atenuación de señal originada por la difusión especial de la molécula de referencia (es decir, el primer término exponencial de la ecuación (4)).

Selección de las moléculas informadora y de control

La Tabla 1 informa de la frecuencia de moléculas que contienen un átomo de flúor en tres bibliotecas químicas disponibles en el mercado. La tabla contiene también las cantidades de dos sustituyentes, monofluoro-benceno y trifluorometil-benceno, a menudo usados en estos experimentos. La gran cantidad de moléculas que contienen un átomo de flúor hace que la selección de las moléculas informadora y de control sea una tarea fácil sin recurrir a síntesis química.

Tabla 1: Frecuencia de moléculas que contienen F en diferentes bibliotecas disponibles en el mercado. ACD-SC (Compuestos de Rastreo del Directorio Químico Disponible), MDDR (Informe de Datos de Fármacos MDL), NCI (Instituto Nacional del Cáncer)			
Colección de Compuestos	moléculas con F		
ACD-SC	~12%	153000	43000
MDDR	~15%	11000	3000
NCI	~4%	3000	1000

Una característica interesante que surge de la Tabla 1 es la gran cantidad de moléculas que contienen flúor presentes en la biblioteca MDDR. Una búsqueda cronológica dentro de esta biblioteca, como se muestra en la Figura 5, demuestra que durante los últimos 20 años se ha doblado el porcentaje de compuestos en desarrollo que contienen al menos un átomo de flúor. Se observa un aumento estable del 10,9% en el periodo 1981-1985 al 19,4% en el periodo 1996-2000. El átomo de flúor se ha introducido de forma creciente en el procedimiento de optimización de artículos principales para mejorar la potencia, las propiedades físico-químicas y la estabilidad metabólica frente al ataque enzimático.

En la selección de las dos moléculas particular debe ponerse cuidado a su solubilidad. La presencia de un átomo de flúor aumenta la lipofilidad de un compuesto. Las moléculas que no son muy solubles en solución acuosa no son adecuadas para experimentos de rastreo ya que pueden unirse de un modo no específico al receptor. Por lo tanto, los espectros de protones y flúor y los espectros WaterLOGSY de protones para las moléculas informadora y de control potenciales se registran en ausencia de proteína a una concentración típicamente 2 a 4 veces mayor (es decir, 100 a 200 μM) que la concentración usada en el procedimiento de rastreo. Solamente las moléculas que de acuerdo con los espectros de RMN son solubles y no se agregan a estas concentraciones se consideran candidatos potenciales para las moléculas de referencia y de control usadas para el rastreo.

Moléculas con un grupo CF₃

Las moléculas de referencia que contienen un grupo CF₃ tienen la ventaja de alta sensibilidad de la señal de flúor. Se muestran espectros de ¹⁹F espín-eco típicos de la molécula de referencia ácido 5-[1-metil-3(trifluorometil)-1H-pirazol-5-il]-2-tiofenocarboxílico (1) y la molécula de control 1-[5-(trifluorometil)1,3,4-tiadiazol-2-il]piperazina (2) registrados con desacoplamiento de protones durante el periodo de obtención en presencia de diferentes concentraciones de HSA en la Figura 6. Las mediciones de ITC realizadas con (2) no hallaron ninguna evidencia de unión a HSA (solamente se detectó calor de dilución con inyecciones de 8 µl de 800 µM de (2) en HSA 30 µM) de acuerdo con los resultados de RMN. Se usó una concentración de solamente 25 µM para ambas moléculas para los experimentos de RMN. La baja concentración de la molécula de referencia evita los problemas que surgen de la unión no específica y la agregación. Las desventajas con estas moléculas están representadas por la rápida rotación de los átomos de flúor alrededor del eje C₃ del grupo observada incluso en el estado unido. Esto provoca una diferencia limitada en la anchura de línea para la señal de CF₃ de la molécula de referencia entre el estado libre y unido.

Moléculas con un grupo CF

Las moléculas con un grupo CF son particularmente adecuadas para los experimentos de rastreo basados en ligando competitivo. La CSA de ¹⁹F puede ser muy grande, por lo tanto, aumentando la diferencia en la anchura de línea entre el estado libre y unido de la molécula de referencia de acuerdo con la ecuación (3). Por ejemplo, la CSA para un CF aromático varía de 71 ppm para monofluoro-benceno a 158 ppm para hexafluoro-benceno (H. Raber y col., Chem. Phys., 26,123-130 (1977)). Además, la CSA de ¹⁹F de la molécula de referencia en el estado unido puede aumentar debido a un "efecto orto" o por la implicación directa del átomo de flúor en un enlace de hidrógeno con la proteína. Estos dos fenómenos también tienen el efecto de conferir una gran diferencia en el desplazamiento isotrópico para el estado libre y unido. Para un compuesto de referencia de afinidad débil, el término de intercambio de la ecuación (6) puede contribuir significativamente a la anchura de línea del compuesto de referencia en presencia de la proteína. La señal de flúor está habitualmente acoplada de forma escalar con varios protones y por lo tanto para la mejora de la sensibilidad, es necesario registrar los espectros con desacoplamiento de protones durante la obtención. La Figura 7 muestra espectros de flúor espín-eco típicos para la molécula de referencia ácido 2-hidroxi-3-fluorobenzoico (3) y la molécula de control (2) registrados con desacoplamiento de protones como una función de la concentración de HSA. Un inconveniente con estas moléculas es la mayor concentración requerida para los experimentos. Los espectros de la Figura 7 se registraron con una concentración para la molécula de referencia de 50 µM.

Experimentos de Valoración y Rastreo

Después de la selección de las moléculas de referencia y control, se registraron experimentos de valoración como una función de la proteína como se muestra en las Figuras 6 y 7. La proporción de intensidad de las dos señales de flúor está representada como una función de la fracción de molécula de referencia unida a la proteína como se muestra en el ejemplo de la Figura 8. La fracción de compuesto unido se calcula usando la constante de unión de disociación obtenida de otras técnicas (por ejemplo, ITC o espectroscopía de fluorescencia) como se describe en (C. Dalvit y col., J. Am. Chem. Soc, 124, 7702-7709 (2002); y C. Dalvit y col., Comb. Chem. HTS, 5, 645-650 (2002)). Estas técnicas también proporcionan la cantidad de sitios de unión (n) para la molécula de referencia, un parámetro que es muy importante para los experimentos de unión competitiva. Las mediciones de ITC proporcionan un valor n que es cercano a 4 para (1) y cercano a 1 para (3). Por lo tanto, aunque la molécula (1) aún puede usarse para propósitos de rastreo con algunas limitaciones en la interpretación de los resultados experimentales, no puede usarse para obtener las constantes de unión de los aciertos de RMN. La molécula (3) representa una molécula de referencia adecuada debido a la presencia de solamente un sitio de unión en HSA a la concentración usada en estos experimentos. De acuerdo con su estructura química, un análogo de aspirina, su sitio de unión putativo sería el sitio Sudlow I (localizado en el subdominio IIA) (T. Peters, Jr., All about Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications Academic Press, San Diego, U.S.A. 1996). Se extraen dos valores diferentes para la fracción de molécula de referencia unida a proteína (3) en la Figura 8 usando los dos valores límite de K_D determinados por el error experimental. En este caso específico, la K_D derivada de ITC para (3) era 41 ± 3,3 µM y por tanto los dos valores límite de K_D corresponden a 37,7 y 44,3 µM, respectivamente.

