



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 331 050**

(51) Int. Cl.:
C07B 61/00 (2006.01)
G01R 33/46 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00977289 .8**

(96) Fecha de presentación : **29.09.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1242339**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.09.2002**

(54) Título: **Métodos para creación de una biblioteca de compuestos e identificación de modelos y ligandos químicos líderes para moléculas diana.**

(30) Prioridad: **29.09.1999 US 156818 P**
26.10.1999 US 161682 P
28.03.2000 US 192685 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2009

(73) Titular/es: **Nerviano Medical Sciences S.R.L.**
Viale Pasteur, 10
20014 Nerviano, MI, IT

(72) Inventor/es: **Stockman, Brian, J.;**
Farley, Kathleen y
Dalvit, Claudio

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 331 050 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 creación de una biblioteca de compuestos e identificación de modelos y ligandos químicos líderes para moléculas diana.

Antecedentes de la invención

Desde un punto de vista de la química orgánica, el proceso de diseño de fármacos puede considerarse que implica dos pasos. En primer lugar, se selecciona un modelo químico líder (a menudo uno o más). En segundo lugar, se realiza un esfuerzo de química de síntesis para crear análogos del modelo químico líder a fin de crear un compuesto o compuestos que posean las propiedades terapéuticas y farmacocinéticas deseadas.

Un paso importante en el proceso de descubrimiento de fármacos es la selección de un modelo químico líder adecuado para elaborar a partir del mismo un programa de química analógica. El proceso de identificación de un modelo químico líder para una diana molecular dada implica típicamente cribar un gran número de compuestos (a menudo más de 100.000) en un ensayo funcional, seleccionar un subconjunto basado en cierto umbral arbitrario de actividad para testarlo en un ensayo secundario a fin de confirmar la actividad, y evaluar finalmente los compuestos activos remanentes respecto a idoneidad de la elaboración química.

Este proceso puede consumir mucho tiempo y gran cantidad de recursos, y presenta numerosas desventajas. El mismo requiere el desarrollo y la implementación de un ensayo funcional de alta potencia que, por definición, requiere que la función de la diana molecular sea conocida. El mismo requiere el testado de grandes números de compuestos, la gran mayoría de los cuales serán inactivos para una diana molecular dada. El mismo conduce al agotamiento de recursos químicos y requiere el mantenimiento continuo de grandes colecciones de compuestos. Es muy importante, que el mismo conduce a menudo a un conjunto final de modelos líderes potenciales que, en su mayor parte, con la excepción de afinidad para una diana molecular dada, no poseen cualidades deseables como fármaco. En algunos casos, los ensayos funcionales de alta potencia no identifican compuesto alguno, del gran número (v.g. 100.000) de compuestos cribados, que satisfagan los criterios de actividad establecidos.

WO 98/57155 describe un método de identificación de un compuesto que se fija a una molécula diana, que comprende los pasos de:

proporcionar una mezcla de compuestos de test;

introducir la molécula diana en una cubeta de muestras que contiene una mezcla de compuestos de test, a fin de proporcionar una muestra de test; obtener un espectro NMR de la muestra filtrado con relajación; y

comparar el espectro de esta muestra con el espectro obtenido en las mismas condiciones en ausencia de la molécula diana, a fin de identificar un compuesto que se fija a la molécula diana;

en donde la concentración de molécula diana y cada compuesto en cada muestra puede no ser mayor que 100 mM.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al diseño racional de fármacos. Específicamente, la presente invención proporciona un enfoque para el desarrollo de una biblioteca de compuestos así como métodos para identificación de compuestos (v.g. ligandos) que se fijan a una molécula diana específica (v.g., una proteína) y modelos químicos líderes que pueden utilizarse, por ejemplo, en el descubrimiento y diseño de fármacos. Este enfoque para identificación de ligandos para moléculas diana (v.g., proteínas) utiliza espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR). Existen numerosas técnicas espectroscópicas NMR disponibles actualmente, que detectan la fijación de pequeñas moléculas a dianas tales como dianas proteínicas, con inclusión de dianas identificadas utilizando técnicas de genómica que carecen de un ensayo funcional. Los ligandos con afinidades de fijación solamente moderadas, que podrían pasarse por alto en un ensayo funcional tradicional pero podrían servir sin embargo como modelos para esfuerzos subsiguientes de química de síntesis, pueden identificarse potencialmente utilizando la presente invención. La presente invención implica el uso de técnicas NMR de flujo, que pueden reducir la cantidad de tiempo y esfuerzo requeridas para evaluar pequeñas moléculas respecto a fijación a una diana dada.

De acuerdo con la presente invención, un método de identificación de un compuesto que se fija a una molécula diana, el método comprende:

seleccionar una biblioteca de compuestos de test que tienen cada uno una solubilidad en agua deuterada de al menos 1 mM a la temperatura ambiente y un peso molecular no mayor que 350 gramos/mol;

proporcionar una pluralidad de mezclas de los compuestos de test, encontrándose cada mezcla en una cubeta de muestra;

introducir una molécula diana en cada cubeta de muestra, a fin de proporcionar una pluralidad de muestras de test;

ES 2 331 050 T3

proporcionar un espectrómetro de resonancia magnética nuclear equipado con una sonda de inyección de flujo;

transferir cada muestra de test procedente de la cubeta de muestra a la sonda de inyección de flujo;

5 obtener un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY sobre cada muestra en cada cubeta; y

analizar el espectro de cada muestra para distinguir los compuestos que se fijan de los compuestos que no se fijan, en virtud de los signos opuestos de sus efectos Overhauser nucleares agua-ligando;

10 en donde la concentración de la molécula diana y cada compuesto de test en cada cubeta de muestra no es mayor que 100 mM y en donde la relación de molécula diana a cada compuesto de test en cada cubeta de muestra no es mayor que 1:1.

Preferiblemente, la biblioteca de compuestos de test incluye al menos aproximadamente 75 compuestos, de modo más preferible al menos aproximadamente 300 compuestos, y de modo muy preferible al menos aproximadamente 2000 compuestos, y estos compuestos tienen preferiblemente estructuras químicas relativamente diversas. En esta memoria, los pesos moleculares de los compuestos se determinan sin iones solubilizantes de carga opuesta (si los compuestos son sales) y sin moléculas de agua de hidratación. Asimismo, las concentraciones se consignan basadas en soluciones acuosas, que pueden incluir o no un tampón.

20 Cuando la fijación se detecta utilizando la técnica WaterLOGSY (observación agua-ligando con espectroscopia en gradiente), pueden utilizarse niveles extremadamente bajos de diana, con una relación de ligando a diana que es preferiblemente 100:1 a aproximadamente 10:1. Preferiblemente, la concentración de molécula diana no es mayor que aproximadamente 10 mM. Más preferiblemente, la concentración de molécula diana es aproximadamente 1 mM a 10 mM. Para análisis de los datos, los compuestos que se fijan se distinguen de los que no se fijan (es decir compuestos que no se fijan) por el signo opuesto de sus NOEs con el agua-ligando. Utilizando este método, no hay necesidad alguna de obtener un espectro de referencia en ausencia de una molécula diana.

Los compuestos incluidos en la biblioteca tienen una solubilidad en agua deuterada de al menos aproximadamente 1 mM a la temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C), y un peso molecular no mayor que aproximadamente 350 gramos/mol. Para uso eficaz de un compuesto identificado como ligando para una diana dada en la búsqueda de un modelo químico líder, preferiblemente, la constante de disociación del ligando identificado para una molécula diana no es inferior a (o sea, es como mínimo) 100 mM. Para uso eficaz de un modelo químico líder en diseño ulterior de fármacos, preferiblemente, la constante de disociación del modelo químico líder de una molécula diana no es inferior a (o sea, es como mínimo) 1 mM.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Diagrama esquemático que ilustra el uso de NMR para descubrir un ligando que tenga una constante de disociación aproximada de $1,0 \times 10^{-4}$ M (figura de la izquierda), utilizar el ligando descubierto para dirigir el descubrimiento de un modelo químico líder que tenga una constante de disociación aproximada de $1,0 \times 10^{-6}$ M (figura central), y a continuación, por la vía de química de síntesis y diseño de fármacos dirigido por estructura llegar a un fármaco candidato que tenga una constante de disociación aproximada de $1,0 \times 10^{-8}$ M.

45 Figura 2. Comparación de las gráficas BCUT bidimensionales HA (aceptor de enlaces de hidrógeno) frente a CHRg (carga) -para los compuestos contenidos en la biblioteca NMR descrita en esta memoria (cuadrados negros) y una base de datos de biblioteca química de mayor tamaño (puntos grises).

Figura 3. Esquema del sistema de flujo ÓPTIMO: (1) unidad central de computación, (2) consola NMR, (3) manipulador de muestras Gilson, (4) sonda de flujo en el imán, y (5) nitrógeno gaseoso. El manipulador de muestras Wilson está identificado como sigue: (A) teclado, (B) jeringuilla, (C) inyector, (D) cubeta de disolvente, (E) bandeja de disolvente, (F) bandejas de muestra, (G) cubeta de residuos, (H) válvulas Rheodyne, (I) abertura de inyección, y (J) unidad de recuperación.

55 Figura 4. Esquema de una sonda de flujo Bruker que muestra (A) el volumen total de sonda, (B) el volumen de la celda de flujo, y (C) el volumen de posicionamiento.

Figura 5. Espectros ^1H NRM a 600,13 MHz de una muestra de una biblioteca de NMR 100 μM con el volumen de posicionamiento ajustado a (A) -100 μl , (B) 0 μl , y (C) +100 μl .

Figura 6. Superposición de las gráficas BCUT bidimensionales HA - aceptor de enlaces de hidrógeno - frente a CHRg (carga) -para los compuestos en el índice CMC (gris) y los compuestos semejantes al líder contenidos en el mismo (negro).

