



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 143 793**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

- 86 Número de solicitud europea: **96940448 .2**
86 Fecha de presentación : **13.11.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0866967**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.1998**

54 Título: **Utilización de la resistencia magnético nuclear para identificar ligandos con biomoléculas blanco.**

30 Prioridad: **14.11.1995 US 555691**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.05.2000**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.03.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.03.2008**

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/AP6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72 Inventor/es: **Fesik, Stephen, W. y**
Hajduk, Philip, J.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 143 793 T5

DESCRIPCIÓN

Utilización de la resistencia magnético nuclear para identificar ligandos con biomoléculas blanco.

5 Campo técnico de la invención

La presente invención tiene que ver con un método para el escrutinio de compuestos por su actividad biológica utilizando análisis espectral de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional para identificar y diseñar ligandos que se unan a una biomolécula diana.

10 Antecedentes de la invención

Una de las herramientas más poderosas para descubrir nuevos fármacos prototipo es el escrutinio al azar de bases de datos de productos químicos sintéticos y naturales para descubrir compuestos que se unan a una molécula diana concreta (esto es, la identificación de ligandos de esa diana). Utilizando este método, se pueden identificar ligandos por su capacidad para formar una asociación física con una molécula diana, o por su capacidad para alterar una función de una molécula diana.

Cuando se busca la unión física, una molécula diana es expuesta, típicamente, a uno o más compuestos sospechosos de ser ligandos, y se realizan ensayos para determinar si se forman complejos entre la molécula diana y uno o más de aquellos compuestos. Tales ensayos, como se conoce bien en la técnica, comprueban cambios groseros en la molécula diana (por ejemplo, cambios en el tamaño, carga, movilidad) que indiquen formación de complejos.

Donde se midan cambios funcionales, se establecen condiciones de ensayo que permitan la medición de un suceso biológico o químico relacionado con la molécula diana (por ejemplo, reacción catalizada enzimáticamente, activación enzimática mediada por el receptor). Para identificar una alteración, se determina la función de la molécula diana antes y después de su exposición a los compuestos de ensayo.

Se han empleado con éxito ensayos físicos y funcionales existentes para identificar nuevos fármacos prototipo para su uso en diseñar compuestos terapéuticos. Hay, sin embargo, limitaciones inherentes a aquellos ensayos que comprometen su exactitud, fiabilidad y eficacia.

Un defecto principal de los ensayos existentes tiene que ver con el problema de los “falsos positivos”. En un ensayo funcional típico, un “falso positivo” es un compuesto que desencadena el ensayo pero dicho compuesto no es eficaz en obtener la respuesta fisiológica deseada. En un ensayo físico típico, un “falso positivo” es un compuesto que, por ejemplo, se une él mismo a la diana pero de una manera no específica (por ejemplo, unión no específica). Los falsos positivos son particularmente frecuentes y problemáticos cuando se escrutan concentraciones mayores de supuestos ligandos, porque muchos compuestos tienen efectos no específicos a aquellas concentraciones.

De manera similar, los ensayos existentes están acosados por el problema de los “falsos negativos”, los cuales se producen cuando un compuesto da una respuesta negativa en el ensayo, pero dicho compuesto es realmente un ligando para la diana. Típicamente, los falsos negativos suceden en ensayos que emplean concentraciones de compuestos de ensayo que son demasiado altas (produciendo toxicidad) o demasiado bajas con relación a la constante de unión o disociación del compuesto a la diana.

Otro problema principal de los ensayos existentes es la limitada cantidad de información suministrada por el mismo ensayo. Mientras que el ensayo puede identificar correctamente compuestos que se unen a o provocan una respuesta de la molécula diana, típicamente aquellos ensayos no proporcionan ninguna información acerca de los sitios de unión específica en la molécula diana o de las relaciones estructura-actividad entre el compuesto que se va a ensayar y la molécula diana. La incapacidad para proporcionar alguna información es particularmente problemática donde el ensayo de escrutinio se está utilizando para identificar prototipos para su estudio complementario.

Se ha sugerido recientemente que se puede emplear la cristalografía por rayos X para identificar los sitios de unión de disolventes orgánicos en macromoléculas. Sin embargo, este método no puede determinar las afinidades relativas de unión en diferentes sitios en la diana. Solamente es aplicable para proteínas muy estables que no se desnaturalizan en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos. Además, este enfoque no es un método de escrutinio para ensayar rápidamente muchos compuestos que sean químicamente diversos, pero se limita a trazar el mapa de los sitios de unión de únicamente unos pocos disolventes orgánicos, debido al mucho tiempo que se necesita para determinar las estructuras cristalinas individuales.

Los compuestos son escrutados para identificar prototipos que se puedan emplear en el diseño de nuevos fármacos que alteren la función de la biomolécula diana. Aquellos nuevos fármacos pueden ser análogos estructurales de prototipos identificados o pueden ser conjugados de uno o más de tales compuestos prototipo. Debido a los problemas inherentes a los métodos de escrutinio existentes, aquellos métodos son, a menudo, de pequeña ayuda al diseñar nuevos fármacos.

Continúa la necesidad de proporcionar medios nuevos, rápidos, eficaces, precisos y fiables de escrutar compuestos para identificar ligandos que se unan específicamente a una diana concreta.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para escrutar compuestos, por su actividad biológica, para identificar ligandos que se unan a una molécula diana específica. Este procedimiento comprende las etapas de: a) generar un primer espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de una molécula diana marcada con ^{15}N ; b) exponer la molécula diana marcada a uno o a una mezcla de compuestos químicos; c) generar un segundo espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de la molécula diana marcada que ha sido expuesta a uno o a una mezcla de compuestos en la etapa (b); y d) comparar dichos primer y segundo espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales para determinar las diferencias entre dicho primer y dicho segundo espectros, las diferencias identificando la presencia de uno o más compuestos que son ligandos que tienen unida a la molécula diana.

Donde el procedimiento de la presente invención escrute más de un compuesto en la etapa (b), esto es, una mezcla de compuestos, y donde exista una diferencia entre el primer espectro generado a partir de la molécula diana sola y el generado a partir de la molécula diana en presencia de la mezcla, se realizan etapas adicionales para identificar qué compuesto específico, o compuestos, contenido en la mezcla se está uniendo a la molécula diana. Aquellas etapas adicionales constan de las etapas de e) exponer individualmente la molécula diana marcada con ^{15}N a cada compuesto de la mezcla, f) generar un espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de la molécula diana marcada que ha sido expuesta individualmente a cada compuesto; y g) comparar cada espectro generado en la etapa (f) con el primer espectro generado a partir de la molécula diana sola, para determinar las diferencias en alguno de aquellos espectros comparados, las diferencias identificando la presencia de un compuesto que es un ligando que tiene unida a la molécula diana.

En una forma de realización preferida, la molécula diana utilizada en un procedimiento de escrutinio es un polipéptido. La diana polipéptido es producida, preferentemente, en forma recombinante a partir de una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el polipéptido, cultivando la célula huésped transformada en un medio que contiene una fuente asimilable de ^{15}N , de manera que el polipéptido producido recombinantemente esté marcado con ^{15}N .

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos, los cuales forman una parte de la especificación:

La Fig. 1 muestra un espectro de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ del dominio de unión a DNA del virus del papiloma humano E2 marcado uniformemente con ^{15}N . El espectro (80 puntos complejos, 4 barridos/fid) fue obtenido en una muestra 0'5 mM de E2 en fosfato 20 mM (pH 6'5), ditiotreitól (DTT) 10 mM y óxido de deuterio (D_2O) al 10%.

La Fig. 2 muestra espectros de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ del dominio de unión a DNA del virus del papiloma humano E2 marcado uniformemente con ^{15}N , antes (contornos múltiples finos) y después (contornos individuales gruesos) de la adición de un compuesto de ensayo final. La concentración final de compuesto fue 1'0 mM. Todas las otras condiciones están expuestas en la Fig. 1. Se indican residuos seleccionados que muestran cambios significantes en la unión.

La Fig. 3 muestra espectros de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ del dominio de unión a DNA del virus del papiloma humano E2 marcado uniformemente con ^{15}N , antes (contornos múltiples finos) y después (contornos individuales gruesos) de la adición de un segundo compuesto de ensayo. La concentración final de compuesto fue 1'0 mM. Todas las otras condiciones están expuestas en la Fig. 1. Se indican residuos seleccionados que muestran cambios significantes en la unión.

La Fig. 4 muestra espectros de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ del dominio catalítico de estromelisina marcada uniformemente con ^{15}N , antes (contornos múltiples finos) y después (contornos individuales gruesos) de la adición de un compuesto de ensayo. La concentración final de compuesto fue 1'0 mM. Los espectros (80 puntos complejos, 8 barridos/fid) fueron obtenidos en una muestra 0'3 mM de SCD en TRIS 20 mM (pH 7'0), Cl_2Ca 20 mM y D_2O al 10%. Se indican residuos seleccionados que muestran cambios significantes en la unión.

La Fig. 5 muestra espectros de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ del dominio de unión Ras de péptido RAF (residuos 55-132) marcado uniformemente con ^{15}N , antes (contornos múltiples finos) y después (contornos individuales gruesos) de la adición de un compuesto de ensayo. La concentración final de compuesto fue 1'0 mM. Los espectros (80 puntos complejos, 8 barridos/fid) fueron obtenidos en una muestra 0'3 mM del fragmento RAF en fosfato 20 mM (pH 7'0), DTT 10 mM y D_2O al 10%. Se indican residuos seleccionados que muestran cambios significantes en la unión.

La Fig. 6 muestra espectros de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ de FKBP marcado uniformemente con ^{15}N , antes (contornos múltiples finos) y después (contornos individuales gruesos) de la adición de un compuesto de ensayo. La concentración final de compuesto fue 1'0 mM. Los espectros (80 puntos complejos, 8 barridos/fid) fueron obtenidos en una muestra 0'3 mM de FKBP en fosfato 50 mM (pH 6'5), ClNa 100 mM y D_2O al 10%. Se indican residuos seleccionados que muestran cambios significantes en la unión.

La Fig. 7 muestra una primera representación de la estructura obtenida por RMN del dominio de unión a DNA de E2. Los dos monómeros del dímero simétrico están orientados de una manera cabeza-cola, y están indicados los N- y

C-terminales de cada monómero (N y C para un monómero, N* y C* para el otro). Mostrados en las cintas están los residuos que exhiben cambios de desplazamiento químico significativos [$\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04$ ppm; $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1$ ppm] en la unión a un primer compuesto de ensayo. Estos residuos corresponden a la hélice de identificación de DNA de E2. Se numeran los residuos seleccionados para su ayuda en la visualización.