Debe indicarse que los experimentos de RMN también podrían registrarse en presencia de solamente la molécula de referencia (C. Dalvit y col., Comb. Chem. HTS, 5, 605-611 (2002) y anteriormente en el Ejemplo (I)). En este caso, sin embargo, tienen que registrarse dos experimentos: uno si la secuencia CPMG (es decir 2nτ = 0) y otro con un CPMG con un largo 2nτ. La proporción de la intensidad de señal extraída de estos dos espectros después se representa como una función de la fracción de molécula de referencia unida.

Los gráficos de la Figura 8 después se usan para establecer las condiciones experimentales necesarias para el rastreo. La Figura 9 muestra el procedimiento de rastreo realizado frente a HSA con (3) como molécula de referencia. Para el rastreo, se seleccionó un periodo espín-eco total (2nτ) para el que la señal de la molécula de referencia es aproxima a cero. La presencia en la mezcla de 5-CH₃ D,LTrp y sacarosa (3^{eros} espectros desde la izquierda), conocidos como agentes no de unión, no alteran el espectro de la molécula informadora. En contraste, la presencia en la mezcla del derivado de warfarina 4-hidroxi-3-[1-(p-yodofenil)-3-oxobutil]cumarina (4) (derecha) provoca la reaparición de la señal de (3). Esto está provocado, de acuerdo con los gráficos de la Figura 8, por el desplazamiento del compuesto

de referencia de la proteína. El grado de desplazamiento después puede usarse para calcular la constante de unión del acierto de RMN (C. Dalvit y col., J. Am. Chem. Soc, 124, 7702-7709 (2002); y C. Dalvit y col., Comb. Chem. HTS, 5, 645-650 (2002)) como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Constante de unión obtenida por RMN de un único punto para (4) y su comparación con el valor de fluorescencia medido

I(3)/I(2)	K _D	[I]	[L _{TOT}]	[E _{TOT}]	[EL]/[L _{TOT}]	[EL]	K _D ^{app}	K _I ^{RMN}	K _I ^{fluo}
0,698	44,3	25	50	0,6	0,00159	0,080	326,8	3,9	3,3 +/- 0,3
0,698	37,7	25	50	0,6	0,00171	0,086	300,4	3,6	

Todos los valores para la concentración y las constantes de unión se expresan en μM . K_D es la constante de unión de (3) obtenida de ITC y K_I^{fluo} es la constante de unión para (4) obtenida de fluorescencia. [I], [L_{TOT}] y [E_{TOT}] son la concentración de (4), (3) y HSA, respectivamente. La K_I^{RMN} es la constante de unión para (4) obtenida de las mediciones de RMN.

Para obtener un valor fiable para la constante de unión, también se tiene que registrar el espectro de protones. Esto es necesario para calcular la concentración del acierto de RMN por simple comparación de la integral de una señal de la molécula de referencia para la que se conoce la concentración con la integral de una señal del acierto de RMN. La K_D obtenida de RMN para (4) se compara de forma favorable con el valor obtenido de una medición de fluorescencia de valoración completa. Desde su primera aplicación (C. Dalvit y col., J. Am. Chem. Soc, 124, 7702-7709 (2002); y C. Dalvit y col., Comb. Chem. HTS, 5, 645-650 (2002)) las constantes de unión se han calculado usando este enfoque para varios cientos de compuestos. Para un mecanismo de unión competitiva puro y un único sitio de unión, se observó una excelente concordancia entre las constantes de unión obtenidas por RMN de un único punto y las constantes de unión obtenidas por fluorescencia de valoración completa e ITC. Este enfoque de RMN también permite la determinación de constantes de unión de alta afinidad que no se obtendrían fácilmente con otros procedimientos de RMN.

Límite de Detección

Debido a la gran CSA y la gran contribución de intercambio para una molécula de referencia de afinidad débil, es posible reducir significativamente la concentración de proteína necesaria para el rastreo. Esto puede apreciarse en la Figura 10 donde el rastreo se realiza con (3) en presencia de HSA a una concentración de solamente 150 nM. A pesar de la gran proporción [L_{TOT}]/[E_{TOT}] (=330) y la pequeña proporción [EL]/[L_{TOT}] (=0,00165 usando la K_D de 41 μM) es posible observar el efecto de la pequeña fracción de ligando unido y realizar el rastreo a dicha baja concentración de proteína. Esto probablemente representa un caso afortunado. De acuerdo con el trabajo de RMN en estado sólido, la presencia de un grupo OH en la posición orto del átomo de flúor es responsable de un desplazamiento de 50 ppm en el componente del tensor de desplazamiento químico de ¹⁹F perpendicular al anillo aromático que provoca una gran CSA de ¹⁹F (H. Raber y col., Chem. Phys., 26, 123-130 (1977)). Sin embargo, se observó un comportamiento similar con otras proteínas y con moléculas de referencia que contienen un resto para-fluoro bencilo (datos no mostrados). Por lo tanto, es probable que el término de intercambio también contribuya significativamente a la relajación transversal observada. Los espectros presentados en la Figura 10 se registraron con 128 exploraciones y un tiempo de medición total de 10 minutos. El uso de tecnología de criosonda optimizada para la detección de ¹⁹F podría mejorar adicionalmente los límites de detección. Entonces podrían usarse concentraciones de proteína tan bajas como 50 a 100 nM. Esto permitirá el rastreo de una gran cantidad de mezclas químicas frente a proteínas que no pueden expresarse en gran cantidad (por ejemplo, proteínas de membrana). Los espectros de flúor pueden registrarse muy rápidamente con tecnología de criosonda. Una estimación conservativa de una mejora de sensibilidad de factor dos con la tecnología de criosonda se traduciría en una reducción de factor cuatro en el tiempo de obtención. Por lo tanto, los espectros de la Figura 10 podrían haberse registrado en solamente 150 s, potenciando de este modo el rendimiento de este procedimiento de rastreo. Debe indicarse que los problemas de amortiguación de radiación encontrados en los experimentos de detección de protones registrados con criosondas están ausentes en los experimentos de detección de flúor a causa de la baja concentración de las moléculas informadora y de control.

Rastreo en presencia de disolventes protonados y detergentes.

