



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 076**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06750810 .1**

96 Fecha de presentación : **20.04.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1874953**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Métodos para la determinación de la actividad fosforiltransferasa empleando adenosina 5'-trifosfato (ATP) - γ -S.**

30 Prioridad: **20.04.2005 US 110435**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **BOEHRINGER INGELHEIM
INTERNATIONAL GmbH
Binger Strasse 173
D-55216 Ingelheim, DE**

72 Inventor/es: **Yingling, Jeffrey David;
Jakes, Scott y
Terenzio, Donna**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 316 076 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

Métodos para la determinación de la actividad fosforiltransferasa empleando adenosina 5'-trifosfato (ATP)- γ -S.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general a nuevos métodos de ensayo de screening que pueden aplicarse a miembros extensos de la familia del gen de la proteína quinasa, y son útiles para la detección y evaluación de los inhibidores de la quinasa.

10 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas quinasas juegan un papel crítico en la regulación de virtualmente todos los aspectos de la regulación celular y componen una de las áreas más activas de investigación en la industria farmacéutica hoy en día. Los 522 dominios de la proteína quinasa en el genoma humano pueden proporcionar enormes oportunidades para el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades no tratadas, y el desarrollo de los inhibidores de la proteína quinasa se ha convertido de forma creciente en un foco principal de la industria farmacéutica. Se ha informado que los inhibidores de la proteína quinasa son útiles en el tratamiento de numerosas enfermedades incluyendo el cáncer, enfermedades inflamatorias e inmunológicas. Ver por ejemplo I.K. Mellinghoff y C.L. Sawyers, Kinase Inhibitor Therapy in Cancer (“Inhibidores de la quinasa en la terapia del cáncer”), 14 (12): 1-11, 2000; J. Dumas, Growth factor receptor kinase inhibitors: recent progress and clinical impact, Current Opinion in Drug Discovery & Development (“Inhibidores de la quinasa del receptor del factor de crecimiento: recientes progresos e impacto clínico, opinión actual en el descubrimiento de fármacos & desarrollo”), 4(4): 378-89, 2001; J. Dumas, Protein kinase inhibitors: emerging pharmacophores (“inhibidores de la proteína quinasa: fármacos emergentes”), 1997-2000, Expert Opinion on Therapeutic Patents (“Opinión de expertos sobre las patentes terapéuticas”), 11 (3): 405-429 2001; D.H. Williams y T. Mitchell, Latest developments in crystallography and structure-based design of protein kinase inhibitors as drug candidates, Current Opinion in Pharmacology (“Últimos desarrollos en cristalografía y diseño basado en la estructura de los inhibidores de la proteína quinasa como candidatos a fármacos, opinión actual en farmacología”), 2 (5): 567-73, 2002; S.B. Noonberg y C.C. Benz, Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents (“Inhibidores de la tirosina quinasa dirigidos a la subfamilia de receptores del factor de crecimiento epidérmico: papel como agentes anticancerosos”), *Fármacos*, 59 (4): 753-67, 2000; S. Brunelleschi, L. Penengo, M.M. Santoro y G. Gaudino, Receptor tyrosine kinases as target for anti-cancer therapy, Current Pharmaceutical Design (“Tirosina quinasas receptor como diana para la terapia anticancerosa, diseño farmacéutico actual”), 8 (22): 1959-72, 2002; P.G. Goekjian y M.R. Jirousek, Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development, Current Medicinal Chemistry (“Proteína quinasa C en el tratamiento de la enfermedad: rutas de transducción de la señal, inhibidores, y agentes en el desarrollo, Química médica actual”), 6 (9): 877-903, 1999; A. Gordon, The increasing efficacy of breast cancer treatment, Clinical Oncology (Royal College of Radiologists) (“Creciente eficacia del tratamiento del cáncer de pecho, Oncología clínica (Real colegio de radiólogos)”), 9 (5): 338-42, 1997.

Aunque esta gran familia génica representa una rica fuente de nuevos fármacos diana, los ensayos de desarrollo empleados para determinar la afinidad de un compuesto, pueden ser altamente problemáticos. Ensayos actuales de screening de alto rendimiento para los inhibidores de la proteína quinasa, miden la incorporación de fosfato dentro de una proteína o un sustrato de péptido. El método más establecido para el ensayo de los inhibidores de proteína quinasa es un ensayo radiométrico en el cual el gamma fosfato de ATP se marca o bien con P³² ó bien con P³³. Cuando la quinasa transfiere el gamma fosfato al hidroxilo del sustrato de proteína durante la reacción de la fosforiltransferasa, la proteína se convierte en proteína covalentemente marcada con el isótopo. La proteína se elimina del ATP marcado y se determina la cantidad de proteína radiactiva. Este ensayo es todavía el estándar de oro para los ensayos cuantitativos de la proteína quinasa. La adaptación de este ensayo dentro de un formato de alto rendimiento es problemático debido a los pasos de separación intensivos de laboratorio, y a las grandes cantidades de radiactividad que se emplean.