La Fig. 8 muestra una segunda representación de la estructura obtenida por RMN del dominio de unión a DNA de E2. Los dos monómeros del dímero simétrico están orientados de una manera cabeza-cola, y están indicados los N- y C-terminales de cada monómero (N y C para un monómero, N* y C* para el otro). Mostrados en las cintas están los residuos que exhiben cambios de desplazamiento químico significativos [$\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04$ ppm; $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1$ ppm] en la unión a un segundo compuesto de ensayo. Estos residuos están localizados, principalmente, en la región de interacción del dímero. Se numeran los residuos seleccionados para su ayuda en la visualización.

La Fig. 9 muestra una representación de la estructura obtenida por RMN del dominio catalítico de estromelisin. Están indicados los N- y C- terminales. Mostrados en las cintas están los residuos que exhiben cambios de desplazamiento químico significativos [$\Delta\delta(^1\text{H}) > 0.04$ ppm; $\Delta\delta(^{15}\text{N}) > 0.1$ ppm]. Estos forman parte del sitio de unión S1' o están espacialmente próximos a este sitio. Se numeran los residuos seleccionados para su ayuda en la visualización.

La Fig. 10 muestra un gráfico de cintas de un complejo ternario del primer y segundo ligandos unidos al dominio catalítico de estromelisin.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método de escrutinio rápido y eficaz para identificar ligandos que se unen a moléculas diana terapéuticas.

Los ligandos son identificados ensayando la unión de moléculas a una molécula diana (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, etc.) siguiendo, con espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), los cambios en los desplazamientos químicos de la molécula diana, con la adición de los compuestos ligando, en la base de datos.

Hay varias ventajas según el procedimiento descubierto, basado en RMN, de la presente invención. Primero, debido a que un procedimiento de la presente invención identifica ligandos midiendo directamente la unión a la molécula diana, se reduce significativamente el problema de los falsos positivos. Debido a que el presente procedimiento identifica sitios de unión específicos a la molécula diana, se elimina el problema de los falsos positivos resultantes de la unión no específica a la molécula diana de compuestos a altas concentraciones.

Segundo, se reduce significativamente el problema de los falsos negativos porque el presente procedimiento puede identificar compuestos, que se unen específicamente a la molécula diana, con un amplio rango de constantes de disociación.

Otras ventajas de la presente invención resultan de los datos diversos y detallados, proporcionados acerca de cada ligando, a partir del procedimiento descubierto.

Debido a que la localización del ligando unido puede ser determinada a partir de un análisis de los desplazamientos químicos de la molécula diana, que cambian con la adición del ligando, y a partir de los efectos nucleares Overhauser (NOEs) entre el ligando y la biomolécula, se puede medir la unión de un segundo ligando en presencia de un primer ligando que ya está unido a la diana. La habilidad para identificar simultáneamente sitios de unión de diferentes ligandos permite a un artesano especializado el 1) definir la unión cooperativa negativa y positiva entre ligandos, y 2) diseñar nuevos fármacos uniendo dos o más ligandos en un compuesto único, mientras se mantiene una orientación adecuada de los ligandos entre sí y a sus sitios de unión.

Además, si existen múltiples sitios de unión, se puede medir la afinidad relativa de las porciones de unión individuales por los diferentes sitios de unión, a partir de un análisis de los cambios de desplazamiento químico de la molécula diana, en función de la concentración añadida de ligando. Escrutando simultáneamente varios análogos estructurales de un compuesto dado, se proporcionan relaciones detalladas estructura/actividad acerca de los ligandos.

En su aspecto principal, la presente invención proporciona un procedimiento para escrutar compuestos para identificar ligandos que se unen a una molécula diana específica. Ese procedimiento comprende las etapas de: a) generar un primer espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de una molécula diana marcada con ^{15}N ; b) exponer la molécula diana marcada a uno o más compuestos; c) generar un segundo espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de la molécula diana marcada que ha sido expuesta a los compuestos en la etapa (b); y d) comparar el primer y segundo espectros para determinar si existen diferencias en aquellos dos espectros, las cuales diferencias indican la presencia de uno o más ligandos que tienen unida a la molécula diana.

Donde un procedimiento de la presente invención escrute más de un compuesto en la etapa (b), y donde se observe una diferencia entre espectros, se realizan etapas adicionales para identificar qué compuesto específico se está uniendo a las moléculas diana. Aquellas etapas adicionales constan de generar un espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional para cada compuesto individual, y comparar cada espectro con el primer espectro para determinar si

ES 2 143 793 T5

existen diferencias en alguno de aquellos espectros comparados, las cuales diferencias indican la presencia de un ligando que tiene unida a la molécula diana.

5 En un procedimiento de la presente invención se puede emplear cualquier molécula diana marcada con ^{15}N . Debido a la importancia de las proteínas en la química médica, una molécula diana preferida es un polipéptido. La molécula diana se puede marcar con ^{15}N empleando cualquier medio bien conocido en la materia. En una forma de realización preferida, la molécula diana se prepara en forma recombinante empleando células huésped transformadas. En una forma de realización especialmente preferida, la molécula diana es un polipéptido. Se puede emplear cualquier polipéptido que dé un espectro de RMN de alta resolución, y puede ser parcial o uniformemente marcado con ^{15}N .
10 La preparación de moléculas diana de polipéptidos ejemplares marcados con ^{15}N está expuesta, más adelante, en los Ejemplos.

Un medio preferido para preparar cantidades adecuadas de polipéptidos, marcados uniformemente con ^{15}N , es transformar una célula huésped con un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifica ese polipéptido, y cultivar la célula transformada en un medio de cultivo que contenga fuentes asimilables de ^{15}N . Son bien conocidas en la materia fuentes asimilables de ^{15}N . Una fuente preferida es el $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

Son bien conocidos en la técnica medios para preparar vectores de expresión que contengan polinucleótidos que codifican polipéptidos específicos. De manera similar, también se conocen en la técnica medios para transformar células huésped con aquellos vectores, y medios para cultivar aquellas células transformadas a fin de que el polipéptido sea expresado.

El procedimiento de escrutinio de la presente invención empieza con la generación u obtención de un espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de la molécula diana marcada. Se conocen en la técnica medios para generar espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales [ver, por ejemplo, D. A. Egan y col., *Biochemistry*, **32**(8): 1.920-1.927 (1993); Bax, A., Grzesiek, S., *Acc. Chem. Res.*, **26**(4): 131-138 (1993)].

Los espectros de RMN que se registran típicamente en el procedimiento de escrutinio de la presente invención son espectros de correlación cuántica simple heteronuclear (HSQC) $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales. Debido a que las señales $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ correspondientes al esqueleto amídico de las proteínas son bien resueltas por lo general, se supervisan fácilmente los cambios de desplazamiento químico para las amidas individuales.

Al generar tales espectros, se suprime la señal grande del agua mediante gradientes deteriorados. Para facilitar la obtención de datos de RMN en un gran número de compuestos (por ejemplo, una base de datos de pequeños compuestos orgánicos sintéticos o de existencia natural), se emplea un cambiador de muestras. Empleando el cambiador de muestras, se pueden introducir un total de 60 muestras no atendidas. De este modo, utilizando los típicos parámetros de obtención [4 barridos por degradación de inducción libre (fid)], se pueden obtener 100-120 espectros HSQC en un periodo de 24 horas.

Para facilitar el procesado de los datos de RMN, se emplean programas de ordenador para transferir y procesar automáticamente los múltiples conjuntos de datos de RMN bidimensionales, incluyendo una rutina para sincronizar automáticamente los datos de RMN bidimensionales. El análisis de los datos se puede facilitar formateando los datos de manera que los espectros HSQC individuales sean vistos y comparados rápidamente con el espectro HSQC de la muestra de control conteniendo únicamente el vehículo para el compuesto añadido (DMSO), pero ningún compuesto añadido. Se exponen, a continuación en los Ejemplos, descripciones detalladas de medios para generar tales espectros de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales.

Se muestra en la Fig. 1 un espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de una molécula diana (polipéptido) marcada con ^{15}N (el dominio de unión a DNA de la proteína E2).

50 Siguiendo a la obtención del primer espectro, la molécula diana marcada es expuesta a uno o más compuestos de ensayo. Donde se ensayen simultáneamente más de un compuesto de ensayo, se prefiere emplear una base de datos de compuestos tales como una pluralidad de moléculas pequeñas. Tales moléculas son disueltas típicamente en dimetilsulfóxido perdeuterado. Los compuestos en la base de datos pueden ser comprados de vendedores o creados según las necesidades deseadas.

Se pueden seleccionar compuestos individuales, entre otros, según la base de la diversidad de tamaño (peso molecular = 100-300) y molecular. Los compuestos de la colección pueden tener diferentes formas [por ejemplo, anillo(s) aromático plano, anillo(s) alifático arrugado, compuestos alifáticos de cadena lineal o ramificada con enlaces sencillos, dobles o triples] y diversos grupos funcionales (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, aminas, aldehídos, cetonas, y diversos anillos heterocíclicos) para maximizar la posibilidad de descubrir compuestos que interaccionen con sitios de unión extensamente diversos.

El procedimiento de escrutinio por RMN de la presente invención utiliza concentraciones de ligando oscilando de aproximadamente 0'1 a aproximadamente 10'0 mM. A estas concentraciones, los compuestos que sean ácidos o básicos pueden cambiar significativamente el pH de soluciones proteínicas tamponadas. Los desplazamientos químicos son sensibles a los cambios de pH así como a interacciones de unión directas, y se pueden observar, por lo tanto, cambios de desplazamiento químico "falsos positivos", los cuales no son el resultado de unión del ligando sino de

ES 2 143 793 T5

cambios en el pH. Así, es necesario asegurar que el pH de la solución tamponada no cambie con la adición del ligando. Se expone, a continuación, un medio para controlar el pH.

5 Los compuestos se almacenan a -10°C (263°K) como soluciones madre $1'0$ y $0'1$ M en dimetilsulfóxido (DMSO). Esto es necesario debido a la limitada solubilidad de los ligandos en solución acuosa. No es posible ajustar directamente el pH de la solución de DMSO. Además, el ClH y el NaOH forman sales insolubles en DMSO, de modo que se tiene que utilizar ácidos y bases alternativos. Ha sido encontrado el siguiente enfoque para producir pH estable.

10 Las soluciones madre $1'0$ M en DMSO son diluidas a 1:10 en fosfato 50 mM, pH $7'0$. Se mide el pH de esa solución alícuota diluida. Si el pH de la alícuota no cambia (esto es, permanece en $7'0$), se fabrica una solución de trabajo diluyendo la solución madre 1:10 en DMSO para fabricar una solución $0'1$ M, y luego se almacena esa solución.