65 Figura 7. Región del espectro WaterLOGSY a 600,13 MHz de una mezcla de compuestos con proteína diana añadida. La concentración de proteína era 10 μM , mientras que la concentración de cada compuesto era 100 μM . El espectro se adquirió en una sonda de inyección de flujo Bruker de 5 mm a 27°C. Se recogieron un total de 4K escaneos,

dando como resultado un tiempo de adquisición total de aproximadamente 288 minutos. Se utilizó un tiempo de mezcla de 2,0 segundos.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

La presente invención implica la selección de una biblioteca generalmente pequeña de compuestos estructuralmente diversos que son por lo general solubles en agua, tienen un peso molecular relativamente bajo y son susceptibles de elaboración por química de síntesis. De modo significativo y ventajoso, para ciertas realizaciones, la presente invención implica preferiblemente la realización de un ensayo de fijación a concentraciones relativamente bajas de diana y relaciones aproximadamente equimolares de ligando a diana, o incluso a concentraciones extremadamente bajas de diana y relaciones más altas de ligando a diana.

En un método de la presente invención, se crea un subconjunto relativamente pequeño de compuestos (con preferencia, al menos aproximadamente 75, de modo más preferible al menos aproximadamente 300, de modo muy preferible, al menos aproximadamente 2000, y por regla general no mayor que aproximadamente 10.000) que mimetiza la diversidad estructural de los compuestos en colecciones mucho mayores, basado en una serie predeterminada de criterios. Esta biblioteca generalmente pequeña se criba respecto a afinidad de fijación para una molécula diana (como se determina en esta memoria por constantes de disociación). Los compuestos de la biblioteca que se identifican como ligandos eficaces (típicamente, que tengan una afinidad para una diana deseada como se evidencia por una constante de disociación de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}$ M) se utilizan luego para concentrar esfuerzos de cribado ulteriores o para dirigir elaboraciones químicas a fin de llegar a uno o más modelos químicos líderes (que, típicamente, tienen una afinidad para una diana deseada como se evidencia por una constante de disociación de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ M). Este proceso se muestra esquemáticamente en la Figura 1.

Significativamente, se ahorran tiempo y recursos por cribado de un número mucho menor de compuestos utilizando la presente invención. El uso de un ensayo de fijación, tal como el basado en espectroscopia NMR descrito en esta memoria, elimina la necesidad de desarrollar un ensayo funcional de alta potencia, y permite también que los métodos se utilicen sobre dianas moleculares carezcan de una función conocida.

Así pues, la presente invención proporciona métodos de identificación de un compuesto que se fija a una molécula diana (preferiblemente, una proteína) que están basados en técnicas de espectroscopia NMR, utilizando WaterLOGSY. Esto implica la transferencia de la magnetización desde el agua a granel para detectar la interacción de fijación. Utilizando técnicas WaterLOGSY, los compuestos que se fijan se distinguen de los compuestos que no se fijan por el signo opuesto de sus efectos Overhauser nucleares agua-ligando (NOEs).

Elementos importantes que contribuyen al éxito de los métodos de la invención incluyen preferiblemente el desarrollo de una biblioteca pequeña adecuada de compuestos a cribar, realización del ensayo de fijación a concentraciones de diana extremadamente bajas (en caso deseado) y relaciones elevadas de ligando a diana, así como aptitud para una potencia rápida de recogida de datos. Por ejemplo, la concentración de molécula diana es preferiblemente no mayor que aproximadamente $10 \mu\text{M}$.

La selección de compuestos en una biblioteca pequeña (con preferencia, al menos aproximadamente 75 compuestos, de modo más preferible, al menos aproximadamente 300 compuestos, y de modo muy preferible, al menos aproximadamente 2000 compuestos) es importante en el sentido de que su diversidad debería mimetizar la diversidad de colecciones mayores de compuestos. Preferiblemente, cada componente posee muchas de las cualidades deseables de un modelo químico líder. Éstas incluyen solubilidad en agua, peso molecular bajo (no mayor que aproximadamente 350 gramos/mol, más preferiblemente, no mayor que aproximadamente 325 gramos/mol, y muy preferiblemente, menor que aproximadamente 325 gramos/mol), y susceptibilidad de elaboración por química de síntesis. Los modelos que poseen estas cualidades, comparados con un modelo seleccionado aleatoriamente, se considera que están predispuestos preferiblemente para comportarse de modo tipo líder y como poseedores de una probabilidad incrementada de conducir finalmente a un fármaco.

La diversidad estructural satisfactoria en una biblioteca aumenta la probabilidad de que uno o más compuestos posean características estructurales importantes para fijación a una diana molecular dada. La predisposición de los compuestos a ser solubles en agua, a tener peso molecular bajo (no mayor que aproximadamente 350 gramos/mol, de modo más preferible no mayor que aproximadamente 325 gramos/mol, y de modo muy preferible menor que aproximadamente 325 gramos/mol), y ser susceptibles de elaboración por síntesis aumenta la probabilidad de que un compuesto encontrado como ligando conduzca a un compuesto o compuestos afines adecuados como modelos químicos líderes para uso, por ejemplo, en un proceso de identificación de un agente terapéutico y/o profiláctico eficaz. Adicionalmente, el requerimiento de solubilidad satisfactoria en agua (al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ M en agua deuterada a la temperatura ambiente) es importante en el sentido de que aumenta la probabilidad de éxito de otros proyectos de diseño de fármacos aguas abajo, tales como intentos de co-cristalización, estudios calorimétricos, y análisis enzimáticos cinéticos.

Los compuestos que dan resultados positivos en el test de fijación tienen afinidades comprendidas dentro de un factor de aproximadamente 3-4 de concentraciones bajas de diana (con preferencia, no mayores que aproximadamente $10 \mu\text{M}$, pero de modo más preferible aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $10 \mu\text{M}$) y relaciones de ligando a diana de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1. Este nivel de afinidad es deseable si los pasos subsiguientes

de cribado enfocado y elaboración química dirigida deben tener éxito en la elucidación de un modelo químico líder con afinidad muy baja (v.g., uno que tenga una constante de disociación de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ M). La realización del cribado inicial a estas bajas concentraciones evita también la detección de compuestos indeseables con constantes de disociación mucho menores en el campo de $1,0 \times 10^{-3}$ M, que son menos específicas en su fijación y por tanto más difíciles de convertir en modelos químicos líderes dada su baja afinidad inicial.

La capacidad para la potencia rápida de recogida de datos es importante si debe cribarse un gran número de dianas moleculares. Las técnicas NMR de flujo pueden reducir la cantidad de tiempo y esfuerzo requerida para evaluar pequeñas moléculas respecto a la fijación a una diana dada. Por ejemplo, el uso de un sistema Bruker Efficient Sample Transfer en combinación con una sonda NMR de inyección de flujo sin tubos, ha resultado ser mucho más rápida y menos intensiva en mano de obra que el uso de tubos NMR tradicionales. Se obtiene un aumento significativo en capacidad comparado con el cambio manual de muestras y la utilización de un muestreador automático. La implementación del proceso de cribado utilizando recipientes de muestras multipocillo estandariza también la disposición experimental así como los componentes en una mezcla dada de una diana molecular a la siguiente.

Lo que sigue es una descripción de un método preferido para realización de la presente invención. Se proporciona únicamente para propósitos de ilustración y no debe considerarse como innecesariamente limitante de la invención tal como se expone en las reivindicaciones.

En el diseño de una biblioteca pequeña preferida de compuestos estructuralmente diversos de acuerdo con la presente invención, se seleccionaron compuestos de una biblioteca grande basándose en la semejanza, solubilidad predicha en agua, peso molecular bajo, e intuición química. Algunos estaban basados en marcos sugeridos en la bibliografía, aunque se evitaron consiguientemente algunos marcos sugeridos en la bibliografía. Cada compuesto se testó respecto a solubilidad a $1,0 \times 10^{-3}$ M en $^2\text{H}_2\text{O}$ y respecto a pureza por espectrometría de masas y espectroscopia ^1H NMR. Los compuestos considerados como solubles en agua y puros se mantuvieron para inclusión en la biblioteca final (aproximadamente 30% de los compuestos iniciales). La biblioteca resultante contiene aproximadamente 300 compuestos. Una medida del grado de diversidad estructural de los compuestos en esta pequeña biblioteca se muestra en la Figura 2. Esta está basada en la técnica descrita en Pearlman *et al.*, *Perspectives in Drug Discovery & Design*, **9**, 339-353 (1998). Preferiblemente, la biblioteca de compuestos incluye compuestos de estructura química suficientemente diversa para que pudiera esperarse que al menos un compuesto se fije a una proteína diana dada con una afinidad (constante de disociación) no menor que (es decir, como mínimo) aproximadamente $200 \mu\text{M}$. En este caso, los compuestos de estructura química diversa son aquellos que tienen una diversidad de estructuras hidrocarbonadas de la cadena principal (v.g., lineal, ramificada, cíclica - que puede ser o no aromática, tener anillos condensados, etc.), incluyendo opcionalmente una diversidad de heteroátomos (v.g., oxígeno, nitrógeno) y una diversidad de grupos funcionales (v.g., carbonilos) en una diversidad de posiciones (v.g., apuntando en diversas direcciones hacia una diversidad de distancias unas de otras). Idealmente, la utilización de la técnica descrita en Pearlman *et al.*, *Perspectives in Drug Discovery & Design*, **9**, 339-353 (1998), la biblioteca de compuestos exhibe un patrón de cuadrados negros satisfactoriamente dispersados (v.g., véase la Figura 2).

Con objeto de aumentar la potencia del cribado NMR, los compuestos se agruparon en 32 conjuntos de 6-10 compuestos que tienen al menos una resonancia distinguible en un espectro ^1H NMR 1D de la mezcla. Para realizar esto, se obtuvo un espectro ^1H NMR 1D de cada mezcla en 100% $^2\text{H}_2\text{O}$ y en fosfato de sodio 0,1 M (100% $^2\text{H}_2\text{O}$ a pH 6,5). Se utilizaron dos disolventes a fin de determinar la asignación de resonancias valorables por pH en el espectro. La totalidad de las 32 mezclas se extendieron luego en pocillos separados de una placa de 96 pocillos, utilizando $25 \mu\text{l}$ de una solución $1,0 \times 10^{-3}$ M, y se congelaron a -80°C hasta que se necesitaron. En una versión inicial de la biblioteca de cribado NMR, se agruparon aproximadamente 70 compuestos en 21 conjuntos de 3-4 compuestos cada uno.