Un ensayo radiométrico alternativo que es capaz de un alto rendimiento, es el SPA ó ensayo de centelleo de proximidad (Amersham International). En este ensayo de centelleo las perlas impregnadas emiten luz cuando el sustrato marcado se une a las perlas. Este ensayo está limitado por el nivel de radiactividad y la eficiencia del sustrato de péptido.

Las técnicas empleando la polarización de fluorescencia para medir o bien la actividad de la proteína quinasa o bien la unión al inhibidor, se basan en un anticuerpo marcado o un sustrato de péptido marcado. En estos ensayos la enzima transfiere el gamma fosfato del ATP a un sustrato de proteína o de péptido. Esta actividad se monitoriza detectando el fosfopéptido mediante dichos medios como un anticuerpo. La unión del anticuerpo con el fosfopéptido reducirá la libre rotación del péptido en la solución, y por lo tanto puede detectarse una señal de polarización a partir del producto de la reacción catalítica. Los ejemplos incluyen Burke *et al.*, US 2001/0004522 A1 ó T.C. Turek *et al.*, Analytical Biochemistry (“Bioquímica analítica”), 299 (1), 25-53, 2001.

Muchos de los ensayos no radiactivos mencionados más arriba emplean anticuerpos que reconocen el producto de la reacción de la quinasa, es decir un fosfopéptido. Los ensayos de unión emplean anticuerpos detectados con una lectura luminiscente catalizada por enzimas. Estos métodos están limitados por la disponibilidad del reactivo, un buen recubrimiento, y múltiples pasos de lavado de la incubación. Sin embargo, lo más importante es que las técnicas

basadas en un anticuerpo para las serina/treonina quinasas necesitan un anticuerpo especializado para cada sustrato de quinasa. Esto requiere que el sitio de fosforilación sea conocido, y que pueda generarse un anticuerpo para este sitio. Esto aumenta el tiempo, el riesgo y los costes de realización del ensayo. Adicionalmente, sólo puede medirse un sitio de fosforilación sobre una proteína, mientras que en la práctica, múltiples sitios sobre las proteínas diana pueden fosforilarse mediante una única quinasa.

Otro método de ensayo no radiactivo emplea la actividad dependiente del ATP de la luciferasa de luciérnaga comercialmente adquirible. Por ejemplo, la patente U.S. 6.599.711 describe un método para medir la actividad de la proteína quinasa empleando la bioluminiscencia para medir el cambio en la concentración del ATP después de la fosforilación de un sustrato de proteína quinasa en presencia de la proteína quinasa y el ATP. La cantidad de luz emitida por la luciferasa es directamente proporcional al ATP residual después de la reacción de la quinasa. Una gran ventaja de este método es que no necesita reactivos de detección especializados para cada quinasa, lo cual permite que los paneles de screening se ajusten a un único formato común.

La patente EP-A2- 1 233 060 y CHEN G *ET AL.*: “Kinetic mechanism of the p38-alfa MAP kinase: phosphoryl transfer to synthetic peptides” (“Mecanismo cinético de la p38-alfa MAP quinasa: transferencia del fosforilo a los péptidos sintéticos”). *BIOCHEMISTRY* (“Bioquímica”). 29 FEB 2000, vol. 39, n° 8, 29 de Febrero de 2000, páginas 2079-2087, describe el empleo de ATP- γ -S.

Es sabido a partir de CHEN G *ET AL.*, de más arriba, y de WARD N E *ET AL.*: “The intrinsic ATPase activity of protein kinase C is catalyzed at the active site of the enzyme” (“La actividad intrínseca ATPasa de la proteína quinasa C está catalizada en el sitio activo de la enzima”) *BIOCHEMISTRY* (“Bioquímica”) 30 JUN 1992, vol. 31, n° 25, 30 de Junio de 1992, páginas 5905-5911, que la mayor parte de las quinasas tienen también actividad ATPasa.

Es sabido, a partir de DIPOLO R. *ET AL.*: “In squid axons, ATP modulates Na⁺-Ca²⁺ exchange by a Ca²⁺I-dependent phosphorylation” (“En los axones del calamar, el ATP modula el intercambio Na⁺-Ca²⁺ mediante una fosforilación dependiente de Ca²⁺I”). *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA*. 12 MAR 1987 (“Actas de bioquímica y biofísica. 12 de Marzo 1987”), vol. 897, n° 3, 12 de Marzo de 1987, páginas 347-354, que el ATP- γ -S es un análogo de ATP que puede actuar como un sustrato para las quinasas pero no para las ATPasas.