15 Si el pH de la alícuota diluida es menor de $7'0$, se añade etanolamina a la solución madre de DMSO $1'0$ M, luego esa solución madre se diluye a 1:10 con tampón de fosfato para fabricar otra alícuota, y se vuelve a comprobar el pH de la alícuota.

20 Si el pH de la alícuota diluida es mayor de $7'0$, se añade ácido acético a la solución madre de DMSO $1'0$ M, luego se diluye esa solución madre a 1:10 con tampón de fosfato para fabricar otra alícuota, y se vuelve a comprobar el pH de la alícuota.

25 La etanolamina y el ácido acético son solubles en DMSO, y se añaden los equivalentes adecuados para asegurar que al transferir al tampón acuoso, el pH no cambia. El ajustar el pH es un procedimiento interactivo, repetido hasta que se obtenga el resultado deseado.

30 Observen que este procedimiento se lleva a cabo en diluciones 1:10 de soluciones madre $1'0$ M (ligando 100 mM) para asegurar que no se observa ningún cambio de pH a las concentraciones más bajas utilizadas en los experimentos ($0'1$ a 10 mM), o en sistemas tampón diferentes/más débiles.

35 Siguiendo a la exposición de la molécula diana, marcada con ^{15}N , a uno o más compuestos de ensayo, se genera un segundo espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional. Ese segundo espectro se genera de la misma manera como se expuso anteriormente. Luego se comparan el primer y segundo espectros para determinar si hay algunas diferencias entre los dos espectros. Las diferencias en los espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales, que indican la presencia de un ligando, corresponden a sitios marcados con ^{15}N en la molécula diana. Aquellas diferencias son determinadas utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

40 A modo de ejemplo, las Figs. 2, 3, 4, 5 y 6 muestran comparaciones de espectros de correlación antes y después de la exposición de diversas moléculas diana a diversos compuestos de ensayo. Se puede encontrar más adelante, en los Ejemplos 2 y 3, una descripción detallada de cómo se llevaron a cabo estos estudios.

45 Las señales particulares en un espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional corresponden a átomos específicos de nitrógeno e hidrógeno en la molécula diana (por ejemplo, amidas concretas de los residuos de aminoácidos en la proteína). A modo de ejemplo, se puede ver, a partir de la Fig. 2, que los desplazamientos químicos en una correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional del dominio de unión a DNA de E2, expuesto a un compuesto de ensayo, ocurrieron en las posiciones 15 (I15), 21 (Y21), 22 (R22) y 23 (L23) de los residuos.

50 Se puede ver, a partir de la Fig. 2, que la unión del ligando implicó al residuo de isoleucina (Ile) en la posición 15, el residuo de tirosina (Tyr) en la posición 21, el residuo de arginina (Arg) en la posición 22 y el residuo de leucina (Leu) en la posición 23.

55 La región de la proteína, que es responsable de la unión a los compuestos individuales, puede ser identificada a partir de las señales amida particulares que cambian con la adición de los compuestos. Estas señales son asignadas a los grupos amida individuales de la proteína mediante procedimientos estándar, utilizando una variedad de experimentos de RMN multidimensionales heteronucleares sólidamente establecidos.

60 Como se expuso más adelante en el Ejemplo 2, un ensayo inicial de escrutinio para unir al dominio catalítico de estromelisin identificó dos compuestos biarilo como ligandos.

Debido a su importancia en la química médica, una molécula diana preferida, para su empleo en tal procedimiento, es un polipéptido.

65 Las constantes de unión o disociación se pueden medir siguiendo los desplazamientos químicos $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ de la proteína en función de la concentración de ligando. Se mezcla una concentración conocida ($[P]_0$) de la molécula diana con una concentración conocida ($[L]_0$) de un ligando previamente identificado, y se obtiene el espectro de correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional. A partir de este espectro, se obtienen los valores de desplazamiento químico (δ_{obs}) observados. Se repite el procedimiento para diversas concentraciones del ligando hasta el punto de saturación de la molécula diana, si es posible, en cuyo caso se mide el valor restrictivo de desplazamiento químico para saturación (δ_{sat}).

ES 2 143 793 T5

Ejemplo 1

Preparación de Moléculas Diana Marcadas Uniformemente con ¹⁵N

5 A. Estromelisina

La estromelisina humana es una proteína de 447 aminoácidos que se cree que está implicada en la degradación proteolítica de cartílago. Se cree que la proteólisis de cartílago produce pérdida degradativa de cartílago de articulación y el deterioro resultante de la función de articulación observada en la osteoartritis y artritis reumatoide. La proteína
10 posee una serie de dominios incluyendo dominios N-terminal latente y propeptídico, un dominio C-terminal homólogo a la homopexina, y un dominio catalítico interno.

Estudios han demostrado que la eliminación de la prosequencia N-terminal de aproximadamente ochenta aminoácidos sucede para convertir la proenzima en la enzima madura de 45 kDa. Además, estudios han demostrado que no se
15 necesita el dominio C-terminal homólogo a la homopexina para el plegamiento adecuado del dominio catalítico o para la interacción con un inhibidor. [Ver, por ejemplo, A. I. Marcy, *Biochemistry*, **30**: 6.476-6.483 (1991)]. De este modo, el segmento interno del 81-256 residuos de aminoácidos de estromelisina fue seleccionado como el fragmento de proteína para su uso en identificar compuestos que se unen a y tienen el potencial de actuar como inhibidores de estromelisina.

Para emplear el método de la presente invención, fue necesario preparar el fragmento 81-256 (Nº ID SEC: 1) de estromelisina en el que la esqueleto peptídico fue enriquecida isotópicamente con ¹⁵N. Esto se hizo insertando un plásmido que codificaba la producción del fragmento de proteína en una cepa de *E. Coli*, y haciendo crecer la cepa bacteriana, modificada genéticamente, en un medio de cultivo restrictivo enriquecido con ¹⁵NH₄Cl y ¹³C-glucosa.

El fragmento de proteína enriquecido isotópicamente fue aislado del medio de cultivo, purificado, y posteriormente empleado como la base para evaluar la unión de compuestos de ensayo. Se describe a continuación los procedimientos para estos procesos.

Fibroblastos de piel humana (ATCC Nº CRL 1507) fueron crecidos e inducidos utilizando el procedimiento descrito por Clark y col., *Archiv. Biochem. and Biophys.*, **241**: 36-45 (1985). Se aisló RNA total, de 1 g de células, utilizando un Promega RNAgents® Total RNA Isolation System Kit (Cat.#Z5110, Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una porción de 1 µg fue termodesnaturalizada a 80°C durante cinco minutos, y luego sometida a PCR con transcriptasa inversa empleando un juego GeneAmp® RNA PCR (Cat.#N808-0017, Applied Biosystems/Perkin-Elmer, 761 Main Avenue, Norwalk, CT 06859-0156) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó un PCR "nested" (anidado o solapante) utilizando cebadores originales (A) GAAATGAAGAGTCTT CAA (Nº ID SEC: 3) y (B) GCGTCCCAGGTTCTGGAG (Nº ID SEC: 4) y treinta ciclos de 94°C, dos minutos; 45°C, dos minutos; y 72°C tres minutos. Esto fue seguido por reamplificación con cebadores internos (C) ATACCATGGCC TATCCATTGGATGGAGC (Nº ID SEC: 5) y (D) ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGGAGTCAGG (Nº ID SEC: 6) utilizando treinta ciclos, bajo las mismas condiciones descritas inmediatamente antes, para generar un DNA que codifica para los residuos de aminoácidos 1-256 de estromelisina humana.

Luego fue clonado el fragmento PCR en un vector de clonación pT7Blue(R) para PCR (Novagen, Inc., 597 Science Drive, Madison, WI 53711) según las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante fue cortado con NcoI y BamHI, y el fragmento de estromelisina fue subclonado en el vector de expresión pET3d Novagen (Novagen, Inc., 597 Science Drive, Madison, WI 53711), utilizando nuevamente las instrucciones del fabricante.

Fue generada una construcción de expresión de estromelisina madura, codificando para residuos de aminoácidos 81-256 más una metionina inicial, a partir de la construcción de expresión 1-256 mediante amplificación por PCR. El fragmento resultante de PCR fue primero clonado en el vector pT7Blue(R) Novagen y después subclonado en el vector pET3d Novagen, utilizando las instrucciones del fabricante de la manera descrita anteriormente, para producir plásmido (pETST-83-256). Este plásmido final es idéntico al descrito por Qi-Zhuang y col., *Biochemistry*, **31**: 11.231-11.235 (1992) con la excepción de que el presente codifica para una secuencia peptídica comenzando dos aminoácidos antes, en la posición 81 en la secuencia de estromelisina humana.

El plásmido pETST-83-256 fue transformado en la cepa de *E. Coli* BL21(DE3)/pLysS (Novagen, Inc., 597 Science Drive, Madison, WI 53711) según las instrucciones del fabricante, para generar una cepa de expresión, BL21 (DE3)/pLysS/pETST-255-1.

Se preparó un medio de precultivo disolviendo 1'698 g de P₄HNa₂·7H₂O, 0'45 g de PO₄H₂K, 0'075 g de ClNa, 0'150 g de ¹⁵NH₄Cl, 0'300 g de ¹³C-glucosa, 300 µl de solución acuosa 1M de SO₄Mg y 15 µl de solución acuosa de Cl₂Ca en 150 ml de agua desionizada.

La solución resultante de medio de precultivo fue esterilizada y transferida a un matraz estéril de 500 ml con deflectores. Inmediatamente antes de la inoculación del medio de precultivo con la cepa bacteriana, se añadieron al contenido del matraz 150 µl de una solución conteniendo 34 mg/ml de cloranfenicol en etanol del 100% y 1'5 ml de una solución conteniendo 20 mg/ml de ampicilina.

ES 2 143 793 T5

El contenido del matraz fue inoculado después con 1 ml de solución de glicerina con *E. Coli* modificado genéticamente, cepa BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1. El contenido del matraz fue agitado (225 rpm) a 37°C hasta que se observó una densidad óptica de 0'65.

5 Se preparó un medio nutriente de fermentación disolviendo 113'28 g de $P_4HNa_2 \cdot 7H_2O$, 30 g de PO_4H_2K , 5 g de ClNa y 10 ml de agente antiespumante DF-60 al 1% en 9.604 ml de agua desionizada. Se puso esta solución en un New Brunswick Scientific Micros Fermenter (Edison, NJ) y se esterilizó a 121°C durante 40 minutos.