Después que se hubo descongelado completamente una placa de 96 pocillos, se añadió una solución que contenía una proteína molecular diana a cada pocillo que contenía una mezcla de compuestos en la placa de 96 pocillos. La concentración final de proteína es por regla general aproximadamente $5,0 \times 10^{-5}$ M. La relación de cada compuesto en una mezcla a proteína es por regla general aproximadamente 1:1. Este proceso implica típicamente añadir 475 ml de proteína a cada mezcla. La dispersión por toda la mezcla se facilitó por agitación mediante sacudidas de la placa de 96 pocillos durante 20 minutos después de la adición de la proteína.

Se utilizan métodos WaterLOGSY para detectar la interacción de fijación. WaterLOGSY se describe con más detalle en C. Dalvit *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **18**, 65-68 (2000).

Dado que WaterLOGSY está basado en la transferencia de magnetización desde agua como medio para detectar la interacción de fijación, es una técnica muy sensible. Como tal, la concentración de la molécula diana (v.g., proteína) en cada muestra puede reducirse preferiblemente hasta un valor no mayor que aproximadamente $10 \mu\text{M}$ (con preferencia, aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $10 \mu\text{M}$) mientras que la concentración de cada compuesto puede ser aproximadamente $100 \mu\text{M}$. Esto da como resultado relaciones de molécula diana a compuestos en cada cubeta de muestra de aproximadamente 100:1 a aproximadamente 10:1. Las concentraciones y relaciones exactas utilizadas pueden variar dependiendo del tamaño de la molécula diana, la cantidad de molécula diana disponible, el límite de detección por afinidad de fijación deseado, y la velocidad de recogida de datos deseada. En contraste con el método de relajación-edición, no hay necesidad alguna de obtener una comparación o espectro de control para diferenciar los compuestos que se fijan de los compuestos que no se fijan. En lugar de ello, los compuestos que se fijan se distinguen de los que no se fijan por el signo opuesto de sus efectos Overhauser nucleares (NOEs) agua-ligando.

Se confirmó la fijación de ligando por preparación de soluciones recientes que contenían únicamente el ligando identificado, con y sin proteína añadida en una relación 1:1, y comparación de los espectros 1D NMR editados con relajación. Adicionalmente, se estimó la constante de disociación del ligando por análisis de varios espectros 1D ^1H NMR editados con difusión recogidos a diversas concentraciones de gradiente. Los coeficientes de difusión relativos para la proteína, para el ligando en presencia de proteína, y para el ligando en ausencia de proteína, en asociación con concentraciones conocidas de proteína y ligando, se utilizaron para estimar la constante de disociación del ligando. Estos espectros se obtienen típicamente utilizando un espectrómetro NMR, una sonda convencional de alta resolución, y tubos NMR regulares de 5 mm.

Una vez que se ha identificado y confirmado un ligando, se utiliza su estructura para identificar compuestos disponibles con estructuras similares con objeto de ensayarlos respecto a actividad o afinidad, o para dirigir la síntesis de compuestos estructuralmente afines destinados a ser ensayados respecto a actividad o afinidad. Estos compuestos se obtienen luego a partir de las existencias, o se sintetizan. En la mayoría de los casos, los mismos se ensayan luego respecto a actividad utilizando ensayos enzimáticos. En el caso de dianas moleculares que no son enzimas o para las cuales no está disponible un ensayo enzimático, estos compuestos pueden ensayarse respecto a afinidad utilizando técnicas NMR similares a las arriba descritas, o por otros métodos físicos tales como calorimetría de desnaturalización isotérmica. Los compuestos identificados en este paso con afinidades para la diana molecular de aproximadamente $1,0 \times 10^{-6}$ M se consideran típicamente como modelos químicos líderes.

En algunos casos, la fijación de ligandos se estudia ulteriormente utilizando experimentos NMR más complejos u otros métodos físicos tales como calorimetría o cristalografía de rayos X. Estos estudios aguas abajo tienen una mayor probabilidad de éxito, dado que los ligandos y modelos químicos líderes así identificados son bastante solubles en agua. Por ejemplo, si está disponible [^{15}N] proteína, pueden obtenerse espectros ^1H - ^{15}N -HSQC (correlación cuántica heteronuclear simple) 2D con y sin ligando añadido para localizar el sitio de fijación de ligando en la proteína. En los casos en que la proteína es suficientemente pequeña (peso molecular inferior a aproximadamente 30.000) y se desea la caracterización ulterior de las interacciones proteína/ligando, pueden realizarse experimentos NMR 3D sobre complejos [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$] proteína/[$^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$]ligando. Pueden realizarse también intentos para impregnar modelos químicos líderes identificados por este método en cristales de proteínas existentes, o para formar co-cristales.

Ejemplos

Los objetos y ventajas de esta invención se ilustran adicionalmente por los ejemplos que siguen, pero los materiales particulares y cantidades de los mismos indicadas en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no deben interpretarse como indebidamente limitantes de esta invención, que se define en las reivindicaciones.

Introducción a la Espectroscopia NMR de Inyección de Flujo

Las técnicas de espectroscopia NMR de flujo están siendo utilizadas crecientemente en el descubrimiento y desarrollo de fármacos (B.J. Stockman, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.*, **3**, 269-274 (2000)). La técnica fue aplicada por primera vez para acoplar las características de separación de la cromatografía líquida con las capacidades analíticas de la espectroscopia NMR (N. Watanabe *et al.*, *Proc. Jpn. Acad. Ser B*, **54**, 194 (1978)). Desde entonces, la HPLC-NMR, o LC-NMR como se conoce más comúnmente la misma, ha sido aplicada extensamente a la bioquímica de productos naturales, el metabolismo de los fármacos y estudios de toxicología de fármacos (J. C. Lindon *et al.*, *Prog. NMR Spectr.*, **29**, **1** (1996); J. C. Lindon *et al.*, *Drug. Met. Rev.*, **29**, 705 (1997); B. Vogler *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **61**, 175 (1998); y J.-L. Wolfender *et al.*, *Curr. Org. Chem.*, **2**, 575 (1998)). La abundancia y complejidad de los datos disponibles de las dos últimas aplicaciones, han creado el potencial para la metabolómica basada en NMR a fin de complementar la genómica y la proteómica (J.K. Nicholson *et al.*, *Xenobiotica*, **29**, 1181 (1999)). El análisis de flujo interrumpido en LC-NMR, donde el flujo cromatográfico se detiene para obtener un espectro NMR con relación mayor de señal a ruido y se reinicia luego cuando ha terminado la recogida del espectro, fue el precursor para los sistemas de inyección de flujo que se describirán en esta memoria. La mayor diferencia entre los dos sistemas es que uno incluye un componente de separación (columna LC) y el otro no lo hace. La rápida potencia posible para las muestras de química combinatoria y las mezclas proteína/molécula pequeña ha permitido que los métodos NMR de inyección de flujo impacten en la química medicinal y el cribado de proteínas (P. A. Keifer, *Drugs Fut.*, **23**, 301 (1998); P. A. Keifer, *Drug Disc. Today*, **2**, 468 (1997); P. A. Keifer, *Curr. Opin. Biotech.*, **10**, 34 (1999); K. A. Farley *et al.*, SMASH'99, Argonne, IL, 15-18 agosto 1999; y A. Ross *et al.*, *Biomol. NMR*, **16**, 139 (2000)).

Los cambios en los desplazamientos químicos, las propiedades de relajación o coeficientes de difusión que aparecen como resultado de la interacción entre una proteína y una molécula pequeña han sido documentados desde hace muchos años (para revisiones crecientes véase E.J. Shapiro *et al.*, *Curr. Opin. Drug. Disc. Dev.*, **2**, 396 (1999); J. M. Moore, *Biopolymers*, **51**, 221 (1999); y B. J. Stockman, *Prog. NMR Spectr.*, **33**, 109 (1998)). Los fenómenos observables utilizados típicamente para detectar o monitorizar las interacciones son cambios de desplazamiento químico para las resonancias de proteínas enriquecidas en ligando o en isótopos (J. Wang *et al.*, *Biochemistry*, **31**, 921 (1992)), ensanchamiento de líneas (D. L. Rabenstein, *et al.*, *J. Magn. Reson.*, **34**, 669 (1979); y T. Scherf *et al.*, *Biophys. J.*, **64**, 754 (1993)), cambio en el signo del NOE de positivo a negativo (P. Balaram *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4017 (1972); y A. A. Bothner-By *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, **222**, 668 (1972)), o difusión restringida (A.J. Lennon *et al.*, *Biophys. J.*, **67**, 2096 (1994)) para el ligando. En su mayor parte, estos estudios se han concentrado en sistemas proteína/ligando en los cuales la molécula pequeña se sabía ya que era un ligando o se suponía que lo era. En los últimos años, sin embargo, el trabajo de los laboratorios de Fesik (S. B. Shuker *et al.*, *Science*, **274**, 1531 (1996); y P. J. Hajduk *et al.*, *J.*

Am. Chem. Soc., **119**, 12257 (1997)), Meyer (B. Meyer *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **246**, 705 (1997)), Moore (J. Fejzo *et al.*, *Chem. Biol.*, **6**, 755 (1999)), Shapiro (M. Lin *et al.*, *J. Org. Chem.*, **62**, 8930 (1997)), y Dalvit (C. Dalvit *et al.*, *J. Biomol NMR*, **18**, 65-68 (2000)) ha demostrado la aplicabilidad de estos mismos métodos generales como instrumento de cribado para identificar ligandos a partir de mezclas de moléculas pequeñas.

Estos protocolos de cribado implican típicamente la preparación de una serie de muestras individuales en tubos NMR de vidrio y el uso de un tomador de muestras automático para conseguir una potencia razonable. Las variaciones en volumen o posición que existen durante la preparación de las muestras o la inserción de los tubos pueden requerir sintonización y calibración de la sonda entre cada muestra, reduciendo con ello la potencia de recogida de datos.