Nosotros, y otros, hemos mostrado que muchas proteína quinasas presentan una hidrólisis de ATP en ausencia de un sustrato aceptor de proteína (“New Tools for Screening Kinases: A Comparative Study” (“Nuevas herramientas para el screening de quinasas: un estudio comparativo”), The Society for Biomolecular Screening (“Sociedad para el screening biomolecular”), 9ª Conferencia Anual, 2003, Portland, Oregon, Sept. 21-25, 2003, Kashem, M.A, Yingling, J., Nelson, R.M. y Homon, C.A.). En este caso, el agua actúa como aceptor terminal del fosfato, más bien que el hidroxilo de un aminoácido que es tradicionalmente el caso en una reacción de la fosfotransferasa. Esta actividad ATPasa recibe el nombre de “ATPasa intrínseca”. Los formatos de ensayo basados sobre una supresión del ATP medirán la actividad fosfotransferasa tanto para la proteína como para el agua. Es un inconveniente para el método que las ATPasas no quinasas que pueden ser presentadas como contaminantes para la preparación de la enzima, mostrarán también actividad la cual podría asignarse equivocadamente a la proteína quinasa. Otra potencial complicación es que muchas proteína quinasas se ensayan como cascadas enzimáticas en donde una quinasa corriente arriba fosforila y activa una quinasa corriente abajo. En una reacción enzimática en la cual están presentes múltiples proteína quinasas, el consumo total de ATP es la suma de la actividad de la quinasa de interés y de la quinasa sustrato. La inhibición específica de la quinasa corriente arriba está probablemente oscurecida por la actividad de la quinasa sustrato con lo cual resultan compuestos equivocados que son activos contra la quinasa que interesa. Además si una quinasa presentara una actividad ATPasa intrínseca igual o mayor que su actividad fosforiltransferasa dependiente del sustrato, la identificación de los inhibidores que no compiten con la unión ATP no sería posible. Se ha publicado muy poco acerca de la actividad ATPasa de las proteína quinasas. En cualquier caso, no se ha considerado nunca un “problema” que cualquiera haya probado de solucionar la cuantificación del ATP para determinar la actividad de la quinasa.

Resumen de la invención

Esta invención describe métodos que miden específicamente la transferencia del fosforilo inducida por la quinasa, del gamma-fosfato de un análogo no hidrolizable de ATP, ATP- γ -S. Estos métodos eliminan efectivamente cualquier interferencia que resulte de cantidades de trazas de ATPasas contaminantes. Adicionalmente, estos métodos pueden proporcionar una reacción de la quinasa completamente dependiente del sustrato, incluso cuando la quinasa presenta una actividad ATPasa intrínseca.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la determinación de la K_m (ATP- γ -S) para la luciferasa. Se añadió ATP- γ -S (23 concentraciones mayores que el margen de 1 mM a 238 pM), a la GloTM quinasa. Se cuantificaron los datos empleando la modalidad de luminiscencia de un analizador LJL después de 15 minutos de incubación. RLU es la unidad relativa de luz, + es el valor observado, - es el valor predeterminado.

La figura 2 ilustra la observación inicial del consumo de ATP mediante MKK3 en ausencia de p38, el sustrato aceptor. La MKK3 (10 nM) se añadió al ATP (300 nM) durante las veces indicadas y las reacciones se terminaron me-

ES 2 316 076 T3

diante la adición del reactivo quinasa-Glo™. Los datos fueron cuantificados empleando la modalidad de luminiscencia de un analizador LJL después de 15 minutos de incubación.

5 También se muestra la reacción en presencia de sustrato, 150 nM p38. RLU es la unidad relativa de luz - ■ - MKK3 solo. - ◆ - MKK3 en presencia de p38.

10 La figura 3 ilustra la eliminación del consumo de ATP (bien sea intrínseco a la MKK3 ó bien a partir de un contaminante) en ausencia de p38, el sustrato aceptor. Este experimento se efectuó de acuerdo con los métodos empleados en la figura 2 excepto para la sustitución de 300 nM de ATP- γ -S para el ATP. - ■ - MKK3 en presencia de p38. - ▲ - MKK3 sola. - ● - p38 solo. - ▼ - control sin MKK3 ni p38.

15 La figura 4 ilustra los resultados de un ensayo empleando el ATP- γ -S y midiendo la inhibición mediante un compuesto de ensayo de la actividad fosforiltransferasa de una quinasa, MKK3. El valor IC₅₀ (50% de la concentración inhibidora) fue de 330 nM.