10 Inmediatamente antes de la inoculación del medio de fermentación, se añadieron los siguientes componentes pre-esterilizados al contenido del recipiente de fermentación: 100 ml de una solución acuosa al 10% de $^{15}NH_4Cl$, 100 ml de una solución acuosa al 10% de ^{13}C -glucosa, 20 ml de una solución acuosa 1M de SO_4Mg , 1 ml de una solución acuosa 1M de Cl_2Ca , 5 ml de una solución acuosa de clorhidrato de tiamina (10 mg/ml), 10 ml de una solución conteniendo 34 mg/ml de cloranfenicol en etanol del 100%, y 1'9 g de ampicilina disuelta en la solución de cloranfenicol. Se ajustó el pH de la solución resultante a 7'00 mediante la adición de una solución acuosa de SO_4H_2 4N.

15 El precultivo de *E. Coli*, cepa BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1, del procedimiento a escala del matraz de agitación descrito anteriormente, fue añadido al contenido del fermentador y se dejó proceder el crecimiento celular hasta que se logró una densidad óptica de 0'48. Durante este procedimiento, el contenido del fermentador fue automáticamente mantenido a pH 7'0 mediante la adición de SO_4H_2 4N o KOH 4N según necesidad. El contenido de oxígeno disuelto del contenido del fermentador fue mantenido por encima del 55% de saturación de aire a través de un bucle en cascada el cual aumentaba la velocidad de agitación cuando el contenido de oxígeno disuelto disminuía por debajo del 55%. Se alimentó aire al contenido del fermentador, a 7 litros patrón por minuto (SLPM), y la temperatura del cultivo se mantuvo a 37°C desde el principio hasta el fin del proceso.

25 Las células fueron recolectadas por centrifugación a 17.000 x g durante 10 minutos a 4°C, y los pellets celulares resultantes fueron recogidos y almacenados a -85°C. El rendimiento celular en peso húmedo fue de 3'5 g/l. El análisis de las fracciones soluble e insoluble de los lisados celulares, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), reveló que aproximadamente el 50% de la estromelina- ^{15}N se encontraba en la fase soluble.

30 El fragmento de estromelina marcado isotópicamente, preparado como se describió anteriormente, fue purificado empleando una modificación de la técnica descrita por Ye y col., *Biochemistry*, **31**: 11.231-11.235 (1992).

35 Las células recolectadas fueron suspendidas en tampón Tris-ClH 20 mM (pH 8'0), solución de azida sódica conteniendo Cl_2Mg 1 mM, Cl_2Zn 0'5 mM, 25 unidades/ml de enzima Benzonase[®], y una mezcla inhibidora fabricada de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo ("AEBSF"), Leupeptin[®], Aprotinin[®], y Pepstatin[®] (todos en concentraciones de 1 μ g/ml). AEBSF, Leupeptin[®], Aprotinin[®], y Pepstatin[®] están disponibles por American International Chemical, 17 Strathmore Road, Natick, MA 01760).

40 La mezcla resultante fue agitada suavemente durante una hora y luego enfriada a 4°C. Luego las células fueron rotas por sonicación utilizando un ciclo de servicio del 50%. El lisado resultante fue centrifugado a 14.000 rpm durante 30 minutos y el pellet de la fracción insoluble congelado a -80°C para su procesamiento posterior (ver abajo).

45 Se añadió sulfato amónico sólido al sobrenadante hasta el punto de 20% de saturación, y la solución resultante se cargó en una columna de flujo rápido de fenilsefarosa de 700 ml ("Q-Sepharose FF") (Pharmacia Biotech., 800 Centennial Ave., P. O. Box 1327, Piscataway, NJ 08855). Antes de cargar, la columna de sefarosa fue equilibrada con tampón Tris-ClH 50 mM (pH 7'6 a 4°C), Cl_2Ca 5 mM, y $SO_4(NH_4)_2$ 1M. La columna cargada fue elucionada con un gradiente lineal de concentraciones decrecientes de $SO_4(NH_4)_2$ acuoso (desde 1 bajando a 0 M) y concentraciones crecientes de Cl_2Ca acuoso (desde 5 a 20 mM) en tampón Tris-ClH a pH 7'6.

50 Las fracciones activas de eluato fueron recogidas y concentradas en una célula de cubeta agitada Amicon (Amicon, Inc., 72 Cherry Hill Drive, Beverly, MA 01915). La muestra concentrada fue dializada toda la noche en el tampón de partida utilizado con la columna Q-Sepharose FF, Tris-ClH 50 mM (pH 8'2 a 4°C) con Cl_2Ca 10 mM.

55 La muestra dializada fue cargada luego en la columna Q-Sepharose FF y elucionada con un gradiente lineal constando del tampón de partida y ClNa 200 mM. La fracción soluble purificada del fragmento de estromelina, marcado isotópicamente, fue concentrada y almacenada a 4°C.

60 El pellet fue solubilizado en guanidina-ClH 8M. Se centrifugó la solución durante 20 minutos a 20.000 rpm y el sobrenadante fue añadido, gota a gota, a un tampón de plegamiento constando de Tris-ClH 50 mM (pH 7'6), Cl_2Ca 10 mM, Cl_2Zn 0'5 mM y el cóctel inhibidor de AEBSF, Leupeptin[®], Aprotinin[®], y Pepstatin[®] (todos en concentraciones de 1 μ g/ml). El volumen de tampón de plegamiento era diez veces el del sobrenadante. La mezcla de sobrenadante y tampón de plegamiento fue centrifugada a 20.000 rpm durante 30 minutos.

65 El sobrenadante de esta centrifugación fue almacenado a 4°C, y el pellet fue sometido dos veces a las etapas, descritas anteriormente, de solubilización en guanidina-ClH, replegamiento en tampón, y centrifugación. Los sobrenadantes finales de cada una de las tres centrifugaciones fueron combinados y se añadió sulfato amónico sólido hasta el punto de 20% de saturación. La solución resultante así obtenida de la fracción insoluble fue sometida a purificación en fenil Sefarosa y Q-Sefarosa como se describió anteriormente para la fracción soluble.

ES 2 143 793 T5

Se combinaron las fracciones purificadas soluble e insoluble para producir unos 1'8 mg de fragmento 81-256 de estromelisinina purificada, marcada isotópicamente, por gramo de pasta celular original.

B. *Inhibidores del virus del papiloma E2 humano (VPH)*

5

Los virus del papiloma son una familia de virus de DNA pequeño que causan verrugas genitales y carcinomas de cuello del útero. La proteína E2 del VPH regula la transcripción viral y se necesita para la replicación viral. De este modo, las moléculas que bloquean la unión de E2 a DNA pueden ser agentes terapéuticos útiles contra el VPH. La proteína, antes que el DNA, fue elegida como diana, debido a que se supone que los agentes con mayor selectividad se unirían a la proteína antes que al DNA.

10

El dominio de unión a DNA del virus del papiloma E2 humano fue clonado, a partir del DNA completo que codifica para E2, utilizando PCR y sobreexpresado en bacterias utilizando el sistema de expresión de T7. Se aisló proteína marcada uniformemente con ^{15}N a partir de bacterias crecidas en un medio mínimo conteniendo cloruro amónico marcado con ^{15}N . La proteína fue purificada a partir del lisado celular bacteriano utilizando una columna S-sepharosa Fastflow preequilibrada con tampón (Tris 50 mM, ClNa 100 mM, EDTA 1mM, pH = 8'3).

15

La proteína fue elucionada con un gradiente lineal de ClNa 100-500 mM en tampón, combinada, y aplicada a una columna Mono-S a un pH = 7'0. La proteína fue elucionada con un gradiente salino (100-500 mM), concentrada a 0'3 mM, e intercambiada en una solución de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1) tamponada con Tris (50 mM, pH = 7'0) conteniendo azida sódica (0'5%).

20

C. *RAF*

25

Se preparó dominio de unión Ras, marcado uniformemente con ^{15}N , de la proteína RAF, como se describió en Emerson y col., *Biochemistry*, **34**(21): 6.911-6.918 (1995).

D. *FKBP*

30

Se preparó proteína de unión FK humana recombinante (FKBP), marcada uniformemente con ^{15}N , como se describió en Logan y col., *J. Mol. Biol.* **236**: 637-648 (1994).

Ejemplo 2

35

Compuestos de Escrutinio Utilizando Análisis Espectral de Correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ Bidimensional

Se preparó el dominio catalítico de estromelisinina según los procedimientos del Ejemplo 1. Las soluciones de proteína utilizadas en el ensayo de escrutinio contenían el dominio catalítico, marcado uniformemente con $^{15}\text{N}/^1\text{H}$, de estromelisinina (0'3 mM), ácido acetohidroxámico (500 mM), Cl_2Ca (20 mM), y azida sódica (0'5%) en una solución de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1) tamponada con Tris (50 mM, pH = 7'0).

40

Se generaron espectros de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales a 29°C en un espectrómetro de RMN Bruker AMX500 equipado con una sonda de resonancia triple y cambiador de muestras Bruker. Los espectros HSQC $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ fueron obtenidos como 80 x 1.024 puntos complejos utilizando amplitudes de barrido de 2.000 Hz (^{15}N , t1) y 8.333 Hz (^1H , t2). Se empleó una demora de 1 segundo entre barridos, y 8 barridos por degradación de inducción libre (fid) en la recogida de datos. Todos los espectros de RMN fueron procesados y analizados en ordenadores Silicon Graphics utilizando software escrito en la empresa.

45

Se obtuvo un primer espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional para la molécula diana de estromelisinina marcada con ^{15}N , como se describió anteriormente. Luego se expuso la diana estromelisinina a una base de datos de compuestos de ensayo. Se fabricaron soluciones madre de los compuestos a 100 mM y 1 M. Además, se preparó una biblioteca combinatorial que contenía 8-10 compuestos por muestra, a una concentración de 100 mM para cada compuesto.

50

Se ajustó el pH de la solución madre 1 M con ácido acético y etanolamina para que no se observara ningún cambio de pH en la dilución 1/10 con una solución tamponada con fosfato 100 mM (pH = 7'0). Es importante ajustar el pH, porque cambios pequeños en el pH pueden alterar los desplazamientos químicos de las biomoléculas y complicar la interpretación de los datos de RMN.

55

Se seleccionaron los compuestos en la base de datos según la base de la diversidad de tamaño (peso molecular = 100-300) y molecular. Las moléculas de la colección tenían formas diferentes [por ejemplo, anillo(s) aromático plano, anillo(s) alifático arrugado, compuestos alifáticos de cadena lineal y ramificada con enlaces sencillos, dobles o triples] y diversos grupos funcionales (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, aminas, aldehídos, cetonas, y varios anillos heterocíclicos) para maximizar la posibilidad de descubrir compuestos que interactúen con sitios de unión extensamente diversos.