En contraste, la NMR de inyección de flujo presenta varias ventajas. La celda de flujo estacionaria proporciona inmovilización y compensación magnética uniformes de una muestra a la siguiente, y, con las bobinas de radiofrecuencia montadas directamente en la superficie de vidrio de la celda de flujo, alta sensibilidad. De este modo es posible una potencia de recogida de datos rápida. El uso de un manipulador de líquidos para preparar e inyectar las muestras, tal como el manipulador de líquidos Gilson 215 utilizado en los sistemas Bruker y Varian, tolera el potencial para la preparación de muestras por vía rápida (A. Ross *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **16**, 139 (2000)), maximizando así la integridad y uniformidad de la muestra. Dado que se evita el uso y/o la reutilización de tubos NMR de vidrio, se minimizan los costes.

Hardware y Software de Adquisición de Datos

Un sistema NMR de flujo típico se compone de un imán, una consola de NMR, una terminal de trabajo de computación, un manipulador de muestras Gilson, y una sonda de inyección de flujo. Actualmente dos vendedores ofrecen sistemas de inyección de flujo completos: Bruker Instruments y Varian Instruments. Adicionalmente, Nalorac Corporation fabrica una sonda LC que puede utilizarse también para el cribado NMR de inyección de flujo. Un esquema del Bruker Efficient Transport System (BEST) fabricado por Bruker Instruments se muestra en la Figura 3. El manipulador de muestras Gilson 215 suministrado por Bruker está equipado con dos válvulas Rheodyne 819. La primera válvula está fijada a una jeringuilla de 5 ml, el capilar de aguja en el brazo de inyección del manipulador de muestras, el capilar puente, el cubeta de residuos, y la segunda válvula. La segunda válvula Rheodyne está fijada a la entrada y salida de la muestra, la fuente de nitrógeno gaseoso, la primera válvula, y la abertura de inyección. Se utiliza tubo de teflón FEP en todas las conexiones, con la excepción de la conexión de gas, que utiliza tubo PEEK.

Se inyecta una muestra en la sonda Bruker por llenado del capilar de aguja y transferencia de la muestra al tubo de entrada para la sonda utilizando la segunda válvula Rheodyne. En modo rápido, la muestra siguiente se carga en el tubo durante la adquisición del espectro de la muestra previa. Cuando se ha completado la adquisición del espectro, la primera muestra sale de la sonda por el capilar de salida. Esta acción aspira la muestra siguiente al interior de la sonda a través de la abertura de entrada, y la adquisición del espectro puede comenzar inmediatamente. La adquisición en modo rápido puede ahorrar aproximadamente 1 minuto por muestra respecto al tiempo que sería necesario para cargar individualmente cada muestra. Sin embargo, la recuperación de la muestra no es actualmente una opción con este método. Para recuperar una muestra, cada muestra se inyecta individualmente utilizando adquisición de modo normal. La muestra se recupera por selección de nitrógeno gaseoso o bien la jeringuilla para retirar la muestra desde la sonda a través del tubo de entrada. La muestra puede devolverse luego al manipulador de líquidos Gilson hasta su pocillo original o a una nueva placa de 96 pocillos. Recientemente se ha añadido una unidad de recuperación al sistema BEST a fin de mejorar la eficiencia de recuperación de la jeringuilla utilizando el nitrógeno gaseoso para crear una contrapresión en la muestra.

Dos accesorios útiles disponibles para el sistema BEST son un conmutador de disolvente Valvemate y un tubo de transferencia calentada. El conmutador de disolvente se añadió al sistema de flujo para el químico combinatorio que desee analizar muestras en diversos disolventes orgánicos, pero puede utilizarse también para un cribado de biblioteca a fin de variar las condiciones del tampón o para limpiar la sonda con un ácido o una base. La línea de transferencia calentada se utiliza para equilibrar la temperatura de la muestra a la temperatura de la sonda durante la transferencia de la muestra. Tanto la línea de transferencia capilar de entrada como la de salida están roscadas a la línea de transferencia calentada. Esta característica es deseable cuando el tiempo de análisis del espectro es corto y se requiere una alta potencia de muestras. En el caso ideal, la adquisición de datos utilizando este accesorio puede comenzar inmediatamente después que la muestra entra en la sonda. Algunas muestras pueden requerir todavía un periodo de equilibración de temperatura después de la entrada de la sonda.

La disposición del sistema Versatile Automated Sample Transport (VAST) producido por Varian es similar al sistema Bruker. El sistema VAST está constituido por un manipulador de líquidos Gilson 215, una sonda de flujo NMR Varian, una consola NMR, y una terminal de trabajo Sun. El manipulador de líquidos Gilson suministrado por Varian está equipado con una válvula simple Rheodyne 819 y está conectado a la sonda de flujo NMR con tubo PEEK de diámetro interior 0,3 mm [0,010 pulgadas] (P.A. Keifer *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **2**, 151 (2000)). En el diseño del sistema Varian, el manipulador de las muestras inyecta un volumen especificado de muestra en la sonda, se adquieren los datos, y se invierte luego el flujo de líquido a través del tubo, retornando la muestra a su vial o pocillo original. El retorno de la muestra al Gilson por la bomba de jeringuilla se ve ayudado por una válvula Valco y nitrógeno gaseoso que suministran cierta contrapresión a la porción de salida de la sonda de flujo Varian. Con la disposición del sistema VAST, se lava la sonda inmediatamente antes de la inyección de la muestra y se seca luego con nitrógeno gaseoso para minimizar la dilución de la muestra durante la inyección. El diseño Varian proporciona una recuperación excelente de

la muestra sin dilución, pero se recomienda encarecidamente que las muestras se filtren a fin de evitar la obstrucción de las líneas de transferencia capilares (P.A. Keifer *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **2**, 151 (2000)).

Los sistemas de flujo NMR son idealmente adecuados para uso con los imanes protegidos fabricados por Bruker Instruments u Oxford Magnets. La protección activa de un imán de 600 MHz reduce la línea radial de 5 Gauss desde aproximadamente 4 metros a menos de 2 metros, lo que permite que el manipulador de líquidos Gilson se coloque notablemente más próximo al imán. Esto reduce la longitud de tubo necesaria entre la válvula Rheodyne y la sonda de inyección de flujo y minimiza el tiempo de transferencia de la muestra. Las posibilidades de obstrucción y dilución de la muestra se reducen concomitantemente.

Bruker utiliza dos paquetes de software para ejecutar el sistema BEST: BEST Administrator e ICONNMR (paquetes de software de Bruker Instruments, AMIX, BEST e ICONNMR). El BEST-Administrator se activa tecleando el comando "BESTADM" en XWINNMR. Esta porción del software se utiliza durante la generación y optimización del método. Las muestras se inyectan en la sonda de una en una y los datos se recogen en XWINNMR. Las versiones iniciales del software BEST utilizaban tres programas separados: CFBEST, SUBEST y OTBEST. Estas funciones se combinaron recientemente en el paquete individual de software, BEST Administrator. Adicionalmente, los parámetros disponibles para personalización han sido expandidos notablemente para incluir cambio de disolvente y cambio de método automáticos, que no estaban disponibles en versiones anteriores del software. El paquete de software ICONNMR se utiliza después que se ha optimizado un método de flujo con el BEST Administrator. Este paquete está dispuesto para automatización total y es el mismo software utilizado con los cambiadores de muestra de tubos NMR automáticos. De manera similar, el software Varian utiliza el comando "GILSON" para genera un método antes de iniciar la inyección de la muestra y la adquisición de los datos utilizando Enter/Autogo en VNMR (Varian NMR Systems, paquete de software VNMR).

Calibración de la Sonda de flujo y Optimización del Sistema

Además de las longitudes de pulso normales de 90° y los niveles de potencia que se calibran para cualquier sonda NMR, se requieren varias calibraciones adicionales para una sonda de flujo. Los tres volúmenes adicionales requeridos para calibrar una sonda de flujo Bruker se muestran esquemáticamente en la Figura 4 (Bruker Instruments, paquetes de software AMIX, BEST e ICONNMR). El primer volumen calibrado es el volumen total de sonda. Esto puede realizarse por inyección de un líquido coloreado en la entrada de una sonda seca con una jeringuilla y espera hasta que aparezca el líquido en la abertura de salida (aproximadamente 700-800 μ l para una sonda de flujo de 5 mm). Con el sistema Varian, el volumen de llenado del sistema incluye también el tubo capilar que conecta la abertura del inyector con la sonda de flujo (P.A. Keifer *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **2**, 151 (2000)). Este volumen se utiliza para calcular la distancia requerida para la reposición de una muestra desde el manipulador de muestras Gilson al centro de la celda de flujo en la sonda.

El segundo volumen calibrado es el volumen de la celda de flujo. Este es el volumen de líquido requerido para llenar completamente en el serpentín alrededor de la celda de flujo. Los tres vendedores de sondas de flujo (Bruker, Varian y Nalorac) tienen sondas disponibles con volúmenes activos que van desde 30 a 250 μ l. EL volumen estipulado de la celda de flujo en una sonda de flujo Bruker de 5 mm es 250 μ l, pero el mismo se calibró de modo que fuese aproximadamente 300 μ l. Este volumen puede calibrarse realizando inyecciones repetidas de una muestra estándar, comenzando con un volumen menor que el volumen activo estipulado de la sonda, y recogiendo un espectro 1D¹H NMR. El volumen de inyección puede aumentarse luego por incrementos hasta que no se observa ya mejora adicional alguna en la relación de señal a ruido.