20 Descripción detallada de la invención

25 La mayoría de tecnologías empleadas en los esfuerzos de screening del descubrimiento de un fármaco para los inhibidores de la proteína quinasa han requerido la separación de productos y reactantes. Los reactivos basados en la luciferasa, que hoy en día se encuentran en el mercado han eliminado esta necesidad. Sin embargo, el empleo del ATP en estas tecnologías ha presentado problemas imprevistos asociados con 1) actividad intrínseca de la ATPasa de algunas proteína quinasas, y 2) la contaminación de las ATPasas en las preparaciones de proteína. Estos efectos no fueron detectados en las tecnologías tradicionales empleadas y en los esfuerzos para el descubrimiento de un fármaco de proteína quinasa.

30 Clásicamente, las proteína quinasas existen como componentes de cascadas de activación, en donde la fosforilación de una proteína quinasa por otra proteína quinasa corriente arriba da como resultado su activación. La proteína quinasa activada podría a su vez, activar otra proteína quinasa. En ensayos en donde tanto la enzima primaria de interés como su sustrato son proteína quinasas, pueden surgir varias situaciones complicadas. Puesto que los ensayos están diseñados típicamente de forma que existe un gran exceso molar de sustrato comparado con la enzima (1:100 a 35 1:1000), incluso resultará una modesta actividad intrínseca ATPasa de la proteína sustrato, en una gran parte de la ATP total, consumiendo la actividad que permanece sin inhibir incluso en presencia de la completa inhibición de la enzima primaria. Además del intencionado exceso molar de sustrato sobre la enzima, la activación del sustrato que tendría lugar durante el ensayo como resultado de su fosforilación, aumentaría además el consumo fraccionado de ATP atribuido a la actividad intrínseca de la ATPasa del sustrato. Esto reduciría además la probabilidad de identificar los inhibidores de la quinasa. La técnica que nosotros hemos desarrollado nos permite medir exclusivamente la actividad de la fosforiltransferasa de la enzima primaria sin ninguna interferencia debido a la actividad intrínseca de la ATPasa de la quinasa sustrato.

40 Un problema intrínseco para la medición de la actividad de la proteína quinasa a través de la reducción del ATP es la presencia de actividades ATPasa no quinasas que contaminan el sistema de ensayo. Las ATPasas son muy frecuentes en extractos de células, y pueden persistir a través de la purificación de la proteína quinasa. En estos casos, la contaminación de trazas por ATPasas podría prevenir el empleo de las tecnologías corrientes que monitorizan los niveles de ATP. La purificación extensiva para eliminar estos contaminantes es cara, consume tiempo, exige un intenso trabajo de laboratorio y a menudo, cuando tiene éxito, tiene como resultado unos rendimientos finales de proteína que son insuficientes para efectuar una campaña de screening. Además, la contaminación por ATPasa podría surgir a partir de las preparaciones o bien de la enzima o bien del sustrato. Dadas las altas concentraciones de sustrato respecto a la enzima típicamente presente, puede ser muy difícil proporcionar una preparación de sustrato de proteína sin niveles de trazas de la actividad de ATPasa. La presente invención elimina la necesidad de preparaciones de enzimas desprovistas de contaminación por ATPasas. Como antes, la invención aprovecha la excepcional capacidad de las quinasas para emplear el ATP- γ -S en las reacciones de la fosforiltransferasa.

55 La invención descrita en la presente, elimina los problemas descritos más arriba mediante el empleo del ATP- γ -S (adenosina 5'-[γ -tio]trifosfato) el cual no es un sustrato para las ATPasas.

La principal ventaja de esta invención sobre las técnicas existentes reside en la capacidad del ATP- γ -S para distinguir entre la actividad fosforiltransferasa de las proteína quinasas y la hidrólisis del ATP inducida por la propia proteína quinasa o una ATPasa contaminante.

60 En una versión, la invención se refiere a un método para medir la actividad de la proteína quinasa, el cual comprende: (a) suministro de una primera solución que comprende una proteína quinasa y el ATP- γ -S; (b) suministro de una segunda solución que comprende la misma proteína quinasa de la solución del paso (a), ATP- γ -S, y un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa; (c) incubación de cada una de las soluciones para permitir que proceda la reacción de fosforilación; (d) medición de la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera solución y la cantidad de ATP- γ -S que queda en la segunda solución; y (e) comparación de la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera solución con la cantidad de ATP- γ -S que queda en la segunda solución para determinar la actividad de la proteína quinasa.

ES 2 316 076 T3

En otra versión, cada solución del paso (a) y (b) del método de medir la actividad de la proteína quinasa, se deja que incube durante intervalos de tiempo hasta ocho horas, de preferencia hasta seis horas, con más preferencia hasta cuatro horas, y la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera solución y en la segunda solución se determina para cada intervalo.