Una ventaja particular de los experimentos de unión competitiva basados en ligando de ¹⁹F es la posibilidad de realizar el rastreo incluso en presencia de disolventes protonados, tampones, o detergentes. El espectro de protones de HSA en presencia de HEPES 100 mM y glicerol al 1% se muestra en la Figura 11. Las señales intensas del tampón y el glicerol enmascaran la observación de las señales débiles de las moléculas de referencia y de control necesarias para realizar el rastreo. Estos problemas no se encuentran en los experimentos de detección de ¹⁹F. Por lo tanto, es posible realizar el rastreo como se muestra en la Figura 11 incluso en estas difíciles condiciones experimentales. A causa de estas propiedades, los experimentos de rastreo de unión competitiva basados en ligando de flúor son particularmente

5 ventajosos para el rastreo de moléculas frente a proteínas de membrana disueltas en SDS u otros detergentes. Una vez se ha identificado una molécula de referencia adecuada, el rastreo de RMN de unión competitiva basada en ligando de ^{19}F proporcionará aciertos fiables. Las moléculas que simplemente se unen a las membranas y los detergentes y que aparecen como ligandos potenciales en diferentes ensayos, no se detectará en los experimentos de ^{19}F descritos en este documento. Solamente se identifican las moléculas que compiten con la molécula de referencia. Finalmente, los experimentos también pueden usarse para rastrear extractos vegetales y fúngicos, y para rastrear moléculas dentro de células vivas.

Conclusión

10 Por tanto, el uso de un ligando de afinidad débil que contiene un átomo de ^{19}F en combinación con los experimentos de unión competitiva permite el rápido rastreo de grandes mezclas químicas frente a proteínas, fragmentos de ADN o ARN. Además, el procedimiento proporciona una determinación directa de la constante de unión de los aciertos de RMN identificados. Con los experimentos de HTS de unión competitiva de ^{19}F no hay problemas de solapamiento y, a causa de la elevada sensibilidad del núcleo ^{19}F (0,83 veces la sensibilidad de ^1H), es posible rastrear rápidamente grandes bibliotecas químicas o extractos de productos naturales. Además, los experimentos pueden realizarse para soluciones de proteínas en presencia de elevadas concentraciones de detergentes no deuterados permitiendo de este modo la HTS con proteínas de membrana. Además, como no se utilizan resonancias de las moléculas reales rastreadas, solamente las moléculas informadora y de control tienen que contener un resto fluoro. Por tanto, el rastreo competitivo basado en flúor debe encontrar numerosos usos en la industria farmacéutica, y debe extender adicionalmente el impacto de el rastreo basado en RMN sobre el procedimiento de descubrimiento de fármacos.

25 El procedimiento es rápido y requiere solamente una cantidad limitada de proteína y por lo tanto se compara de forma favorable con las otras técnicas no RMN establecidas usadas en rastreo de alto rendimiento. Además, el procedimiento proporciona dentro de un único experimento un valor significativo para la constante de unión del acierto de RMN. La ausencia de solapamiento permite rastrear grandes mezclas químicas originadas por química combinatoria, química medicinal o extracción de productos naturales. El rastreo frente a proteínas de membrana disueltas en diferentes detergentes también es posible con este enfoque. Finalmente, se visualiza que estos experimentos pueden extenderse al rastreo de moléculas frente a un receptor localizado dentro de células vivas. Diversas modificaciones y alteraciones a la invención llegarán a ser evidentes para los especialistas en la técnica sin alejarse del alcance y espíritu de esta invención. Debe entenderse que esta invención no pretende estar limitada indebidamente por las realizaciones ilustrativas y ejemplos expuestos en este documento. Dichos ejemplos y realizaciones se presentan a modo de ejemplo solamente, pretendiendo que el alcance de la invención esté limitado únicamente por las reivindicaciones expuestas en este documento a continuación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un ligando para una molécula diana, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar un compuesto de referencia marcado con ^{19}F que interacciona con la molécula diana;

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana;

proporcionar una muestra de ensayo que comprende al menos un compuesto de ensayo;

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana;

comparar el espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana con el espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana para determinar un cambio en uno o más de las resonancias del compuesto de referencia marcado con ^{19}F ; e

identificar al menos un compuesto de ensayo que interaccione con la molécula diana, en el que el compuesto de ensayo desplaza el compuesto de referencia marcado con ^{19}F .

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de ensayo tiene una afinidad de unión al menos tan fuerte como la del compuesto de referencia.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que un cambio en una o más de las resonancias del compuesto de referencia comprende un aumento en la intensidad de señal en al menos una resonancia de referencia.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la identificación de al menos un compuesto de ensayo comprende registrar diferentes espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno del compuesto de ensayo y la molécula diana.

5. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente:

recoger espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia en presencia de la molécula diana a diferentes concentraciones del compuesto de referencia marcado con ^{19}F ; y

determinar la constante de disociación del compuesto de ensayo.

6. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente:

recoger espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana a diferentes concentraciones de la molécula diana; y

determinar la constante de disociación del compuesto de ensayo.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que antes de la recogida de un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana para su uso en la etapa de comparación, el procedimiento comprende:

recoger espectros de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana a diferentes concentraciones de la molécula diana o a diferentes concentraciones del compuesto de referencia marcado con ^{19}F ; y

determinar las condiciones experimentales óptimas para identificar al menos un compuesto de ensayo que interaccione con la molécula diana.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula diana es una macromolécula.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la macromolécula es un polipéptido o polinucleótido.

10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la macromolécula es una proteína.

ES 2 345 331 T3

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de referencia se une a la molécula diana con una afinidad de unión en el intervalo micromolar.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la afinidad de unión del compuesto de referencia se determina por calorimetría de valoración isotérmica o espectroscopía de fluorescencia.

13. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una etapa para identificar el compuesto de referencia que comprende:

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY de un compuesto de referencia potencial en ausencia de la molécula diana;

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY del compuesto de referencia potencial en presencia de la molécula diana; y

comparar los espectros WaterLOGSY para identificar si el compuesto de referencia potencial interacciona con la molécula diana.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo comprende una mezcla de dos o más compuestos de ensayo.

15. El procedimiento de la reivindicación 14 que comprende adicionalmente:

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno del compuesto de ensayo y la molécula diana; y

comparar el espectro del compuesto de referencia en presencia de la molécula diana con el espectro del compuesto de referencia en presencia de cada uno del compuesto de ensayo y la molécula diana para determinar un cambio en la resonancia del compuesto de referencia marcado con ^{19}F seleccionado.

16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto de ensayo tiene una afinidad de unión más fuerte que la del compuesto de referencia.

17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:

proporcionar un compuesto de referencia marcado con ^{19}F comprende proporcionar un compuesto de referencia marcado con ^{19}F y una señal ERETIC con anchura de línea, amplitud, y frecuencia definidas;

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana comprende recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F con la señal ERETIC en presencia de la molécula diana; y

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana comprende recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F con la señal ERETIC en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana.

18. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:

proporcionar un compuesto de referencia marcado con ^{19}F comprende proporcionar un compuesto de referencia marcado con ^{19}F y un compuesto no de interacción marcado con ^{19}F ;

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana comprende recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{15}F y el compuesto no de interacción marcado con ^{19}F en presencia de la molécula diana; y

recoger un espectro de resonancia magnética nuclear de ^{19}F 1D del compuesto de referencia marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana comprende recoger un espectro del compuesto de referencia marcado con ^{19}F y el compuesto no de interacción marcado con ^{19}F en presencia de cada uno de la muestra de ensayo y la molécula diana.

19. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que proporcionar una muestra de ensayo comprende proporcionar una pluralidad de muestras de ensayo, comprendiendo cada muestra de ensayo al menos un compuesto de ensayo.

Fig. 1

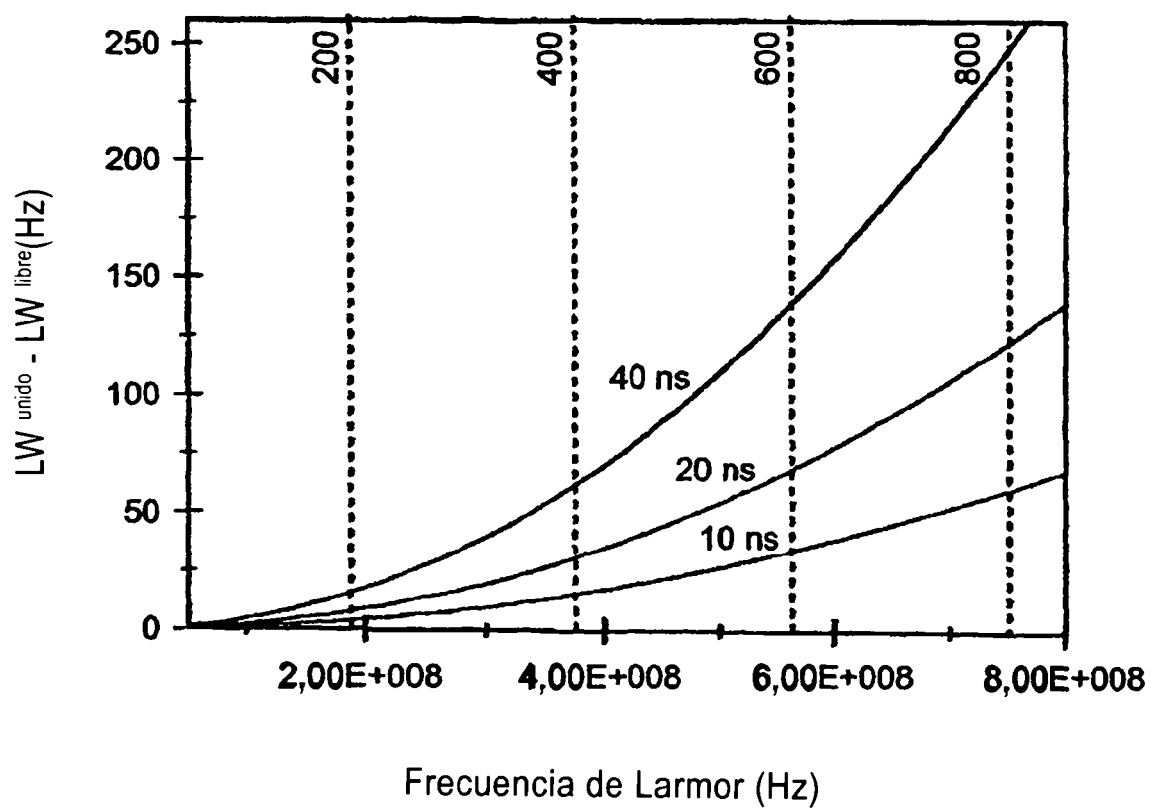


Fig. 2

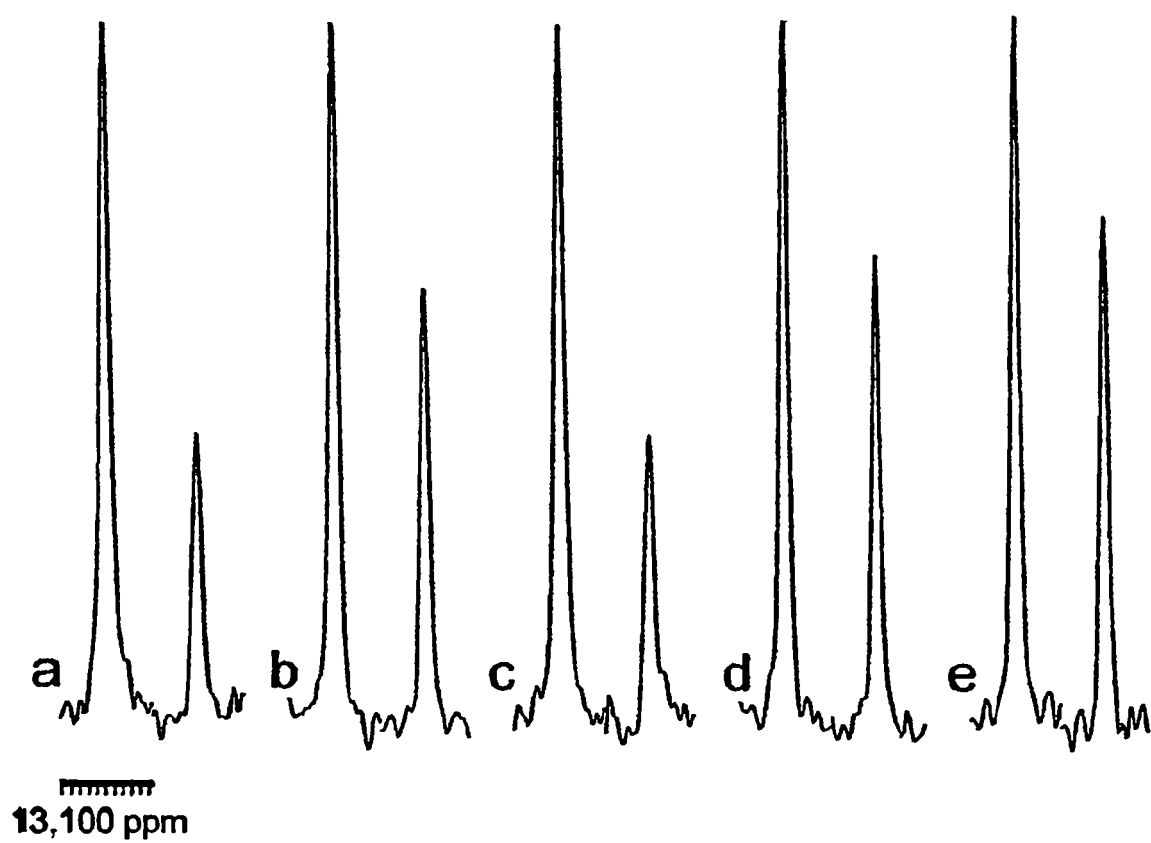


Fig. 3

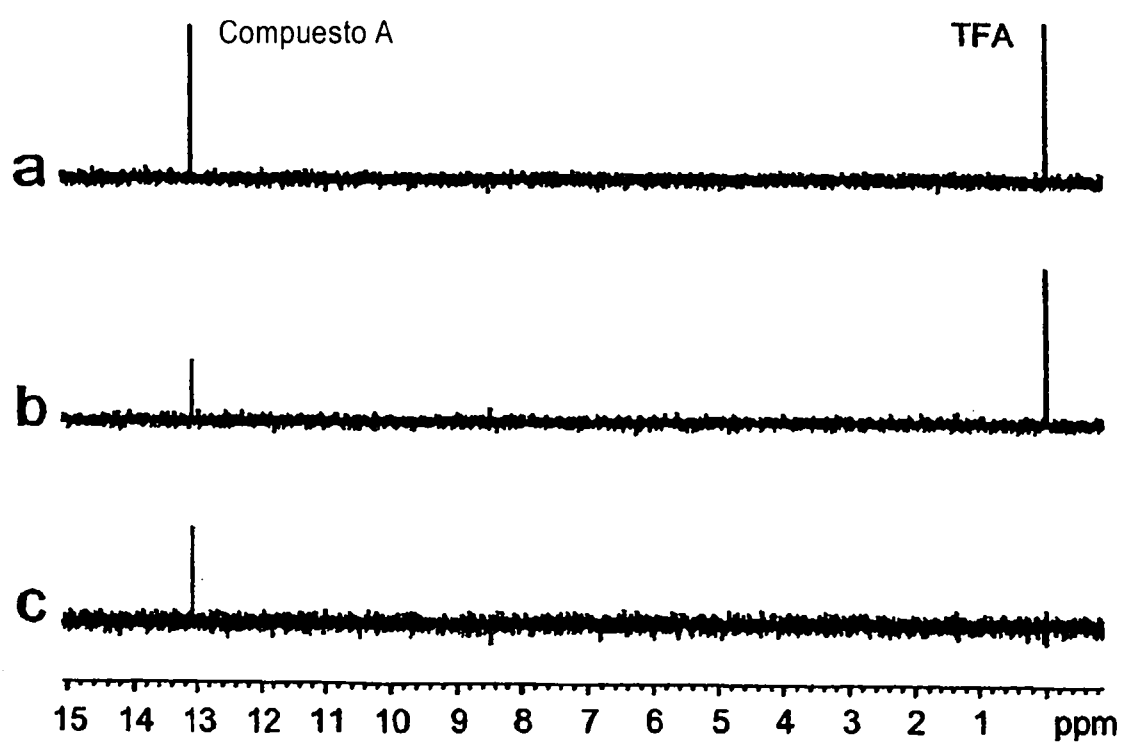


Fig. 4

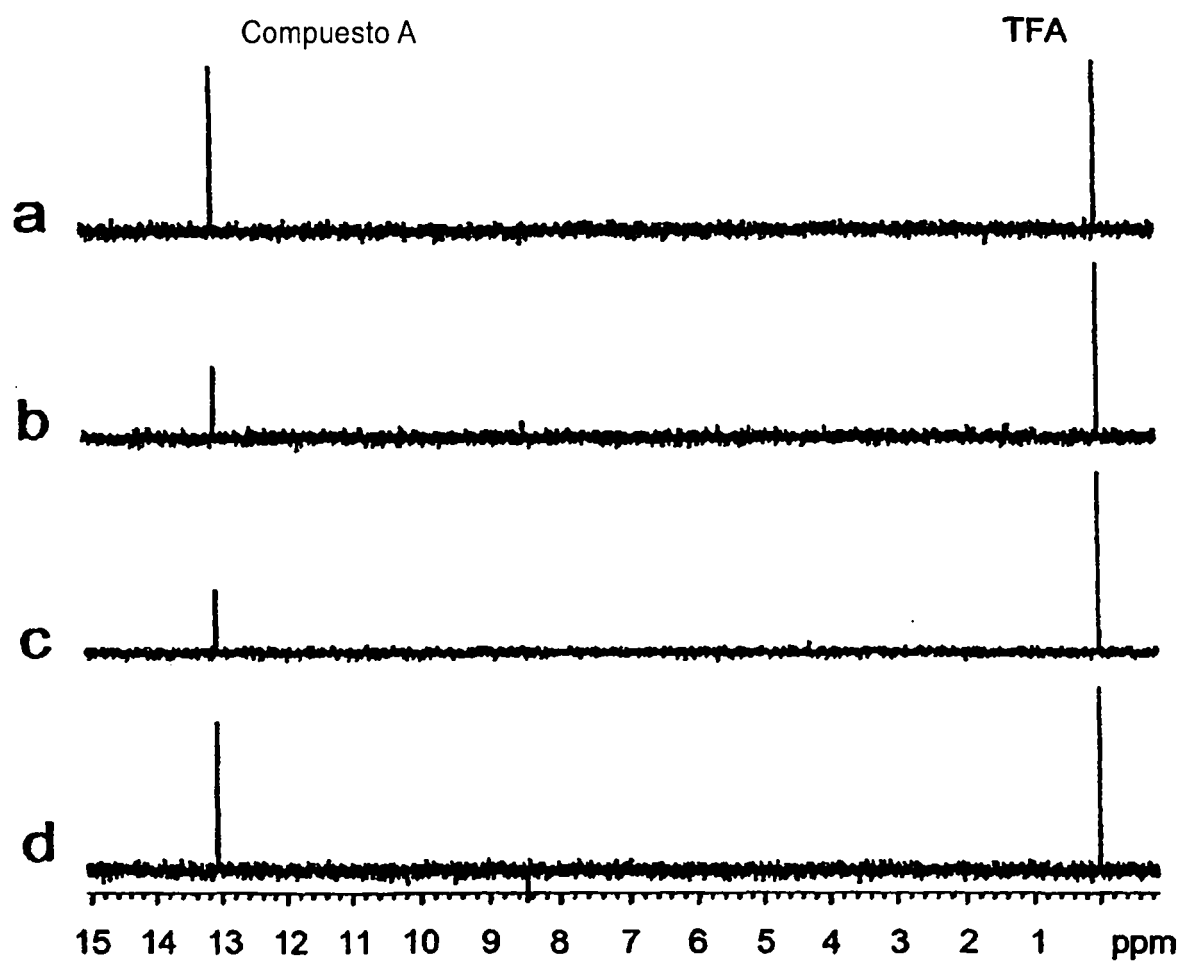


Fig. 5