Además de las dos calibraciones del volumen de la sonda expuestas anteriormente, el software Bruker incluye también un tercer volumen para calibración. Este volumen, al que se hace referencia como el volumen de posicionamiento, se utiliza para optimizar el centrado de una muestra en la celda de flujo. Versiones anteriores del software ICONNMR (anteriores a 3.0.a.9) no incluían la posibilidad de ajustar el volumen de posicionamiento. En lugar de ello, la bibliografía de Bruker sugería que el volumen de la celda de flujo debería duplicarse aproximadamente para tener la seguridad de que la muestra llenara por completo el serpentín (paquetes de software Bruker Instruments, AMIX, BEST e ICONNMR). Afortunadamente, esto ya no es necesario. El volumen de posicionamiento puede utilizarse ahora para optimizar la posición de la muestra. Esta calibración reducía el tamaño de muestra requerido para inyección desde 450 μ l en los primeros cribados de pocas proteínas a 300 μ l para los cribados actuales utilizando una sonda de flujo Bruker de 5 mm con un volumen activo de 250 μ l. La optimización de este parámetro minimizó el volumen de muestra requerido para cada espectro. Es un factor importante que esto reducía significativamente la cantidad total de proteína (u otra diana) a una concentración dada necesaria para cribar la presente biblioteca de moléculas pequeñas. El volumen de posicionamiento puede optimizarse por recogida de una serie de espectros en una muestra estándar. En cada espectro recogido, el volumen de posicionamiento puede modificarse primeramente en incrementos grandes (50-100 μ l) para obtener una estimación grosera del volumen. Un ejemplo de tres de tales espectros se muestra en la Figura 5. El volumen de posicionamiento puede modificarse luego en incrementos menores (10-25 μ l) para identificar el volumen óptimo para este parámetro. La relación óptima de señal a ruido se obtuvo para la presente sonda de flujo Bruker de 5 mm en un DRX-600 cuando el volumen de posicionamiento se ajustó a +25 μ l, pero este volumen es específico de la sonda y se calibra para cada sonda de flujo.

La optimización de un sistema de inyección de flujo para cribado tiene tres objetivos principales. El primer objetivo es transferir una muestra acuosa al centro de la celda de flujo para análisis utilizando parámetros determinados durante

la calibración de la sonda de flujo arriba descrita. El segundo objetivo es reposicionar una muestra procedente del manipulador líquido Gilson en la sonda de inyección de flujo sin burbujas y con una dilución mínima de la muestra. Esto puede conseguirse utilizando nitrógeno como gas de transferencia (que mantiene el sistema bajo presión) y utilizando una serie de disolventes de entrada y salida. En los experimentos realizados por los autores de la invención, se utilizaban típicamente 150 μl de $^2\text{H}_2\text{O}$ como disolvente de entrada, 20 μl de nitrógeno gaseoso, 300 μl de muestra, 20 μl de nitrógeno gaseoso, y 100 μl de $^2\text{H}_2\text{O}$ como disolvente de salida. Alternativamente, puede utilizarse un volumen mayor de muestra en lugar de los disolventes de empuje. El tercer objetivo es determinar un procedimiento de limpieza que sea capaz de reducir el arrastre de la muestra hasta menos de 0,1%. Típicamente, esto implica lavar la sonda con un volumen predeterminado de agua. El ciclo de lavado puede ir seguido también por un ciclo seco, en el cual las tubos capilares y la sonda de flujo se secan con nitrógeno gaseoso para minimizar ulteriormente la dilución de la muestra. En los experimentos de los inventores, se utilizó típicamente un volumen de lavado de 1 ml seguido por un tiempo de secado de 30 segundos con nitrógeno gaseoso.

Diseño de Bibliotecas de Cribado de Moléculas Pequeñas

Con la prevalencia creciente de equipo de cribado de potencia extremadamente alta en la industria farmacéutica, puede parecer contrario a la intuición sugerir el cribado de colecciones de compuestos más pequeñas en un ensayo basado en NMR. Sin embargo, una correlación entre la calidad de los aciertos obtenidos y el número de compuestos cribados no ha sido bien documentada. De hecho, los compuestos se añaden típicamente a las colecciones de cribado no para aumentar simplemente sus números, sino para aumentar la diversidad y calidad de la colección de compuestos. Así, si se pudieran lograr aciertos convenientes a partir de una colección más pequeña de compuestos bien seleccionados, podría no ser necesario gastar el tiempo y los recursos químicos para cribar la biblioteca completa de compuestos contra cada diana individual. Los aciertos así identificados podrían utilizarse luego para concentrar los esfuerzos ulteriores de cribado o para dirigir síntesis combinatorias, ahorrando así a la vez tiempo y recursos químicos, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. Un cribado basado en NMR, al igual que otros ensayos de fijación, presenta la ventaja de que no tiene que desarrollarse necesariamente un ensayo funcional de alta potencia. Esto se hará cada vez más importante a medida que se derivan números mayores de dianas de interés para la investigación farmacéutica como resultado de los esfuerzos de genómica, y por consiguiente puede no disponerse de una función conocida que pueda ser ensayada.

Son posibles varios tipos de bibliotecas: bibliotecas de cribado general aplicables a muchos tipos de proteínas diana, bibliotecas dirigidas que están diseñadas con las características comunes de un sitio activo teniendo en cuenta que podría ser útil para el cribado de una serie de dianas de la misma clase de proteínas, tales como enzimas proteasa, y bibliotecas "de genómica funcional" compuestas de sustratos conocidos, cofactores e inhibidores para una serie diversa de enzimas que podrían ser útiles para definir la función de dianas genómicamente identificadas.

Idealmente, el tamaño y el contenido de una biblioteca de cribado general debería ser tal que el cribado pueda realizarse en un día o dos con una probabilidad favorable de identificar varios aciertos para cada una de las proteínas diana a cribar. En lugar de seleccionar simplemente de modo aleatorio una biblioteca de subconjuntos, se han implementado varios enfoques racionales. Éstos incluyen la biblioteca SHAPES desarrollada por Fejzo y colaboradores, que está compuesta en gran parte por moléculas que representan marcos encontrados comúnmente en moléculas de fármaco conocidas (J. Fejzo *et al.*, *Chem. Biol.*, **6**, 755 (1999)), bibliotecas tipo fármaco o tipo líder, y bibliotecas basadas en diversidad. Recientemente han aparecido varios estudios que discuten las propiedades de fármacos conocidos y métodos para distinguir entre compuestos tipo fármaco y no tipo fármaco (G.W. Bemis *et al.*, *J. Med. Chem.*, **39**, 2887 (1996); C. A. Lipinski *et al.*, *Adv. Drug Del. Rev.*, **23**, 3 (1997); Ajay *et al.*, *J. Med. Chem.*, **41**, 3314 (1998); J. Sadowski *et al.*, *J. Med. Chem.*, **41**, 3325 (1998); A. K. Ghose *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **1**, 55 (1999); J. Wang *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **1**, 524 (1999); y G. W. Bemis *et al.*, *J. Med. Chem.*, **42**, 5095 (1999)). La superposición de las propiedades tipo fármaco (E.J. Martin *et al.*, *J. Comb. Chem.*, **1**, 32 (1999)) o tipo líder (S.J. Teague *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3743 (1999)) en una serie de compuestos seleccionada por diversidad puede proporcionar la biblioteca de compuestos óptima. La distinción de tipo líder es importante dado que el ensayo basado en NMR está diseñado para identificar compuestos de afinidad débil que con la máxima probabilidad aumentarán en peso molecular y carácter lipófilo para llegar a ser candidatos de fármacos o incluso modelos químicos líderes (S.J. Teague *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3743 (1999)).

El desarrollo y la expansión de la biblioteca de cribado NMR de tipo líder de los autores de la presente invención para mimetizar la diversidad estructural de la colección mayor de compuestos de los autores de la invención ha hecho uso del software Diverse Solutions para diversidad química (R.S. Pearlman *et al.*, *Persp. Drug Disc. Des.*, **9/10/11**, 339 (1998)). En este enfoque, cada compuesto se describe por una serie de descriptores, que son espacios métricos en química. En muchos casos se utilizan seis descriptores ortogonales, relacionados con subestructuras en oposición a la molécula entera. Si bien los descriptores a utilizar pueden seleccionarse automáticamente para maximizar la diversidad, típicamente existen dos, que corresponden cada uno a carga, polarizabilidad y enlaces de hidrógeno. Se emplea un algoritmo de diversidad basado en celdas para dividir los ejes de los descriptores en cubos y con ello en una red de hipercubos multidimensionales. Como ejemplo del modo en que puede utilizarse esto para construir o expandir una pequeña biblioteca de cribado, considérese la selección de 1000 compuestos a partir de una biblioteca de compuestos de 250.000 compuestos. En primer lugar, se utiliza el algoritmo basado en celdas para repartir los 250.000 compuestos en aproximadamente 1000 celdas. El número de compuestos por celda variará y algunas estarán vacías. Se obtendrá la diversidad estructural máxima tomando un compuesto de cada celda ocupada (y tan próxima al centro como sea posible). Los compuestos reales seleccionados están basados en propiedades deseables de tipo

líder tales como peso molecular bajo y carácter hidrófilo así como disponibilidad y ausencia de reactividad química como se explica más adelante. Los huecos de diversidad, como se ilustran por las celdas vacías, pueden llenarse de fuentes externas o por síntesis químicas si se desea. La identificación y el llenado de los huecos de diversidad son importantes dado que a menudo colecciones mayores de compuestos están ponderadas acusadamente en ciertas clases de compuestos partiendo de proyectos de investigación previos.

Un ejemplo de selección de subconjuntos basada en diversidad utilizando estos métodos se muestra en la Figura 6. En este caso, los 6.436 compuestos del índice Comprehensive Medicinal Chemistry se han dividido en 2012 celdas para maximizar la diversidad utilizando cinco descriptores de espacio químico. La representación bidimensional proyectada en el aceptor de enlaces de hidrógeno y los ejes de carga BCUT se muestra en color gris. Los cuadrados negros corresponden a los 1474 compuestos tipo líder (peso molecular menor que 350 y $1 < \text{cLogP} < 3$) contenidos en el índice CMC. Un total de 806 de las 2012 celdas estaban ocupadas por compuestos tipo líder. Podría utilizarse un enfoque similar para seleccionar diversos compuestos tipo líder a partir de una gran colección de compuestos combinada.

El concepto celda de espacio estructural es muy útil después que se ha completado el cribado. Cuando se identifica un acierto, otros compuestos de la misma celda o de celdas próximas son candidatos obvios para ensayos secundarios. Esto puede interpretarse como la analogía de la mina de oro: cuando se encuentra oro, la búsqueda se continúa óptimamente en la proximidad inmediata.