5

Otra versión de la invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto que modula la actividad de una proteína quinasa, el cual método comprende: (a) una primera solución que contiene una proteína quinasa, ATP- γ -S, un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa, y un compuesto de ensayo; (b) una segunda solución que contiene una proteína quinasa, ATP- γ -S, y un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa; (c) una tercera solución que contiene ATP- γ -S, un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa, y un compuesto de ensayo; (d) incubación de cada una de las soluciones de los pasos (a), (b), y (c); y (e) comparación de la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera, segunda y tercera solución, para determinar si el compuesto modula la actividad de la proteína quinasa.

10

En otra versión, cada una de las soluciones de los pasos (a), (b), y (c) del método para la identificación de un compuesto que modula la actividad de una proteína quinasa, se incuban durante 10 minutos a seis horas, de preferencia de 20 minutos a cuatro horas, con mayor preferencia de 30 minutos a dos horas.

15

En el paso (b) de los métodos de la invención, el sustrato puede ser una proteína quinasa distinta de la proteína quinasa del paso (a).

20

La concentración de ATP- γ -S puede ser determinada por los métodos ya conocidos en la técnica, incluyendo pero sin ser limitantes, la reacción de bioluminiscencia o los ensayos radiométricos. Una reacción de bioluminiscencia puede incluir por ejemplo, una luciferina y una luciferasa en donde la luciferina emite luz en presencia de la luciferasa y ATP- γ -S.

25

Un compuesto que modula la actividad de la proteína quinasa puede inhibir o potenciar la actividad.

Ejemplos

30

Determinación del K_m (ATP- γ -S) para la luciferasa

Se ha informado (B. Ortiz *et al.*, Eur. J. Biochem, 1993, 212, 263-270) que el ATP- γ -S es un sustrato para la luciferasa. Para confirmar esto, se añadieron 23 concentraciones de ATP- γ -S en el intervalo de 1 mM a 238 pM (diluciones dobles entre concentraciones) al reactivo quinasa-GloTM (reconstituido de acuerdo con las instrucciones del pack), y a continuación se diluyeron 1:6 (final) en el ensayo. El tampón de ensayo consistió en: 50 mM de HEPES, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 100 μ M de ortovanadato de sodio, 0,01% de CHAPS y 0,5 mM de DTT. La placa de ensayo empleada fue una Greiner Lumitrac 200. Los datos se cuantificaron empleando la modalidad de luminiscencia de un analizador LJL después de 15 minutos de incubación.

40

Los resultados mostrados en la figura 1, confirman que el ATP- γ -S es un sustrato para la luciferasa e ilustran el K_m del ATP- γ -S para la luciferasa.

Consumo de ATP en ausencia de sustrato aceptor

45

La figura 2 ilustra la observación inicial del consumo de ATP por la MKK3 en ausencia de p38, el sustrato aceptor. Llegados a este punto no estaba claro si la actividad era debida a la actividad intrínseca del ATPasa del MKK3 ó a una ATPasa contaminante. Este experimento se efectuó en las mismas placas de ensayo empleando los mismos tampones que el K_m (ATP- γ -S), y los datos fueron idénticamente cuantificados. Se añadió MKK3 (10 nM) a 300 nM de ATP durante los tiempos indicados y las reacciones se terminaron mediante la adición del reactivo quinasa-GloTM, reconstituido y empleado de acuerdo con las instrucciones del pack. También se muestra la reacción en presencia de p38 (150 nM). Está claro que una porción importante del consumo se debe a la actividad intrínseca de la ATPasa de la MKK3 ó una ATPasa contaminante, y no es debido a la actividad de fosforiltransferasa de la MKK3.

50

Eliminación del consumo de ATP

55

La figura 3 ilustra la eliminación del consumo de ATP (bien sea el intrínseco a la MKK3 ó a partir de un contaminante) en ausencia de p38, el sustrato aceptor. Este experimento se efectuó de acuerdo con los métodos empleados en la figura 2 excepto para la sustitución de 300 nM de ATP- γ -S para el ATP.

60

El consumo de ATP está mostrado en la figura 3 para la MKK3 en presencia del sustrato p38, la MKK3 sola, el p38 solo, y en ausencia de ambos, MKK3 y p38 (control). Como se ve en la figura 3, el ATP se consumió solamente cuando la MKK3 y su sustrato p38 estuvieron presentes y tuvo lugar la fosforiltransferasa. O bien con MKK3 sola, o con p38 solo, no hubo ningún consumo de ATP (comparado con el control) y de esta forma no se detectó ninguna actividad intrínseca de ATPasa cuando la reacción tuvo lugar en presencia de ATP- γ -S.