60

65

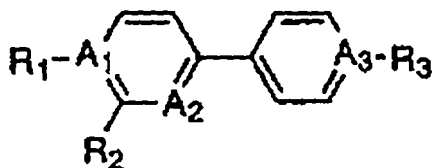
ES 2 143 793 T5

Las muestras para RMN fueron preparadas añadiendo 4 μ l de la solución madre de DMSO, de las mezclas de compuestos que contenían cada compuesto a una concentración de 100 mM, a 0.4 ml de solución tamponada de H₂O/D₂O (9/1) de la proteína marcada uniformemente con ¹⁵N. La concentración final de cada uno de los compuestos en la muestra de RMN era aproximadamente 1 mM.

En un ensayo inicial, se encontraron dos compuestos que se unen al dominio catalítico de la estromelisina. Ambos compuestos contienen una porción biarilo.

Ejemplo Comparativo 2

Basado en estos aciertos iniciales, se ensayaron compuestos similares estructuralmente frente a la estromelisina. La estructura de aquellos compuestos biarilo está representada por la estructura I, a continuación. (Ver Tabla 1 para las definiciones de R₁-R₃ y A₁-A₃).



En la segunda ronda de escrutinio, se ensayó la unión en ausencia y en presencia de cantidades saturadoras de ácido acetohidroxámico (500 mM).

Se encontró que muchos de los compuestos biarilo se unen al dominio catalítico de la estromelisina. La Fig. 4 muestra un espectro de correlación de RMN ¹⁵N/¹H bidimensional representativo antes y después de la exposición de la estromelisina a un compuesto de ensayo biarilo. Se puede ver, a partir de la Fig. 4, que el compuesto provocó desplazamientos químicos de los sitios ¹⁵N tales como aquellos designados W124, T187, A199 y G204.

Estos sitios corresponden a un residuo de triptófano (Trp) en la posición 124, un treonina (Thr) en la posición 187, un alanina (Ala) en la posición 199, y un glicina (Gly) en la posición 204 del N° de ID de SEC 1. La Fig. 9 muestra la correlación entre los datos RMN de unión y una vista de la estructura tridimensional, obtenida por RMN, del dominio catalítico de la estromelisina. La habilidad para localizar el sitio de unión específico de un ligando concreto es una ventaja de la presente invención.

Algunos compuestos solamente se unieron a la estromelisina en presencia de ácido hidroxámico. De este modo, se aumentó la afinidad de unión de algunos compuestos en presencia del ácido hidroxámico (esto es, cooperativo). Estos resultados ejemplifican otra importante aptitud del presente ensayo de escrutinio: la capacidad para identificar compuestos que se unen a la proteína en presencia de otras moléculas.

Se pusieron a prueba varios compuestos biarilo de estructura I, para unirse a la estromelisina a distintas concentraciones. Los espectros ¹⁵N/¹H generados a cada concentración fueron evaluados para cuantificar las diferencias en los espectros en función de la concentración de compuesto. Se calculó una constante de unión o disociación (K_D), utilizando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica, a partir de aquellas diferencias. Se muestran en la Tabla 1 los resultados de este estudio. Los valores para R₁-R₃ y A₁-A₃ en la Tabla 1 se refieren a las posiciones correspondientes en la estructura I anterior.

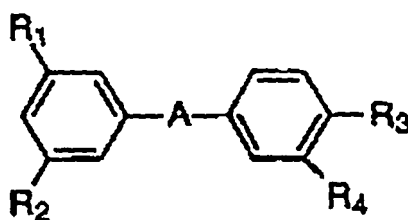
ES 2 143 793 T5

TABLA 1

Compuesto Nº	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁	A ₂	A ₃	K _D (mM)
1	H	OH	H	C	C	C	1'1
2	CH ₂ OH	H	H	C	C	C	3'2
3	Br	H	OH	C	C	C	1'3
4	H	H	H	N	N	C	1'6
5	CHO	H	H	C	C	C	1'7
6	OCH ₃	NH ₂	H	C	C	C	0'4
7	H	H	H	N	C	C	0'2
8	OCOCH ₃	H	H	C	C	C	0'3
9	OH	H	OH	C	C	C	0'16
10	H	H	H	N	C	N	0'4
11	OH	H	H	C	C	C	0'3
12	OH	H	CN	C	C	C	0'02

Una ventaja del ensayo de escrutinio de RMN de la presente invención es la capacidad para correlacionar desplazamientos químicos observados a partir de los espectros de correlación de RMN ¹⁵N/¹H bidimensionales con otros espectros o proyecciones de la configuración de la molécula diana. Los resultados de tal correlación representativa se muestran en la Fig. 9, la cual pinta regiones dentro del polipéptido a las que es más probable que les ocurra la unión con la molécula sustrato. En esta Figura, se muestran las regiones de unión aparente en la estromelisina para el Compuesto 1 (a partir de la Tabla 1).

Los compuestos de la base de datos fueron escrutados de forma similar por su unión al dominio de unión a DNA de la proteína E2. Aquellos compuestos tenían la estructura II a continuación, donde R₁-R₄ y A están definidos en la Tabla 2.



Los experimentos de RMN fueron realizados a 29°C en un espectrómetro de RMN Bruker AMX500 equipado con una sonda de resonancia triple y cambiador de muestras Bruker. Los espectros HSQC ¹⁵N/¹H fueron obtenidos como 80 x 1.024 puntos complejos utilizando amplitudes de barrido de 2.000 Hz (¹⁵N, t1) y 8.333 Hz (¹H, t2). Se empleó una demora de 1 segundo entre barridos, y 8 barridos por degradación de inducción libre en la recogida de datos. Todos los espectros de RMN fueron procesados y analizados en ordenadores Silicon Graphics.

Las Figs. 2 y 3 muestran espectros de correlación de RMN ¹⁵N/¹H bidimensionales representativos antes y después de la exposición del dominio de unión a DNA de E2 a un primer y segundo compuesto de ensayo, respectivamente.

Se puede ver, a partir de la Fig. 2, que el primer compuesto de ensayo provocó desplazamientos químicos de sitios ¹⁵N tales como aquellos designados I15, Y21, R22 y L23. Aquellos sitios corresponden a un residuo de isoleucina (Ile) en la posición 15, un residuo de tirosina (Tyr) en la posición 21, un residuo de arginina (Arg) en la posición 22, y un residuo de leucina (Leu) en la posición 23 del N° de ID de SEC 6.

ES 2 143 793 T5

Se puede ver, a partir de la Fig. 3, que el segundo compuesto de ensayo provocó desplazamientos químicos en los sitios ^{15}N particulares designados I6, G11, H38 y T52. Aquellos sitios corresponden a un residuo de isoleucina (Ile) en la posición 6, un residuo de glicina (Gly) en la posición 11, un residuo de histidina (His) en la posición 38, y un treonina (Thr) en la posición 52 del N° de ID de SEC 6.

Las Figs. 7 y 8 muestran la correlación entre aquellos datos RMN de unión y una vista de la estructura tridimensional obtenida por RMN del dominio de unión a DNA de E2.

Varios compuestos similares estructuralmente provocaron cambios de desplazamiento químico de las señales de proteína cuando se escrutaron a una concentración de 1 mM. Se encontraron dos conjuntos distintos de resonancias amídicas que cambian con la adición de los compuestos: un conjunto de señales correspondiente a amidas localizadas en el barril- β formado entre los dos monómeros, y un segundo conjunto correspondiente a amidas localizadas cerca del sitio de unión a DNA.

Por ejemplo, compuestos conteniendo dos anillos fenilo, con un ácido carboxílico unido al carbono que liga los dos anillos, solamente provocaron cambios de desplazamiento químico a las amidas en el sitio de unión a DNA. Por contraste, benzofenonas y compuestos conteniendo fenoxifenilos solamente se unieron al barril- β . Otros compuestos provocaron cambios de desplazamiento químico de ambos conjuntos de señales pero desplazaron las señales en cada conjunto mediante cantidades diferentes, sugiriendo la presencia de dos sitios de unión distintos.

Verificando los cambios de desplazamiento químico en función de la concentración de ligando, también se midieron las constantes de unión para los dos sitios de unión. Los resultados de aquellos estudios están resumidos en la Tabla 2.

TABLA 2

Comp. N°	A	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	DNA K _D (Mm)	Barril- β K _D (Mm)	Ensayo de unión en filtro
13	CO	H	H	H	OH	>50	0'6	-
14	O	H	H	H	CH ₂ OH	>50	2'0	-
15	- ^a	H	H	COO	H	2'0	>50	+
16	- ^a	Cl	Cl	COO	H	0'1	>50	+
17	- ^a	H	H	CH ₂ COO	H	4'2	4'9	+
18	- ^a	H	H	CH=CHCOO	H	1'2	6'2	+
19	O	H	H	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) -CH ₂ COO	H	0'5	0'2	+
20	O	H	H	COCH ₂ CH ₂ COO	H	2'7	4'8	+

^a una raya (-) para A no indica ningún átomo (esto es, unión bifenilo)

Se preparó, como se describió en el Ejemplo 1, dominio de unión-Ras de la proteína RAF, marcado uniformemente con ^{15}N , y se escrutó utilizando análisis espectral de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional según los procedimientos de RMN descritos anteriormente. Los resultados de un estudio representativo se muestran en la Fig. 5, la cual representa espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales antes y después de la exposición a un compuesto de ensayo.

Se preparó, como se describió en el Ejemplo 1, FKBP marcado uniformemente con ^{15}N y se escrutó utilizando análisis espectral de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional según los procedimientos de RMN descritos anteriormente. Los resultados de un estudio representativo se muestran en la Fig. 6, la cual representa espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales antes y después de la exposición a un compuesto de ensayo.

ES 2 143 793 T5

Ejemplo Comparativo 3

Comparación de Ensayos de Escrutinio de RMN, Enzimático, de Unión en Filtro y de Retardo en Gel

5 Se realizaron estudios para comparar las constantes de unión de ligandos a diversas biomoléculas, determinadas por el método de RMN de la presente invención, con resultados similares obtenidos por métodos de la técnica anterior.

10 En un primer estudio, se determinaron las constantes de unión por el método de RMN de la presente invención y por un ensayo enzimático de técnica anterior. La molécula diana era el dominio catalítico de estromelisina, preparado según los procedimientos del Ejemplo 1. Se obtuvieron las constantes de unión, K_D , por RMN utilizando espectroscopia de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional, como se describió en el Ejemplo 2. Los valores K_D así obtenidos fueron comparados con una constante de inhibición K_I determinada en un ensayo enzimático.