Además de la diversidad estructural, existen otras características que pueden considerarse cuando se seleccionan las moléculas del subconjunto. Éstas incluyen pureza, identidad, reactividad, propiedades toxicológicas, peso molecular, solubilidad en agua, e idoneidad para elaboración química por métodos tradicionales o combinatorios. Tiene sentido poblar la biblioteca de cribado con compuestos de alta integridad que no están destinados a fracasar calle abajo. El tiempo gastado inicialmente para asegurar pureza e identidad con los análisis LC-MS o LC-NMR ahorrará recursos aguas abajo. Pueden utilizarse herramientas de filtración para evitar compuestos que se sabe son altamente reactivos, tóxicos, o que tienen propiedades metabólicas deficientes. La carencia de reactividad es importante, dado que los compuestos pueden cribarse más eficientemente en forma de mezclas. Al cual que otros laboratorios (S. B. Shuker *et al.*, *Science*, **274**, 1531 (1996); B. Meyer *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **246**, 705 (1997); J. Fejzo *et al.*, *Chem. Biol.*, **6**, 755 (1999); y M. Lin *et al.*, *J. Org. Chem.*, **62**, 8930 (1997)), los autores de la presente invención agrupan típicamente las pequeñas moléculas seleccionadas en mezclas de 6-10 compuestos para cribado (K.A. Farley *et al.*, SMASH'99, Argonne, IL, 15-18 agosto de 1999).

Los compuestos seleccionados para la biblioteca de diversidad de los inventores son de tipo líder en oposición al tipo fármaco. Sucede a menudo que las elaboraciones químicas para mejorar la afinidad aumentan también el peso molecular y reducen la solubilidad (S.J. Teague *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3743 (1999)). Por tanto, el peso molecular de los compuestos no debería exceder de aproximadamente 350. Dado que la mayoría de los éxitos alcanzados tendrán afinidades para su diana en el intervalo de aproximadamente 100 μM , el peso molecular bajo dejará sitio para elaboración química a fin de acumular más afinidad y selectividad. La utilización de compuestos tipo fármaco de peso molecular mayor no mejoraría sustancialmente la afinidad de los aciertos y podría impedir fácilmente la obtención de modelos químicos líder de tamaño razonable. Los aciertos de tipo líder que son razonablemente solubles en agua permiten una elaboración química que da como resultado un carácter lipófilo moderadamente incrementado de la entidad terapéutica final (S.J. Teague *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3743 (1999)). La solubilidad en agua es también importante dado que aumenta el éxito potencial de estudios aguas abajo tales como calorimetría, enzimología, co-cristalización y estudios estructurales NMR. La solubilidad de los compuestos es especialmente importante para los métodos NMR de inyección de flujo a fin de prevenir la obstrucción de los tubos capilares.

Los compuestos deberían seleccionarse también por su idoneidad para elaboración química teniendo en cuenta métodos de química tradicional o combinatoria. Los aciertos con manipuladores fáciles para química de síntesis presentarán mayor interés y permitirán un uso más eficiente de los recursos de química medicinal, a menudo limitados.

Métodos de Cribado NMR de Inyección de Flujo Editados con Relajación o Basados en WaterLOGSY

La calibración y validación del sistema de flujo y la creación de una biblioteca de cribado de moléculas pequeñas proporciona un sistema automático que está listo para cribar nuevas dianas. Una diana proteínica puede analizarse en lo referente a interacciones proteína-ligando utilizando métodos relajación-edición por adición de proteína suficiente a cada pocillo de la placa de la biblioteca de 96 pocillos para dar una relación 1:1 (proteína:ligando) a una concentración de aproximadamente 50 μM . La dispersión homogénea de la muestra en todo el pocillo puede facilitarse por agitación de la placa en un aparato de sacudidas de fondo plano. El cribado a esta concentración permite la adquisición de un espectro 1D ^1H NMR adecuado en aproximadamente 10 minutos. En la experiencia de los inventores, esta concentración de diana y molécula pequeña requiere que los ligandos identificados tengan afinidades del orden de aproximadamente 200 μM o más estrictas.

Una vez que se ha preparado la placa de cribado, el manipulador de muestras líquidas Gilson transfiere las muestras desde las placas de 96 pocillos a la sonda de inyección de flujo y, en caso deseado, hace volver las muestras nuevamente a la placa de 96 pocillos original o a una nueva placa. Una vez que la muestra se encuentra en el imán, pueden obtenerse

espectros que pueden detectar cambios en desplazamientos químicos, propiedades de relajación, o propiedades de difusión.

La fijación se detecta utilizando la técnica WaterLOGSY. Se utilizan niveles extremadamente bajos de diana (1-10 μM) con relaciones de ligando a diana de 100:1 a 10:1. Para análisis de los datos, los compuestos que se fijan se diferencian de los compuestos de los que no se fijan por el signo opuesto de sus NOEs agua-ligando. En contraste con la técnica editada con Relajación, se utiliza únicamente un solo espectro WaterLOGSY para cada mezcla de ligandos. No hay necesidad alguna de obtener un espectro de referencia en ausencia de proteína diana. Un ejemplo se ilustra en la Figura 7 para una mezcla de compuestos y una proteína diferente. En el espectro WaterLOGSY que se muestra en la Figura 7, los compuestos que se fijan tienen resonancias de intensidad opuesta (picos positivos puntiagudos) que los compuestos que no se fijan (intensidad prácticamente cero o picos negativos puntiagudos). Las resonancias residuales de proteínas son también de intensidad positiva.

Análisis de los Datos

El desarrollo de sondas de flujo han facilitado la transición a NMR de alta potencia y ha hecho posible la recogida rutinaria de volúmenes enormes de datos. Desarrollos recientes de software han hecho progresar la manipulación automática de grandes series de datos recogidas en bibliotecas de química combinatoria (P.A. Keifer *et al.*, *J Comb. Chem.*, **2**, 151 (2000); Bruker Instruments, paquetes de software AMIX, BEST e ICONNMR; Varian NMR Systems, paquete de software VNMR; y Williams A, Book of Abstracts, 218th ACS National Meeting (1999)). La visualización de los resultados en un formato de 96 pocillos permite la evaluación rápida de las series de datos. La integración de características tales como ésta en un paquete de software adaptado más para reducción de datos y evaluación de series de datos de cribado de bibliotecas corre parejas con el desarrollo de software de química combinatoria, pero se mantiene ligeramente por detrás. Sin embargo, avances recientes que se han logrado para análisis de datos de química combinatoria auguran desarrollos similares para la automatización de los datos de cribado de fijación de proteínas.

En las series de datos WaterLOGSY de los inventores, los compuestos que se fijan se distinguen de los compuestos de no-fijación por el signo opuesto de sus NOEs agua-ligando, como se observa en la Figura 7. Se realiza una comparación con un espectro de control de molécula pequeña asignado, para identificar el compuesto asociado con las resonancias indicadas.

Otros laboratorios se han basado en espectros de diferencia para analizar series de datos 1D ^1H NMR editados con relajación o difusión (P. J. Hajduk *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 12257 (1997); N. Gonnella *et al.*, *J. Magn. Reson.*, **131**, 336 (1998); y A. Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 414 (2000)). Después de una serie de sustracciones espectrales, el espectro resultante representa las resonancias de los compuestos que se fijan a la proteína. Dos factores que plantean problemas son el ensanchamiento de líneas y las resonancias de desplazamiento, pudiendo conducir ambos a artefactos de sustracción. Los cambios de intensidad pueden introducir también la necesidad de un factor de escalación en el paso de análisis de los datos. Estos pasos adicionales, que pueden variar de un espectro al siguiente, hacen complejas las estrategias para el análisis automático de los datos.

El análisis de los datos para los métodos de cribado 2D implica típicamente el análisis de perturbaciones de desplazamiento químico de las proteínas indicativas de la fijación de ligandos (A. Ross *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **16**, 139 (2000); y S. B. Shuker *et al.*, *Science*, **274**, 1531 (1996)), o el análisis de cambios en las señales procedentes de las moléculas pequeñas en los espectros NOE o DECODES indicativos de fijación (B. Meyer *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **246**, 705 (1997); J. Fejzo *et al.*, *Chem. Biol.*, **6**, 755 (1999); y M. Lin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5249 (1997)). Si bien pueden compararse manualmente una serie de espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC, el análisis automático utilizando a la vez enfoques no estadísticos y estadísticos de una serie de espectros ^1H - ^{15}N HSQC adquiridos con métodos NMR de inyección de flujo se ha demostrado recientemente (A. Ross *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **16**, 139 (2000)). Se utilizó AMIX para el análisis no estadístico por comparación de los espectros recogidos en presencia de compuestos simples con el espectro de referencia de la proteína sola. A continuación, utilizando cálculos de "bucketing" para reducción de datos, se generó una tabla clasificada por el coeficiente de correlación. No se observó correlación alguna utilizando los cálculos de bucketing solos. Subsiguientemente, se analizaron patrones de integración para la totalidad de los 300 espectros de moléculas pequeñas por AMIX a fin de generar una matriz de datos de N regiones de integración por 300. Se utilizó luego Un paquete de software estadístico, UNSCRAMBLER 6.0, para analizar esta matriz de datos utilizando análisis de los componentes principales. Se observaron dos clases de cambios espectrales. Finalmente, se encontró una clase que correspondía a cambios de pH causados por ciertas moléculas pequeñas, mientras que la otra clase correspondía a moléculas pequeñas que se fijaban a la proteína diana (A. Ross *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **16**, 139 (2000)).

La reducción de datos es un aspecto importante para la manipulación de las cantidades de datos generadas si se pretende alcanzar éxito en el cribado de alta potencia por NMR. Métodos no estadísticos tales como los cálculos de bucketing de AMIX (Bruker Instruments, paquetes de software AMIX, BEST e ICONNMR) o las comparaciones de bases de datos de ACD (Williams A, Book of Abstracts, 218th ACS National Meeting (1999)) comparan desplazamiento químico, multiplicidad, regiones de y patrones integración para proporcionar factores de correlación entre espectros. Estos paquetes de software pueden utilizarse para reducción de datos tanto mono- como bidimensionales. Está disponible también software de predicción para prestar ayuda en la interpretación de series de datos. Pueden utilizarse métodos estadísticos tales como análisis de los componentes principales para analizar datos para otras correlaciones que no son evidentes utilizando exclusivamente métodos no estadísticos. En el caso de datos 2D ^1H - ^{15}N

HSQC, se ha descrito también un método adaptativo multivariante que incorpora un mapeado ponderado de perturbaciones para correlacionar información dentro de un espectro o en muchos espectros (F. Delaglio, CHI Conference on NMR Technologies: Development and Applications for Drug Discovery, Baltimore, MD, 4-5 noviembre 1999).