65

El empleo de ATP- γ -S en lugar de ATP podría aplicarse a los ensayos de luciferasa con otras clases de proteínas para las cuales se consume ATP como sustrato primario o cofactor necesario. Estos podrían incluir las ATPasas de

ES 2 316 076 T3

la base de membrana, tales como la Na⁺ - K⁺ ATPasa, enzimas metabólicas tales como la piruvato quinasa, o ácido nucleico modificando enzimas tales como la T4 polinucleótido quinasa. Por ejemplo las adenosin 5'-trifosfatasa (ATPasas) son enzimas extremadamente frecuentes que escinden también el ATP en ADP.

5 *Inhibición de la actividad fosforiltransferasa*

La figura 4 ilustra los resultados para un ensayo empleando el ATP- γ -S y midiendo la inhibición mediante un compuesto de ensayo de la actividad de la fosforiltransferasa de una quinasa, la MKK3.

10 El siguiente ejemplo describe un ensayo para medir la inhibición mediante compuestos de ensayo de la actividad de la fosforiltransferasa de una quinasa, la MKK3. El sustrato que se fosforila en el ensayo es el p38. La actividad se midió empleando la tecnología quinasa-Glo (Cambrex # V6714) que mide el consumo de ATP- γ -S por medio de su efecto sobre la actividad de la luciferasa de la luciérnaga. Los datos fueron generados empleando placas de microtitulación Greiner Lumitrac 200 (#781075). El tampón de ensayo consistió en: 50 mM de HEPES, de pH 7,5, 50
15 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 100 μ M de ortovanadato de sodio, 0,01% de CHAPS y 0,5 mM de DTT. La realización del ensayo fue como sigue: se añadieron 20 μ l de MKK3 20 nM a una placa vacía de Lumitrac 200. Se añadieron 10 microlitros del compuesto 12 μ g/ml en 2,4% de DMSO, seguido de 10 μ l de una solución que contenía 600 nM de p38 y 1,2 μ M de ATP- γ -S. La reacción (concentraciones finales: 10 nM de MKK3; 3 μ g/ml del compuesto en 0,6% de DMSO; 150 nM de p38 y 300 nM de ATP- γ -S) se incubó durante noventa minutos. Los controles se determinaron
20 mediante la actividad en la misma mezcla de reacción sin MKK3 y en la misma mezcla de reacción con MKK3, pero sin el compuesto de ensayo. Después de la incubación se añadieron 40 μ l de reactivo quinasa-Glo (reconstituido de acuerdo con las instrucciones del pack y a continuación diluidos 1:5 en tampón completo de ensayo de MMK3). Se incubaron las placas durante 15 minutos adicionales antes de ser cuantificadas empleando un analizador LJL en la modalidad de luminiscencia. Se empleó un programa Activity Base Software para la reducción de datos.

25 Los datos están expresados en % del control de actividad de la fosforiltransferasa para cada concentración del compuesto de ensayo empleado, y se calcularon como sigue:

$$\% \text{ de control} = (R_T - R_b) / (R_c - R_b) \times 100$$

30 R_T es la lectura de la luminiscencia para la reacción con el compuesto de ensayo a una concentración dada en presencia de MMK3.

35 R_b es la lectura de la luminiscencia para la reacción en presencia del compuesto de ensayo pero sin MKK3 (testigo).

R_c es la lectura de la luminiscencia para la reacción en presencia de MKK3 pero sin el compuesto de ensayo (control).