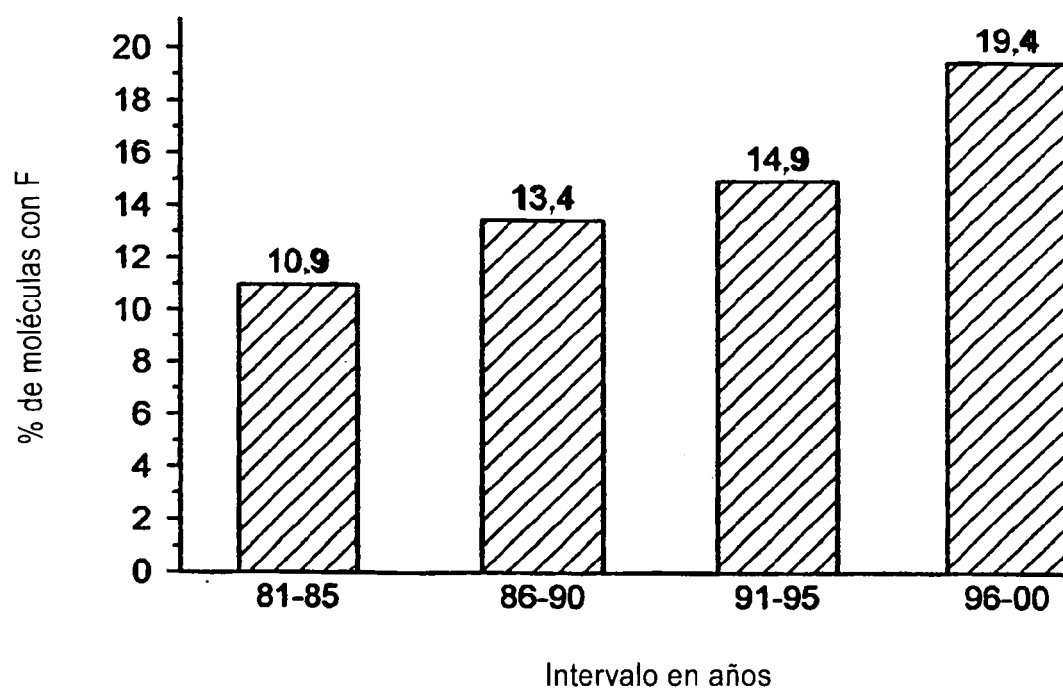


Fig. 6

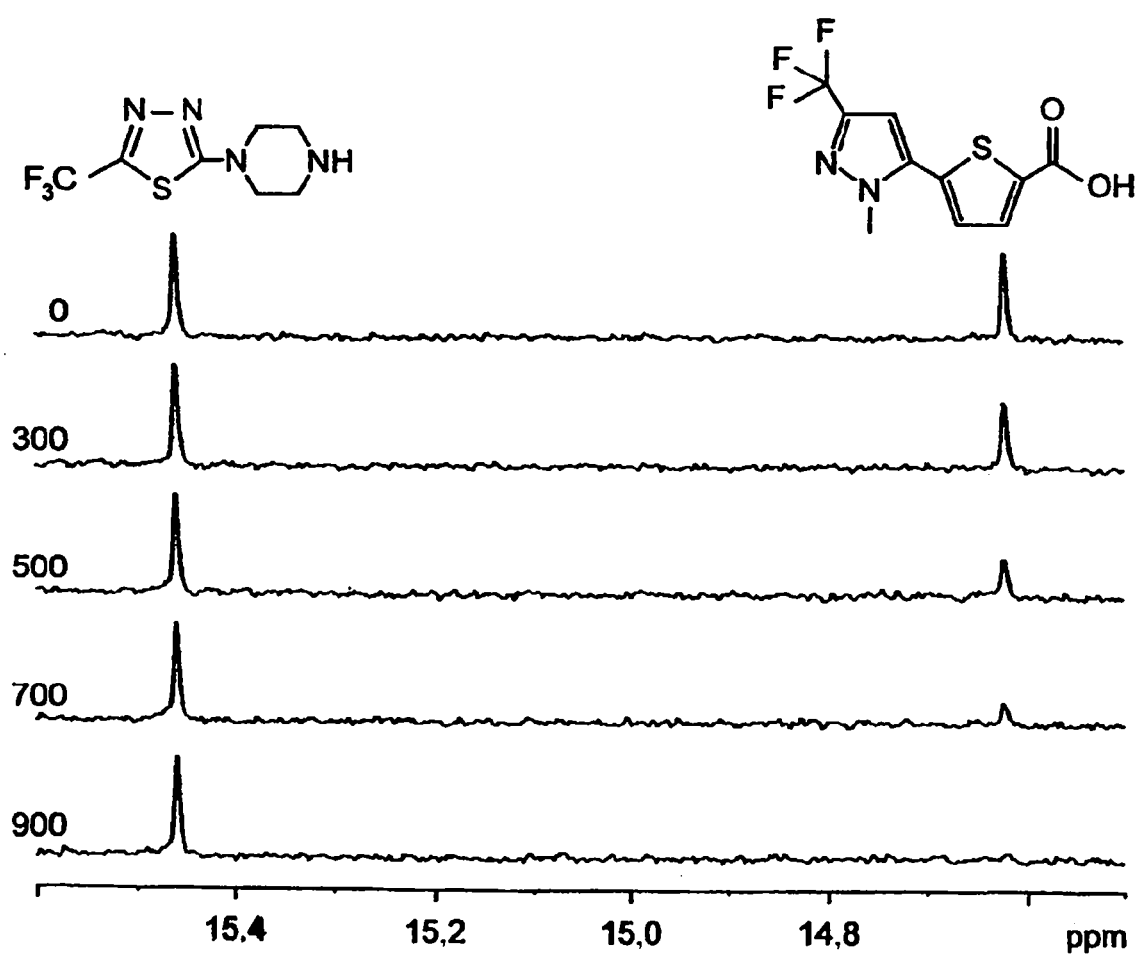


Fig. 7

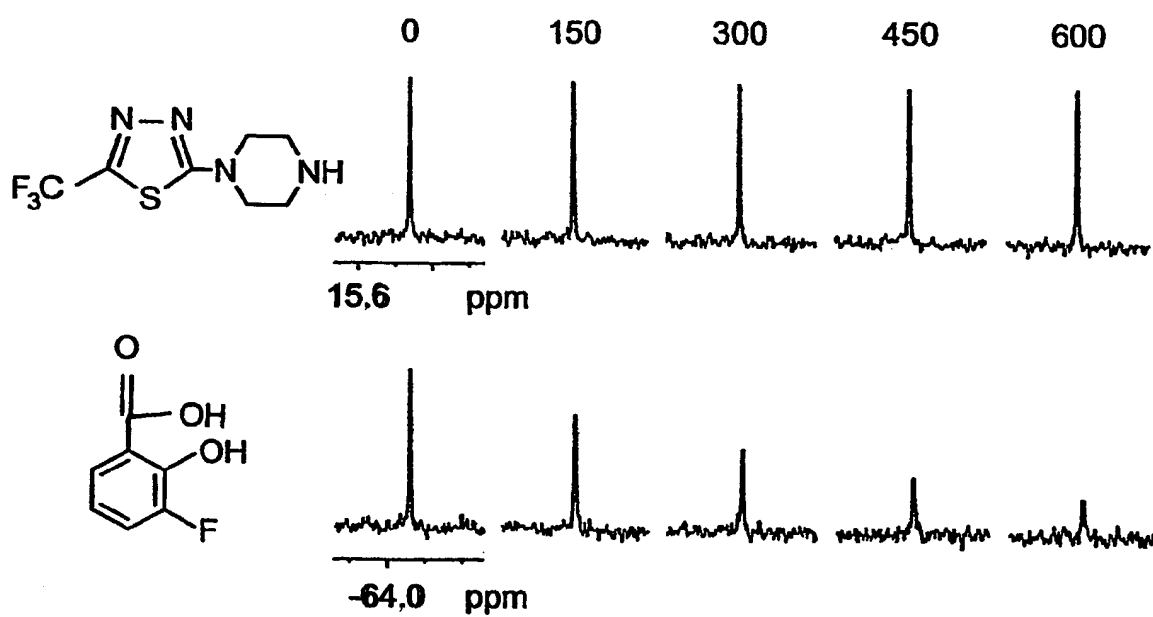


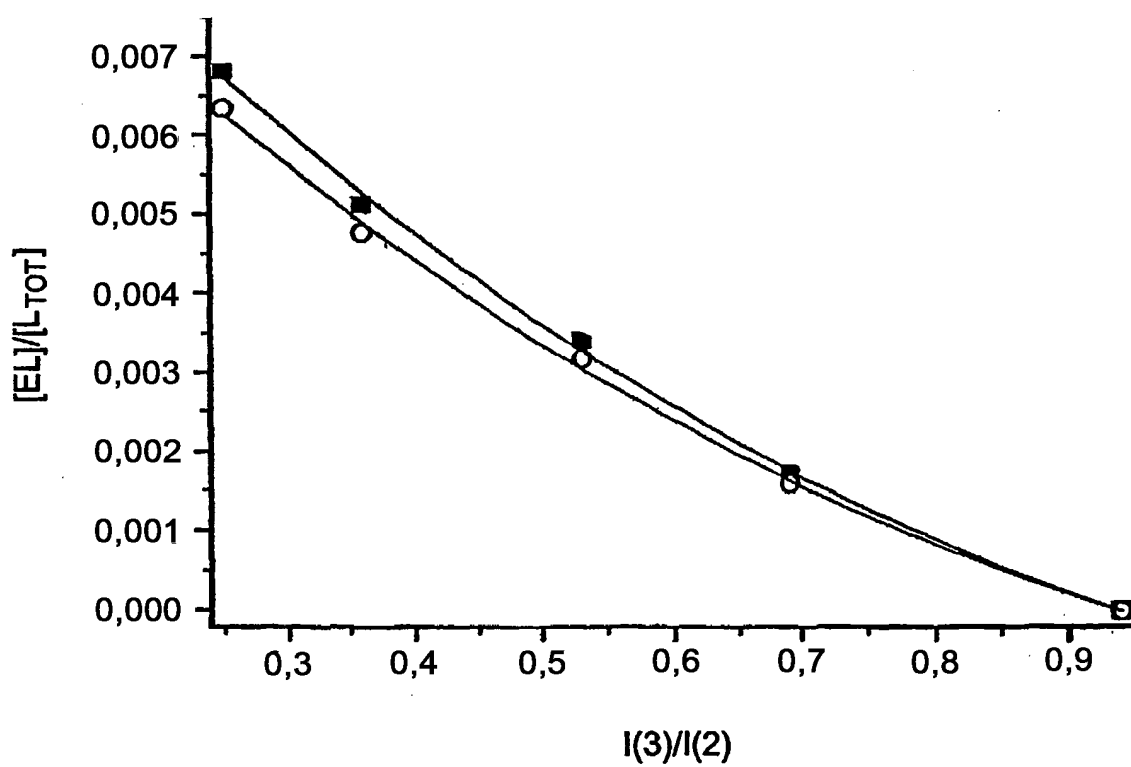
Fig. 8

Fig. 9

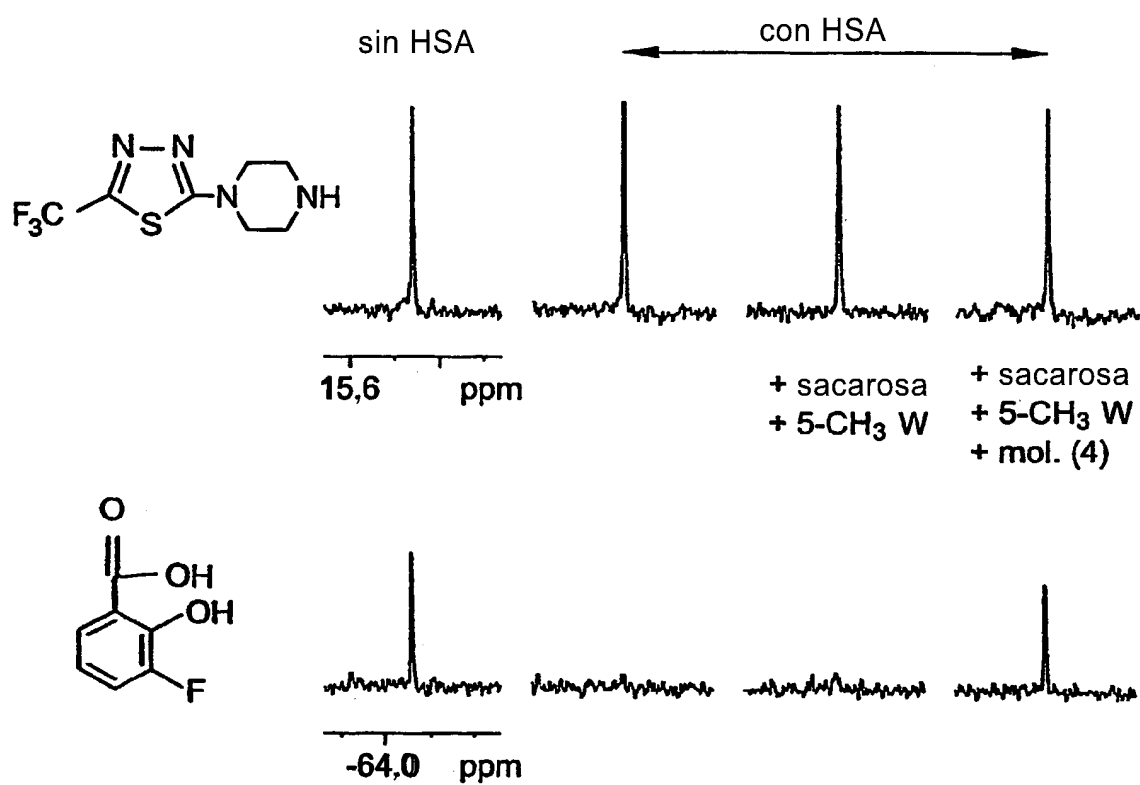