5 Comparación de los Métodos de Flujo Frente a los Tradicionales

La ventaja de trabajar con muestras en el entorno de cribado NMR de flujo es que cada serie de espectros se obtiene sobre muestras que se encuentran a la misma concentración. Esto acelera considerablemente la adquisición de los espectros. Dado que las muestras son bastante homogéneas, muchas de las tareas de rutina precisan completarse solamente en la primera muestra: sintonización de la sonda, calibración de pulsos ^1H a 90° , ganancia del receptor, número de transiciones, inmovilización, y compensación magnética de gradiente. En las muestras subsiguientes pueden omitirse estos pasos, aunque la compensación magnética simplex de Z_1 y Z_2 puede utilizarse todavía con las adquisiciones multidiarias.

Los requisitos previos para un ensayo de alta potencia incluyen recogida rápida de datos, integridad de muestra a muestra y costes mínimos. Se han desarrollado técnicas de flujo NMR teniendo en cuenta todos ellos. Para experimentos de cribado 1DH NMR, el proceso de retirada de la muestra previa de la celda de flujo, el lavado de la celda de flujo, la inyección de la muestra siguiente, el margen para equilibración térmica, la supresión automática de disolventes y la adquisición de los datos pueden llevar menos de 10 minutos. En la práctica, el uso de este procedimiento es dos a tres veces más rápido que un cambiador de muestras con tubos NMR convencionales. Si los compuestos se cribaran en mezclas de 10, esto da como resultado una potencia de aproximadamente 1500 compuestos por día. El uso de un manipulador de líquidos, tal como el Gilson 215 empleado típicamente por los sistemas NMR de flujo Bruker y Varian, puede simplificar también la preparación de las muestras. Ross y colaboradores han demostrado la preparación de muestras por vía rápida utilizando el manipulador de líquidos para mezclar la proteína a cribar con la molécula pequeña inmediatamente antes de la inyección (A. Ross *et al.*, *J. Biomol. NMR*, **16**, 139 (2000)). Las condiciones de la muestra pueden normalizarse así en alto grado, siendo los espectros resultantes muy consistentes y reproducibles. Aun cuando la proteína diana se añade manualmente a bibliotecas de cribado previamente dispuestas en placas, la cantidad de pipeteado es todavía menor que si se utilizan tubos NMR. Los gastos recurrentes asociados con la adquisición y/o limpieza de los tubos NMR se eliminan con los métodos NMR de inyección de flujo. El coste de las placas de microtitulación de 96 pocillos es insignificante comparado con los tubos NMR.

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de un compuesto que se fija a una molécula diana, comprendiendo el método:

seleccionar una biblioteca de compuestos de test que tienen cada uno una solubilidad en agua deuterada de al menos 1 mM a la temperatura ambiente y un peso molecular no mayor que 350 gramos/mol;

proporcionar una pluralidad de mezclas de los compuestos de test, encontrándose cada mezcla en una cubeta de muestra;

introducir una molécula diana en cada cubeta de muestra, a fin de proporcionar una pluralidad de muestras de test;

proporcionar un espectrómetro de resonancia magnética nuclear equipado con una sonda de inyección de flujo;

transferir cada muestra de test procedente de la cubeta de muestra a la sonda de inyección de flujo;

obtener un espectro de resonancia magnética nuclear WaterLOGSY para cada muestra en cada cubeta; y

analizar el espectro de cada muestra para distinguir los compuestos que se fijan de los compuestos que no se fijan, en virtud de los signos opuestos de sus efectos Overhauser nucleares agua-ligando;

en donde la concentración de la molécula diana y cada compuesto de test en cada cubeta de muestra no es mayor que 100 μM , y en donde la relación de molécula diana a cada compuesto de test en cada cubeta de muestra no es mayor que 1:1.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha relación es 1:100 a 1:10.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la concentración de molécula diana y de cada compuesto en cada muestra es al menos 25 μM .

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de molécula diana y de cada compuesto en cada muestra no es mayor que 50 μM .

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada mezcla se encuentra en una cubeta de muestra de un receptáculo de muestras de pocillos múltiples.

6. El método de la reivindicación 5, en donde el receptáculo de muestras de pocillos múltiples es una placa de microtitulación de 96 pocillos.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada compuesto de test tiene un peso molecular no mayor que 325 gramos/mol.

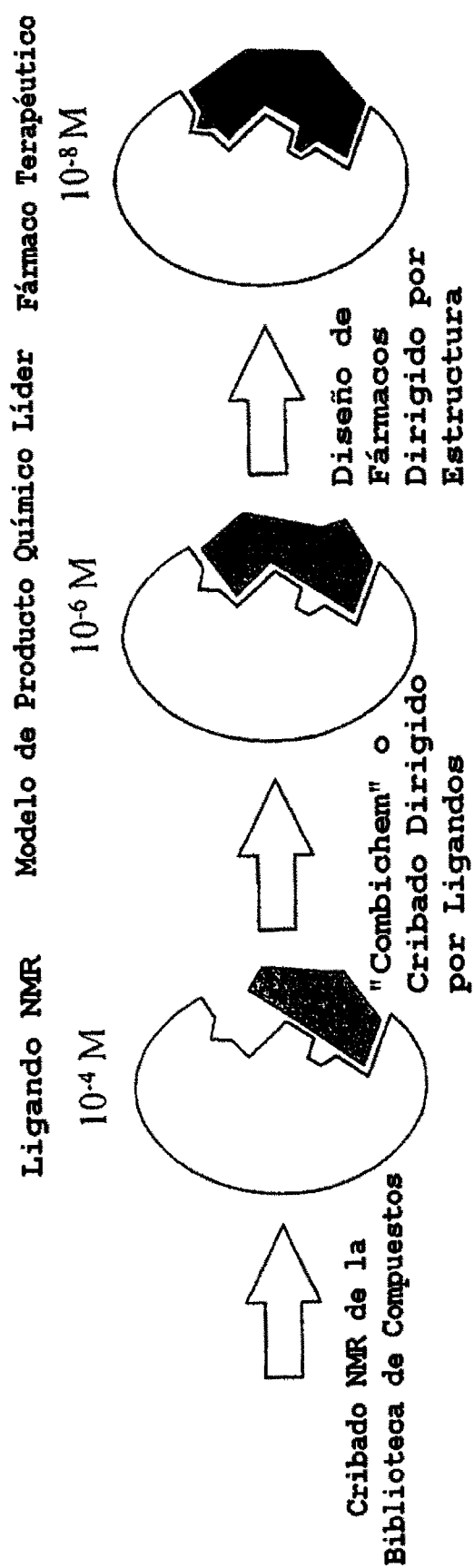
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada mezcla de compuestos comprende al menos tres compuestos, teniendo cada compuesto al menos una resonancia distinguible en un espectro 1D NMR de la mezcla.

9. El método de la reivindicación 8, en donde cada mezcla comprende al menos seis compuestos.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la constante de disociación de un compuesto que se fija a la molécula diana es al menos 100 μM .

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula diana es una proteína.