15 El ensayo enzimático midió la proporción de escisión de un sustrato fluorogénico siguiendo el aumento de fluorescencia a la escisión peptídica, la cual provoca una separación entre el fluoróforo y el atenuador. Se midió la actividad enzimática utilizando una matriz de concentraciones diferentes de ácido acetohidroxámico y compuestos biarilo. El ensayo es una modificación del método descrito por H. Weingarten y col. en *Anal. Biochem.*, **147**: 437-440 (1985) empleando las propiedades del sustrato fluorogénico descritas por E. Matayoshi y col. en *Science*: **247**: 954-958 (1990).

20 Se utilizaron ocho concentraciones de ácido acetohidroxámico oscilando desde 0'0 a 1'0 M, y se utilizaron seis concentraciones de compuesto, produciendo un total de 48 puntos. La concentración individual de compuesto varió debido a la solubilidad y potencia.

25 Todas las mediciones de RMN fueron realizadas en presencia de ácido acetohidroxámico 500 mM, excepto para la valoración del mismo ácido acetohidroxámico. Se obtuvieron las constantes de disociación a partir de la dependencia de los cambios de desplazamiento químico observados con el ligando añadido. Luego se obtuvieron las constantes de inhibición, a partir de los datos de inhibición, utilizando procedimientos estándar.

30 A continuación se resumen los resultados de estos estudios en la Tabla 3, la cual muestra la comparación de constantes de disociación (K_D) obtenidas por RMN con las constantes de inhibición medidas en el ensayo enzimático (K_I) utilizando un sustrato fluorogénico.

TABLA 3

35

Compuesto N°	K_D por RMN (mM)	K_I por ensayo (mM)
4	1'6	7'4
7	0'17	0'32
9	0'16	0'70
10	0'40	1'8
12	0'02	0'11
Ácido acetohidroxámico	17'0	21'1

40

45

50

Los datos en la Tabla 3 muestran que un procedimiento de RMN de la presente invención proporciona un camino rápido, eficaz y exacto para determinar constantes de disociación o unión de ligandos a biomoléculas diana. La comparación de las constantes de unión determinadas por los dos métodos produce la misma categoría de potencias de los compuestos ensayados. Esto es, mientras que los valores determinados por los dos métodos, para un sustrato dado, no son iguales, son proporcionales entre sí.

55

60 En un segundo estudio, se obtuvieron los resultados de unión del dominio de unión a DNA de E2 a su DNA diana mediante métodos de técnica anterior, y se compararon con los resultados obtenidos por el método de la presente invención. La diana fue el dominio de unión a DNA de E2, preparado según los procedimientos del Ejemplo 1. Se realizaron los ensayos de escrutinio por RMN y los procedimientos de RMN, como se expusieron antes en el Ejemplo 2, para determinar constantes de disociación de ligando.

65 Se comparó la constante de unión, a partir del procedimiento de RMN, con los resultados de un ensayo físico de unión en filtro que midió la unión de DNA a la diana. El ensayo de unión en filtro de alto rendimiento fue realizado utilizando E2, preparado según el Ejemplo 2 anterior. El constructor de DNA marcado con ^{33}P constaba de un plásmido de 10.329 pares de bases formado insertando el genoma del VPH-11, conteniendo tres sitios de unión E2 de alta afinidad y uno de baja afinidad, en el plásmido PSP-65 (Promega, Madison, WI).

ES 2 143 793 T5

Las afinidades de unión en los diferentes sitios determinados por RMN fueron comparadas, para un subconjunto de los compuestos, con la inhibición de la unión E2 a DNA medida en el ensayo de unión en filtro. Como se mostró en la Tabla 2 anterior, las actividades determinadas en el ensayo de unión en filtro se correlacionaban fielmente con las afinidades de unión calculadas a partir de las amidas del sitio de unión a DNA pero no con las afinidades medidas para el sitio barril- β . Esto es coherente con las localizaciones relativas de cada sitio.

En un estudio alternativo, se hizo una comparación de los resultados de unión determinados por RMN con resultados similares obtenidos mediante un ensayo de retardo en gel de la técnica anterior, utilizando técnicas bien conocidas en la materia. El ensayo de retardo en gel fue realizado utilizando una proteína de fusión con GST que contenía longitud completa del E2 y un fragmento de DNA de 62 pares de bases, marcado con ^{33}P , conteniendo dos sitios de unión E2.

El método identificó muchos compuestos que dieron resultados positivos en el ensayo de retardo en gel. Sin embargo, se creía que algunos de estos resultados positivos eran debidos a la unión al DNA, puesto que en estos casos no se observaba ninguna unión a la proteína E2 utilizando el método de RMN de esta invención. Se demostró que estos compuestos se unían de verdad al DNA antes que a E2, como se evidenció por cambios en los desplazamientos químicos del DNA, antes que en la proteína, con la adición de los compuestos. Estos datos demuestran que una ventaja más de la presente invención es la capacidad para minimizar la aparición de falsos positivos.

20 Ejemplo Comparativo 4

Empleo del Procedimiento de Escrutinio de la Presente Invención en el Diseño de un Potente Inhibidor No Peptídico de Estromelisina

Se realizaron estudios para diseñar nuevos ligandos que se unan al dominio catalítico de estromelisina. Debido a que la estromelisina experimenta autólisis, se buscó un inhibidor para bloquear la degradación de la estromelisina. Ese inhibidor facilitaría el escrutinio de otros ligandos potenciales que se unen a otros sitios en la enzima.

Los criterios utilizados para seleccionar compuestos en el escrutinio para otros sitios de unión estaban basados, principalmente, en el tamaño del ligando. Se buscó el ligando más pequeño que tuviera bastante solubilidad para saturar (>98% de ocupación de enzima) e inhibir la enzima.

La clonación, expresión, y purificación del dominio catalítico de estromelisina fueron llevados a cabo utilizando los procedimientos expuestos en el Ejemplo 1. Una etapa inicial en el diseño del nuevo ligando fue la identificación de un primer ligando que se uniera a la diana estromelisina. Se realizó tal identificación según un procedimiento de ensayo de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional, como se reveló antes.

Se escrutaron varios ácidos hidroxámicos de la fórmula general R-(CO)NHOH para su unión a la estromelisina, utilizando los procedimientos expuestos en el Ejemplo 2. De los compuestos ensayados, el ácido acetohidroxámico [CH₃(CO)NHOH] satisfizo mejor los criterios de selección: tenía una afinidad de unión para la estromelisina de 17 mM y tenía buena solubilidad en agua. A una concentración de 500 mM, el ácido acetohidroxámico inhibió la degradación de la enzima, permitiendo el escrutinio de otros ligandos potenciales.

La segunda etapa en el proceso de diseño fue la identificación de un segundo ligando que se uniera a la estromelisina diana en un sitio diferente al sitio de unión del ácido acetohidroxámico. Esto fue realizado escrutando compuestos por su habilidad para unirse a la estromelisina en presencia de cantidades saturadoras de ácido acetohidroxámico. Los detalles de los procedimientos y resultados de esta segunda etapa de identificación están expuestos anteriormente en el Ejemplo 2.

El compuesto identificado como segundo ligando, a partir de estos estudios, y empleado en las etapas de diseño posteriores, fue el compuesto designado como Compuesto N° 4 en la Tabla 1 (Ver Ejemplo 2).

La etapa siguiente en el proceso de diseño fue construir un complejo ternario de la estromelisina diana, el primer ligando y el segundo ligando. Esto se llevó a cabo exponiendo la diana de estromelisina a los dos ligandos bajo condiciones que produjeron la formación del complejo. Luego se determinó la estructura tridimensional del complejo ternario utilizando espectroscopia de RMN como se describió anteriormente.

Las resonancias de esqueleto de ^1H , ^{13}C , y ^{15}N de estromelisina en el complejo ternario fueron asignadas a partir de un análisis de varios espectros de RMN tridimensionales de resonancia doble y triple [A. Bax y col., *Acc. Chem. Res.*, **26**: 131-138 (1993)]. Las resonancias C $^\alpha$ de sistemas de espín contiguos fueron identificadas a partir de un análisis de espectros HNCA [L. Kay y col., *J. Magn. Reson.*, **89**: 496-514 (1990)] y HN(CO)CA [A. Bax y col., *J. Bio. NMR*, **1**: 99 (1991)] tridimensionales (3D) registrados con idénticas amplitudes espectrales de 1.773 Hz (35°0 ppm), 3.788 Hz (30°1 ppm), y 8.333 Hz (16°67 ppm) en las dimensiones F₁(^{15}N), F₂(^{13}C) y F₃(^1H), respectivamente.

La matriz de datos fue 38(t1) x 48(t2) x 1.024(t3) puntos complejos para el espectro HNCA, y 32(t1) x 40(t2) x 1.024(t3) puntos complejos para el espectro HN(CO)CA. Ambos espectros fueron obtenidos con 16 barridos por incremento. Se recogió un espectro CBCA(CO)NH 3D [S. Grzesiek y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**: 6.261-6.293 (1992)] con 32(t1, ^{15}N) x 48(t2, ^{13}C) x 1.024(t3, ^1H) puntos complejos y 32 barridos por incremento. Las amplitudes

ES 2 143 793 T5

espectrales fueron 1.773 Hz (35'0 ppm), 7.575'8 Hz (60'2 ppm), y 8.333 Hz (16'67 ppm) en las dimensiones ^{15}N , ^{13}C y ^1H , respectivamente.

Para los tres espectros, la frecuencia de la onda portadora ^1H fue ajustada a la resonancia del agua y la frecuencia de la onda portadora ^{15}N fue a 119'1 ppm. La frecuencia de la onda portadora ^{13}C fue ajustada a 55'0 ppm en los experimentos HNCA y HN(CO)CA, y 46'0 ppm en el experimento CBCA(CO)NH.

Las asignaciones del esqueleto fueron confirmadas a partir de un análisis de los picos de entrecruzamiento observados en un espectro NOESY-HSQC 3D independiente de ^{15}N y en un espectro HNHA-J 3D. El espectro NOESY-HSQC 3D independiente de ^{15}N [S. Fesik y col., *J. Magn. Reson.*, **87**: 588-593 (1988)]; [D. Marion y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**: 1.515-1.517 (1989)] fue recogido con un tiempo de mezcla de 80 ms. Se recogieron un total de 68 ($t_1, ^{15}\text{N}$) x 96($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos complejos con 16 barridos por incremento, y las amplitudes espectrales fueron 1.773 Hz (35'0 ppm) para la dimensión ^{15}N , 6.666'6 Hz ($t_2, ^1\text{H}$, 13'3 ppm), y 8.333 Hz (16'7 ppm) para la dimensión ^1H .