Fig. 10

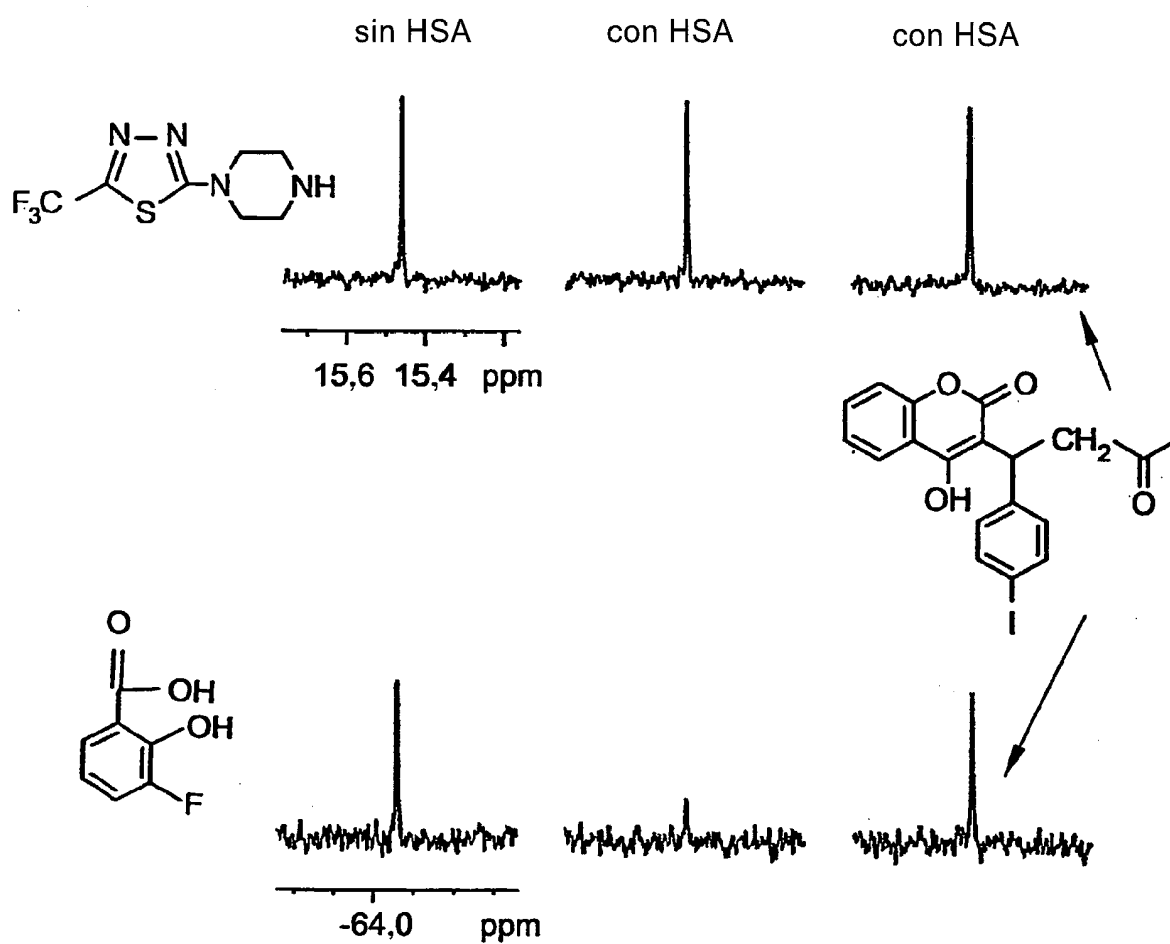


Fig. 11

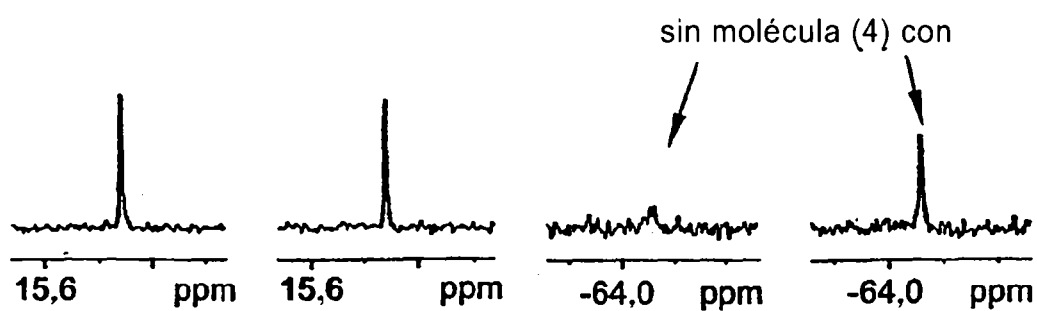
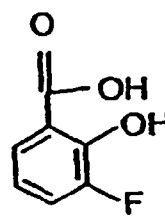
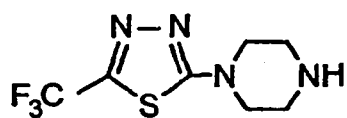