40 Como se muestra en la figura 4, el valor de IC₅₀ (50% de la concentración inhibidora) fue de 330 mM.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la medición de la actividad de la proteína quinasa, el cual comprende:
- 5 (a) suministro de una primera solución que comprende una proteína quinasa y el ATP- γ -S;
- (b) suministro de una segunda solución que comprende la misma proteína quinasa de la solución del paso (a), ATP- γ -S y un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa;
- 10 (c) incubación de cada una de las soluciones de forma que tenga lugar la reacción de fosforilación;
- (d) medición de la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera solución, y la cantidad de ATP- γ -S que queda en la segunda solución; y
- 15 (e) comparación de la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera solución con la cantidad de ATP- γ -S que queda en la segunda solución para determinar la actividad de la proteína quinasa.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración del ATP- γ -S se determina empleando una reacción de bioluminiscencia.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la concentración del ATP- γ -S se determina empleando un ensayo radiométrico.
- 25 4. El método de la reivindicación 2, en donde la reacción de bioluminiscencia se efectúa empleando una luciferina y una luciferasa, en donde la luciferina emite luz en presencia de la luciferasa y el ATP- γ -S.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato una vez fosforilado es otra proteína quinasa.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en donde la primera solución y la segunda solución se incuban durante intervalos de tiempo de hasta cuatro horas, y la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera solución y en la segunda solución se determina durante cada intervalo de tiempo.
7. Un método *in vitro* para la identificación de un compuesto que modula la actividad de una proteína quinasa que comprende:
- 35 (a) una primera solución que comprende una proteína quinasa, ATP- γ -S, un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa, y un compuesto de ensayo;
- 40 (b) una segunda solución que comprende una proteína quinasa, ATP- γ -S, y un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa;
- (c) una tercera solución que comprende ATP- γ -S, un sustrato capaz de ser fosforilado por dicha proteína quinasa, y un compuesto de ensayo;
- 45 (d) incubación de cada una de las soluciones de los pasos (a), (b), y (c), de manera que tiene lugar una reacción de fosforilación; y
- 50 (e) comparación de la cantidad de ATP- γ -S que queda en la primera, segunda y tercera solución, para determinar si el compuesto modula la actividad de la proteína quinasa.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la concentración del ATP- γ -S, se determina empleando una reacción de bioluminiscencia.
- 55 9. El método de la reivindicación 7, en donde la concentración del ATP- γ -S se determina empleando un ensayo radiométrico.
- 60 10. El método de la reivindicación 8, en donde la reacción de bioluminiscencia se efectúa empleando una luciferina y una luciferasa, en donde la luciferina emite luz en presencia de la luciferasa y el ATP- γ -S.
11. El método de la reivindicación 7, en donde el sustrato una vez fosforilado es otra proteína quinasa.
- 65 12. El método de la reivindicación 7, en donde cada una de las soluciones de los pasos (a), (b), y (c) se incuban durante treinta a ciento veinte minutos.

ES 2 316 076 T3

13. El método de la reivindicación 7, en donde el compuesto que modula la actividad de la proteína quinasa es un inhibidor de la actividad.

5 14. El método de la reivindicación 7, en donde el compuesto que modula la actividad de la proteína quinasa potencia la actividad.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