El espectro HNHA-J 3D [G. Vuister y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 7.772-7.777 (1993)], el cual se utilizó también para obtener constantes de acoplamiento $^3\text{JHNH}\alpha$, fue obtenido con 35($t_1, ^{15}\text{N}$) x 64($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos complejos y 32 barridos por incremento. Las amplitudes espectrales y las frecuencias de la onda portadora fueron idénticas a las del espectro NOESY-HSQC 3D independiente de ^{15}N . Varias de las señales H^β fueron asignadas utilizando el experimento HNHB. Los amplitudes de barrido fueron las mismas que en el espectro NOESY-HSQC 3D independiente de ^{15}N que fue obtenido con 32($t_1, ^{15}\text{N}$) x 96($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos complejos.

Los desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C fueron asignados para casi todas las resonancias de las cadenas laterales. Se obtuvo un espectro HCCH-TOCSY 3D [L. Kay y col., *J. Magn. Reson.*, **101b**: 333-337 (1993)] con un tiempo de mezcla de 13 ms utilizando la secuencia DIPSI-2 [S. Rucker y col., *Mol. Phys.*, **68**: 509 (1989)] para mezcla isotrópica ^{13}C . Se recogieron un total de 96($t_1, ^{13}\text{C}$) x 96($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos de datos complejos con 16 barridos por incremento utilizando una amplitud espectral de 10.638 Hz (70'8 ppm, w1), 4.000 Hz (6'67 ppm, w2), y 4.844 (8'07 ppm, w3). Las posiciones de la onda portadora fueron 40 ppm, 2'5 ppm, y a la frecuencia del agua para las dimensiones ^{13}C , ^1H detectada indirectamente, y ^1H observada, respectivamente.

Se realizó otro estudio HCCH-TOCSY 3D con la onda portadora ^{13}C a 122'5 ppm para asignar los residuos aromáticos. Los espectros fueron recogidos con 36($t_1, ^{13}\text{C}$) x 48($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos complejos con amplitudes espectrales de 5.263 Hz (35'0 ppm, w1), 3.180 Hz (5'30 ppm, w2), y 10.000 Hz (16'7 ppm, w3). Las posiciones de la onda portadora fueron 122'5 ppm, 7'5 ppm, y a la frecuencia del agua para las dimensiones ^{13}C , ^1H detectada indirectamente, y ^1H observada, respectivamente.

Se registró un espectro NOESY-HSQC 3D independiente de ^{13}C [S. Fesik y col., *J. Magn. Reson.*, **87**: 588-593 (1988)]; [D. Marion y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**: 1.515-1.517 (1989)] utilizando un tiempo de mezcla de 75 ms. Se recogieron un total de 80($t_1, ^{13}\text{C}$) x 72($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos de datos complejos con 16 barridos por incremento, en amplitudes espectrales de 10.638 Hz (70'8 ppm, w1), 6.666'6 Hz (13'3 ppm, w2), y 8.333 Hz (16'67 ppm, w3). Las frecuencias de la onda portadora ^1H fueron ajustadas a la resonancia del agua, y la frecuencia de la onda portadora ^{13}C fue puesta a 40'0 ppm.

Se obtuvieron asignaciones estereoespecíficas de grupos metilo de los residuos valina y leucina utilizando un enfoque biosintético [Neri y col., *Biochem.* **28**: 7.510-7-516 (1989)] según la base del modelo de acoplamiento de un enlace ^{13}C - ^{13}C observado en un espectro ^1H , ^{13}C -HSQC de alta resolución [G. Bodenhausen y col., *J. Chem. Phys. Lett.*, **69**: 185-189 (1980)] de una muestra de proteína marcada ligeramente con ^{13}C . El espectro se obtuvo con 200 (^{13}C , t_1) x 2.048(^1H , t_2) puntos complejos en amplitudes espectrales de 5.000 Hz (39'8 ppm, ^{13}C) y 8.333 Hz (16'7 ppm, ^1H). Las posiciones de la onda portadora 20'0 ppm para la dimensión ^{13}C , y a la frecuencia del agua para la dimensión ^1H .

Para detectar NOEs entre los dos ligandos y la proteína, se recogió un espectro NOESY editado de ^{13}C , filtrado de ^{12}C . El esquema de impulsos constaba de una secuencia doble filtrada por ^{13}C [A. Gemmeker y col., *J. Magn. Reson.*, **96**: 199-204 (1992)] concatenada con una secuencia NOESY-HMQC [S. Fesik y col., *J. Magn. Reson.*, **87**: 588-593 (1988)]; [D. Marion y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**: 1.515-1.517 (1989)]. El espectro fue registrado con un tiempo de mezcla de 80 ms, y un total de 80($t_1, ^{13}\text{C}$) x 80($t_2, ^1\text{H}$) x 1.024($t_3, ^1\text{H}$) puntos complejos con 16 barridos por incremento. Las amplitudes espectrales fueron 8.865 Hz (17'73 ppm, w1), 6.667 Hz (13'33 ppm, w2), y 8.333 Hz (16'67 ppm, w3), y las posiciones de la onda portadora fueron 40'0 ppm para la dimensión carbono y a la frecuencia del agua para ambas dimensiones protónicas.

Para identificar grupos amida que se intercambiaron lentamente con el disolvente, se registraron una serie de espectros ^1H , ^{15}N -HSQC [G. Bodenhausen y col., *J. Chem. Phys. Lett.*, **69**: 185-189 (1980)] a 25°C a intervalos de 2 horas después de que la proteína fue intercambiada en D_2O . La obtención del primer espectro HSQC se inició 2 horas después de la adición de D_2O .

Todos los espectros de RMN se registraron a 25°C en un espectrómetro de RMN Bruker AMX500 o AMX600. Los datos de RMN fueron procesados y analizados en ordenadores Silicon Graphics. En todos los experimentos de RMN, se aplicaron gradientes de campos de impulsos, donde fuera conveniente, como describió, [A. Bax y col., *J.*

ES 2 143 793 T5

Magn. Reson., **99**: 638 (1992)] para proporcionar la supresión de la señal del disolvente y artefactos espectrales. La detección de la cuadratura en dimensiones detectadas indirectamente fue llevada a cabo utilizando el método States-TPPI [D. Marion y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**: 1.515-1.517 (1989)]. Se empleó la predicción lineal como describió [E. Olejniczak y col., *J. Magn. Reson.*, **87**: 628-632 (1990)].

Luego se utilizó la estructura tridimensional obtenida del complejo ternario para definir la orientación espacial del primer y segundo ligandos entre sí así como con la molécula diana de estromelisina.

Las restricciones de distancia obtenidas a partir de los datos NOE fueron clasificadas en seis categorías basadas en la intensidad del pico de entrecruzamiento y dados un límite inferior de 1'8 Å y límites superiores de 2'5 Å, 3'0 Å, 3'5 Å, 4'0 Å, 4'5 Å, y 5'0 Å, respectivamente. Se obtuvieron las restricciones para los ángulos de torsión φ a partir de constantes de acoplamiento $^3\text{JHNH}\alpha$ medidas a partir del espectro HNHA-J 3D [G. Vuister y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 7.772-7.777 (1993)]. El ángulo φ fue restringido a 120% \pm 40% para $^3\text{JHNH}\alpha > 8'5$ Hz, y 60% \pm 40% para $^3\text{JHNH}\alpha < 5$ Hz.

Los enlaces hidrógeno, identificados por amidas de intercambio lento basadas en estructuras iniciales, fueron definidos mediante dos restricciones: 1'8-2'5 Å para la distancia H-O y 1'8-3'3 Å para la distancia N-O. Se calcularon las estructuras con el programa X-PLOR 3.1 (A. Brünger, "XPLOR 3.1 Manual", Yale University Press, New Haven, 1992) en ordenadores Silicon Graphics utilizando un enfoque de anillamiento simulado por geometría de distancia híbrida [M. Nilges y col., *FEBS Lett.*, **229**: 317-324 (1988)].

Se obtuvieron, a partir de los datos NOE, un total de 1.032 restricciones aproximadas de distancia interprotónica. Además, se obtuvieron 21 restricciones inequívocas de distancia intermolecular a partir de un espectro NOESY editado de ^{13}C , filtrado de ^{12}C 3D. De las 1.032 restricciones NOE implicando la proteína, 341 fueron intra-residuos, 410 fueron secuenciales o de corto alcance entre residuos separados en la secuencia primaria por menos de cinco aminoácidos, y 281 fueron de largo alcance implicando residuos separados por al menos cinco aminoácidos.

Además de las restricciones de distancia NOE, se incluyeron 14 restricciones del ángulo diédrico φ en los cálculos de estructura que se obtuvieron de las constantes de acoplamiento de tres enlaces ($^3\text{JHNH}\alpha$) determinadas a partir de un espectro HNHA-J [G. Vuister y col., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 7.772-7.777 (1993)]. Las restricciones experimentales también incluyeron 120 restricciones de distancia correspondientes a 60 enlaces hidrógeno. Las amidas implicadas en enlaces hidrógeno fueron identificadas basadas en su velocidad de intercambio característicamente lenta, y las parejas de enlaces hidrógeno a partir de las estructuras de RMN iniciales calculadas sin las restricciones de enlaces hidrógeno. El número total de restricciones no redundantes obtenidas experimentalmente fue de 1.166.

Las estructuras estaban de excelente acuerdo con las restricciones experimentales por RMN. No había violaciones de distancia mayores de 0'4 Å, y ninguna violación del ángulo diédrico mayor de 5 grados. Además, la energía simulada para el término de repulsión de Van der Waals fue pequeña, indicando que las estructuras estaban desprovistas de malos contactos interatómicos.

Las estructuras de RMN también manifestaron buena geometría de enlace covalente, como se indicó por las pequeñas desviaciones de la longitud del enlace y el ángulo del enlace a partir de los correspondientes parámetros idealizados. La desviación cuadrática media de la raíz atómica promedio de las 8 estructuras, para los residuos 93-247 a partir de las coordenadas medias, fue de 0'93 Å para átomos del esqueleto (C^a, N, y C'), y de 1'43 Å para todos los átomos que no sean hidrógeno.

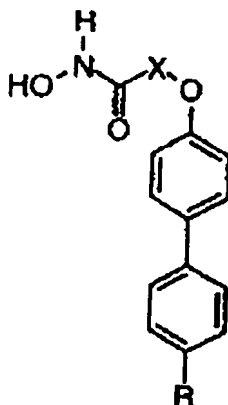
Se muestra en la Fig. 10 un gráfico de cintas del complejo ternario que implica a la estromelisina, ácido acetohidroxámico (el primer ligando), y el segundo ligando. La estructura es muy similar al plegamiento global de otras metaloproteinasas de matriz externa, y consta de una lámina β de cinco bandas y tres α -hélices.

El zinc catalítico fue localizado en el bolsillo de unión. Fue coordinado con tres histidinas y los dos átomos de oxígeno del ácido acetohidroxámico. Se localizó un grupo biarilo del segundo ligando en el bolsillo S1' entre la segunda hélice y el bucle formado a partir de los residuos 218-223. Este profundo y estrecho bolsillo está revestido con residuos hidrófobos que hacen contactos favorables con el ligando.