Figura 1



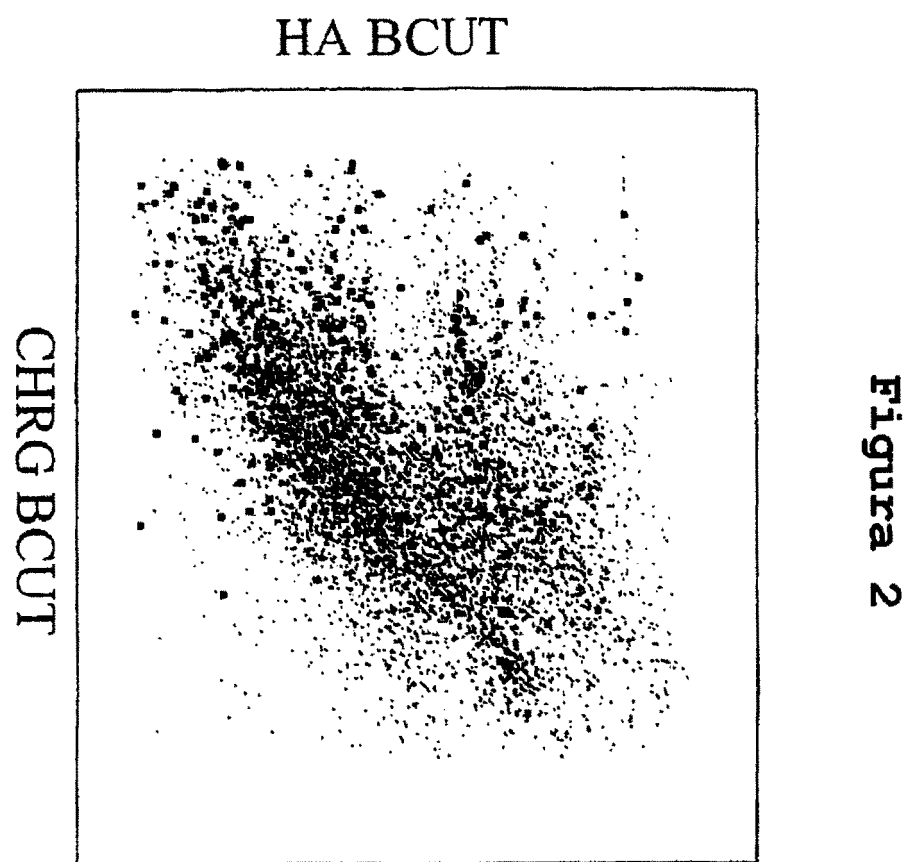


Figura 3

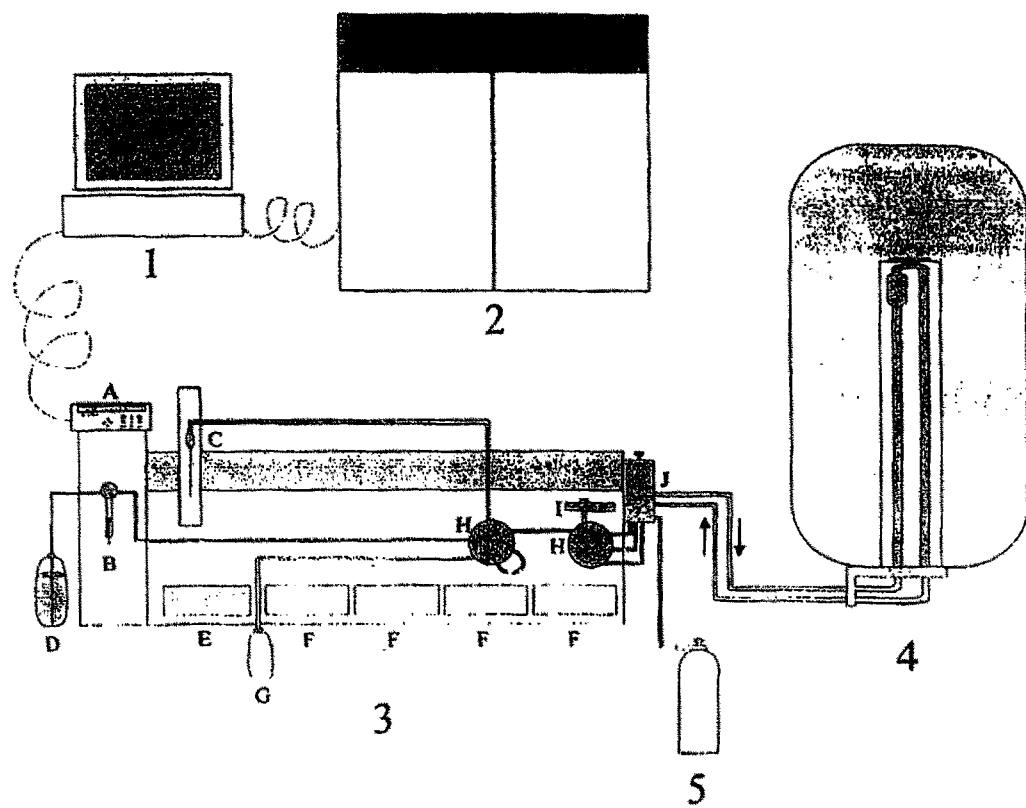


Figura 4

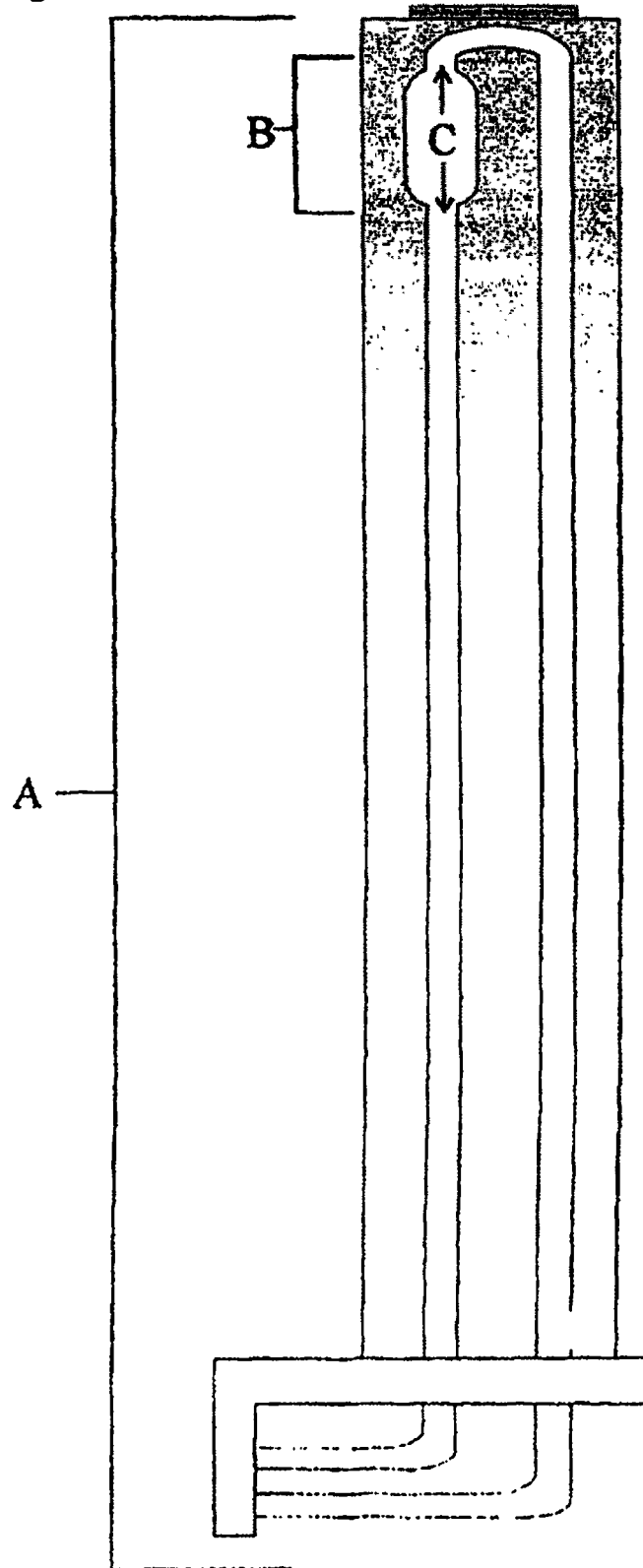


Figura 5

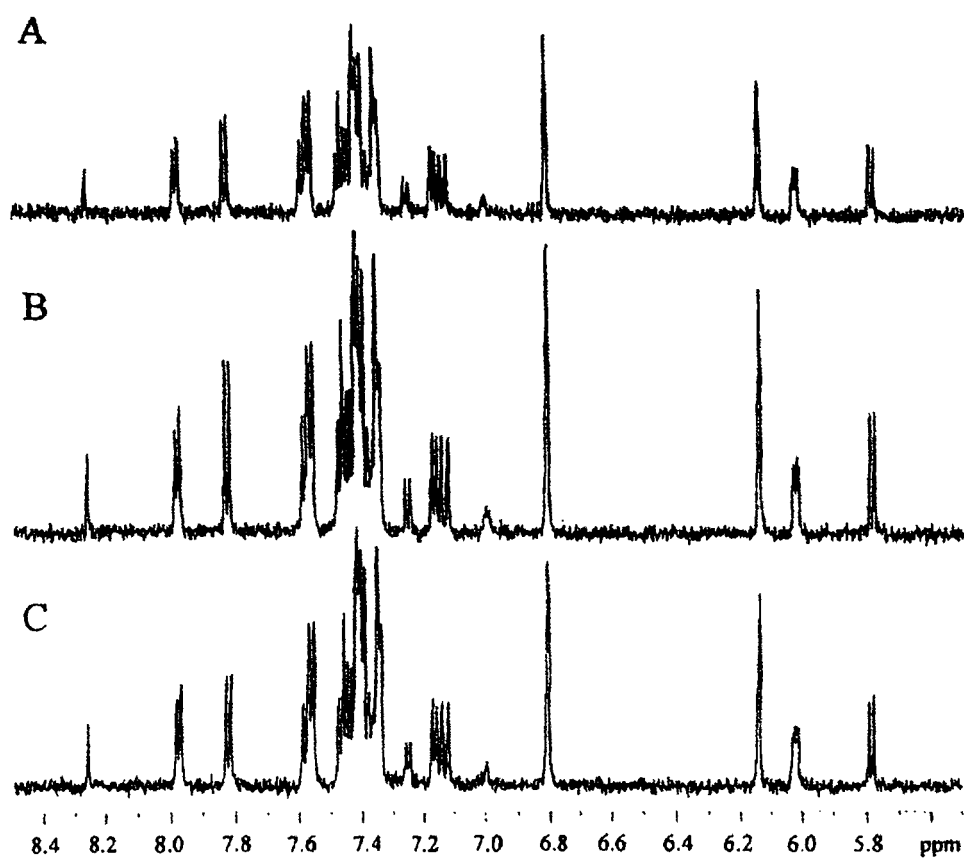


Figura 6

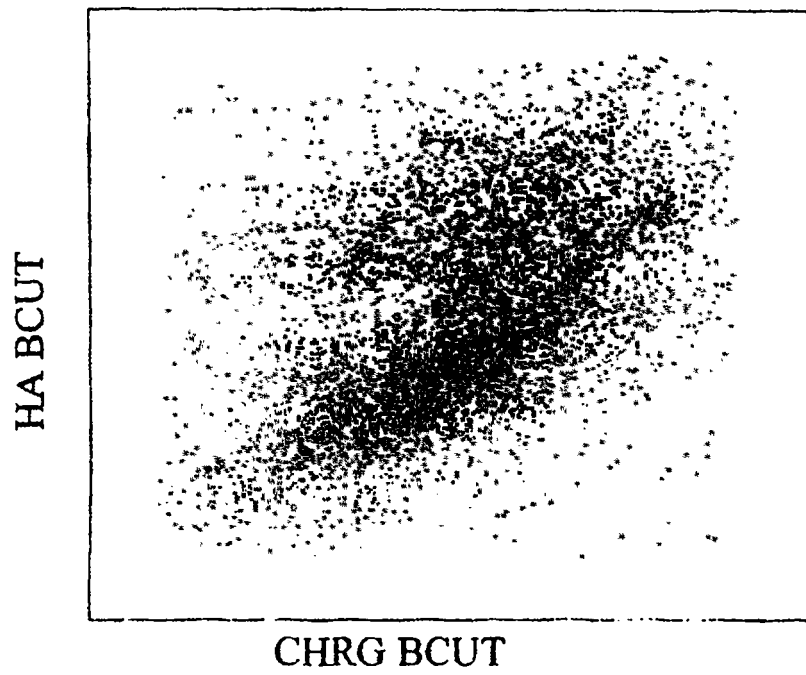


Figura 7