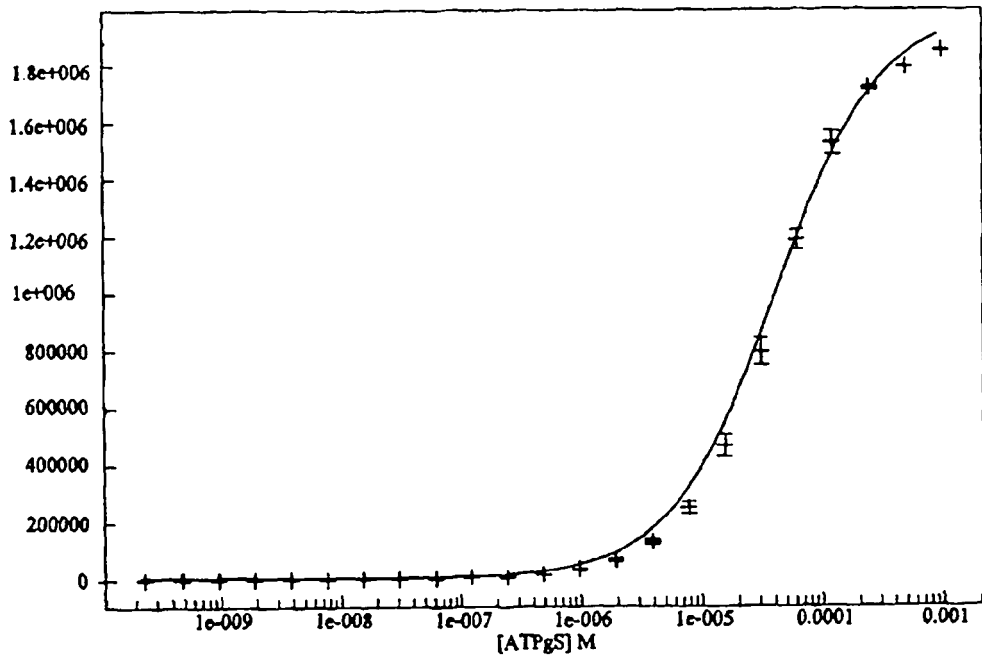


Figura 1

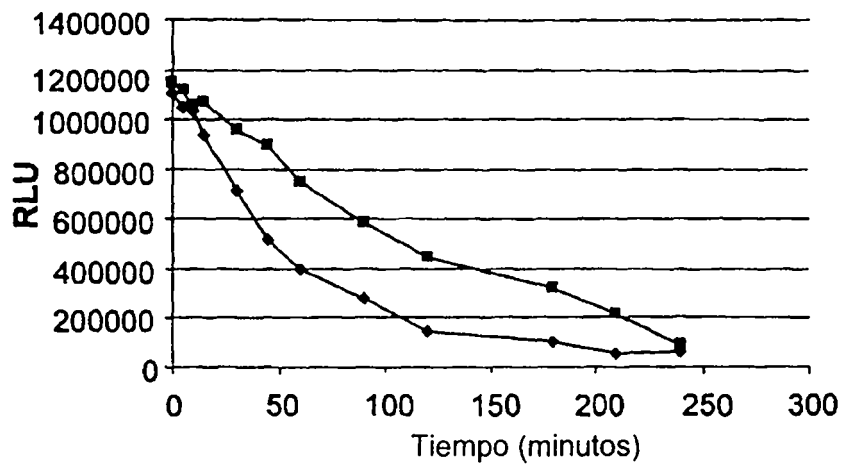


Figura 2

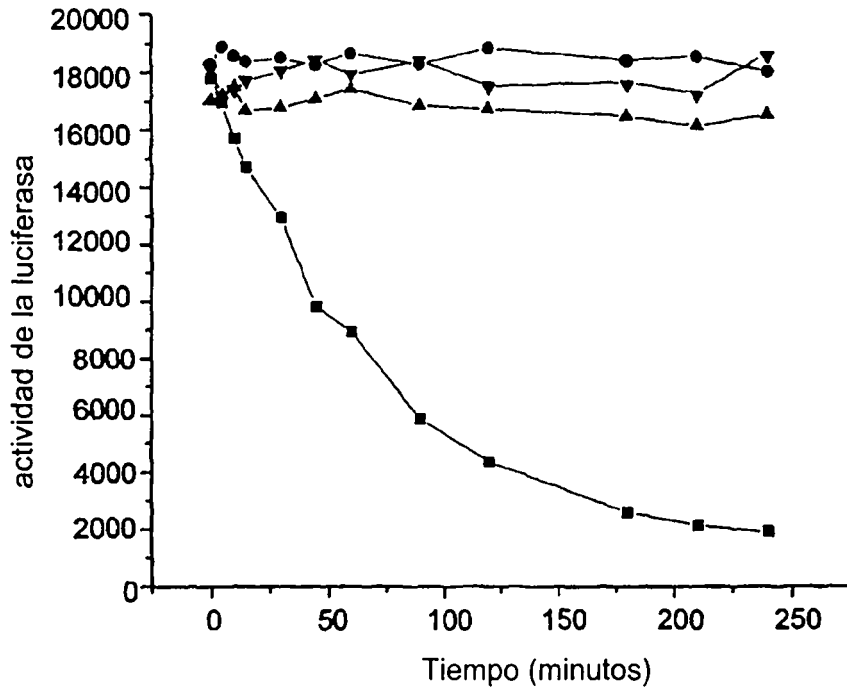


Figura 3

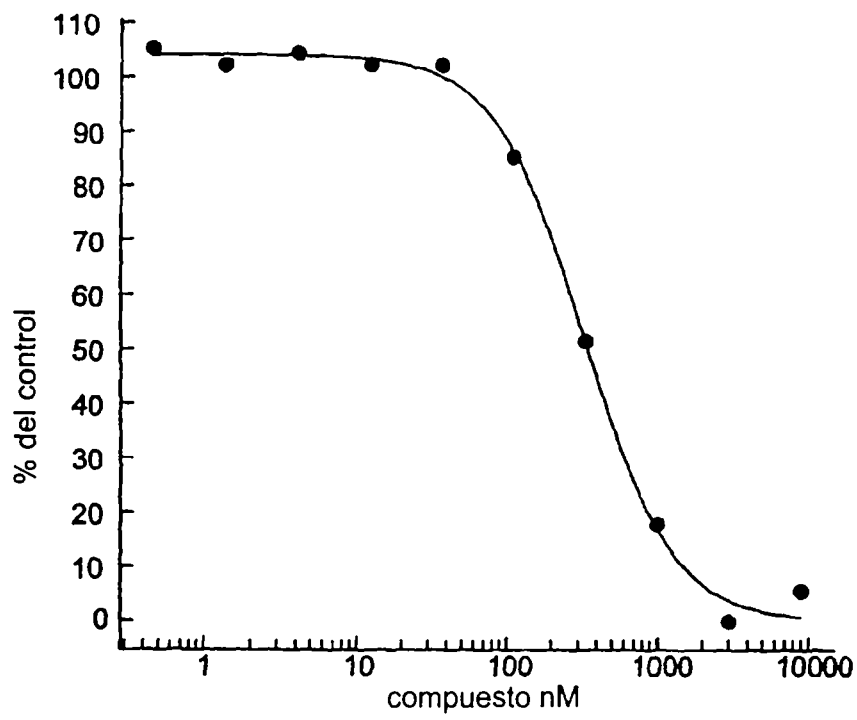


Figura 4