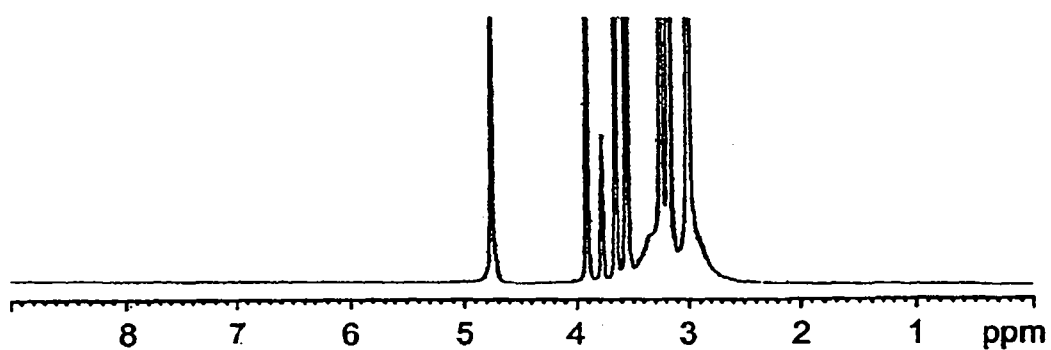
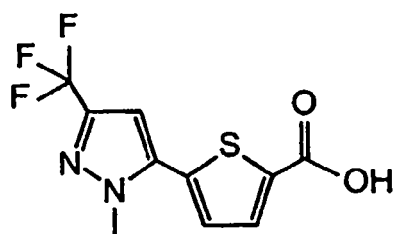
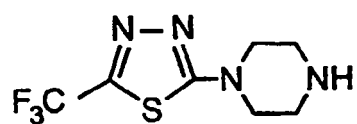


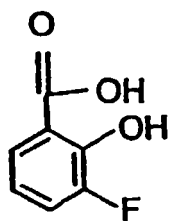
Fig. 12



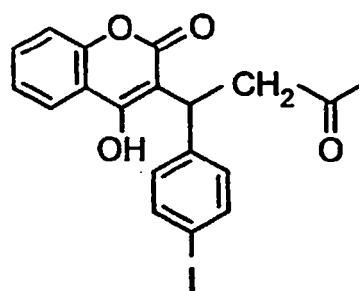
(1)



(2)



(3)



(4)