Basado en la estructura tridimensional del complejo ternario, como se determinó anteriormente, y las relaciones estructura/actividad observadas para la unión a la estromelisina de análogos estructurales del segundo ligando (esto es, otros compuestos biarilo), se diseñaron nuevas moléculas que unían conjuntamente el ácido acetohidroxámico a biarilos.

Como se muestra en la Tabla 4, a continuación, los biarilos iniciales elegidos contenían un conector oxígeno y la ausencia o presencia de CN para a la unión biarilo. Los conectores iniciales contenían longitudes cambiantes de unidades metileno. Son bien conocidos en la técnica medios para unir compuestos con conectores teniendo longitudes cambiantes de unidades metileno.

TABLA 4



Compuesto	X	R	Inhibición de estromelisina
21	(CH ₂) ₂	H	0'31 μM
22	(CH ₂) ₃	H	110 μM
23	(CH ₂) ₄	H	38% @ 100 μM
24	(CH ₂) ₅	H	43% @ 100 μM
25	(CH ₂) ₂	CN	0'025 μM
26	(CH ₂) ₃	CN	3'4 μM
27	(CH ₂) ₄	CN	3'5 μM
28	(CH ₂) ₅	CN	1'7 μM

Como se suponía, basado en la mejor unión a la estromelisina de los biarilo sustituidos con CN, los derivados de CN exhibieron mejor inhibición de estromelisina. El compuesto que exhibió la mejor inhibición de estromelisina contenía un conector con dos unidades metileno.

La presente invención ha sido descrita en cuanto a formas de realización preferidas. Aquellas formas de realización no son, de ninguna manera, restrictivas de las reivindicaciones y especificación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para escrutar compuestos, para identificar compuestos que son ligandos que se unen a una molécula diana específica, comprendiendo las etapas de:
- 10 a) generar un primer espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de una molécula diana marcada con ^{15}N ;
 - b) exponer la molécula diana marcada a uno o a una mezcla de compuestos químicos;
 - 15 c) generar un segundo espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de la molécula diana marcada que ha sido expuesta a uno o a una mezcla de compuestos en la etapa (b); y
 - d) comparar dichos primer y segundo espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales para determinar diferencias entre dichos primer y segundo espectros, las diferencias identificando la presencia de uno o más compuestos que son ligandos que tienen unida a la molécula diana.
- 20 2. El procedimiento de la Reivindicación 1, en donde la molécula diana marcada con ^{15}N es expuesta a una mezcla de compuestos químicos en la etapa b), comprendiendo además las etapas posteriores a la etapa d) de
- e) exponer individualmente la molécula diana marcada con ^{15}N a cada compuesto de dicha mezcla,
 - 25 f) generar un espectro de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensional de la molécula diana marcada que ha sido expuesta individualmente a cada compuesto; y
 - g) comparar cada espectro generado en la etapa f) con dicho primer espectro para determinar diferencias en alguno de aquellos espectros comparados, las diferencias identificando la presencia de un compuesto que es un ligando que tiene unida a la molécula diana.
- 30 3. El procedimiento de la Reivindicación 1, en donde las diferencias en los espectros de correlación de RMN $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ bidimensionales son desplazamientos químicos a sitios particulares marcados con ^{15}N en la molécula diana, y desplazamientos químicos en protones unidos a aquellos sitios marcados con ^{15}N .
- 35 4. El procedimiento de la Reivindicación 1, en donde la molécula diana es un polipéptido.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

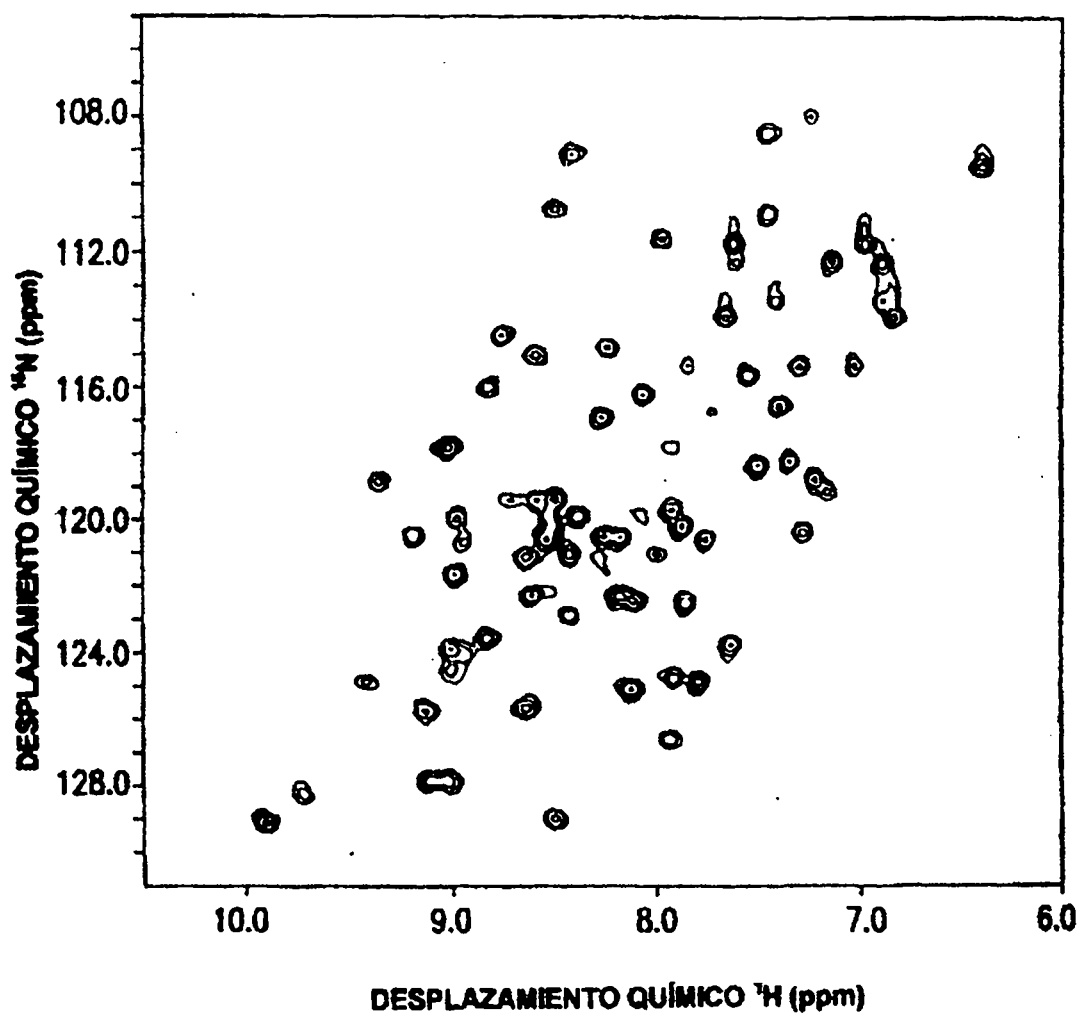


FIG. 1

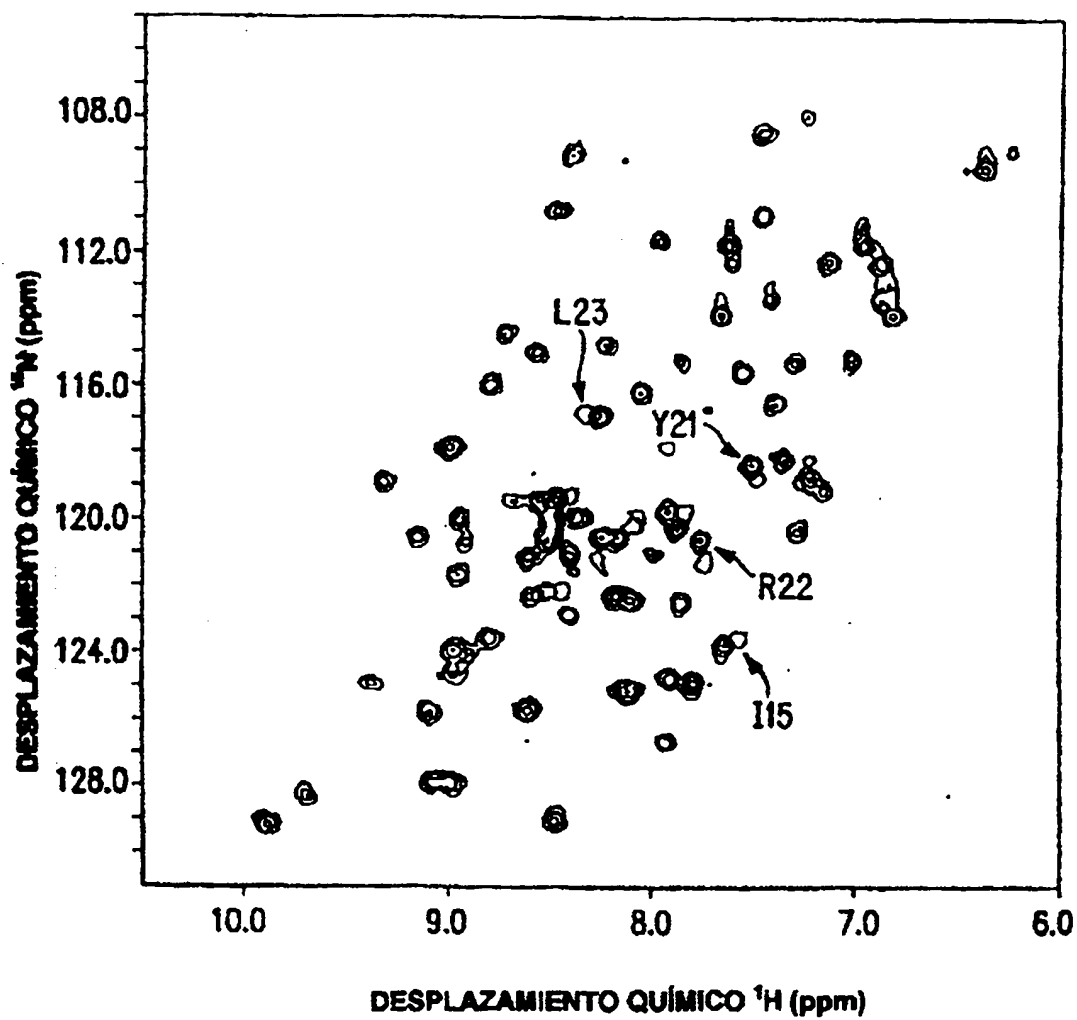


FIG. 2

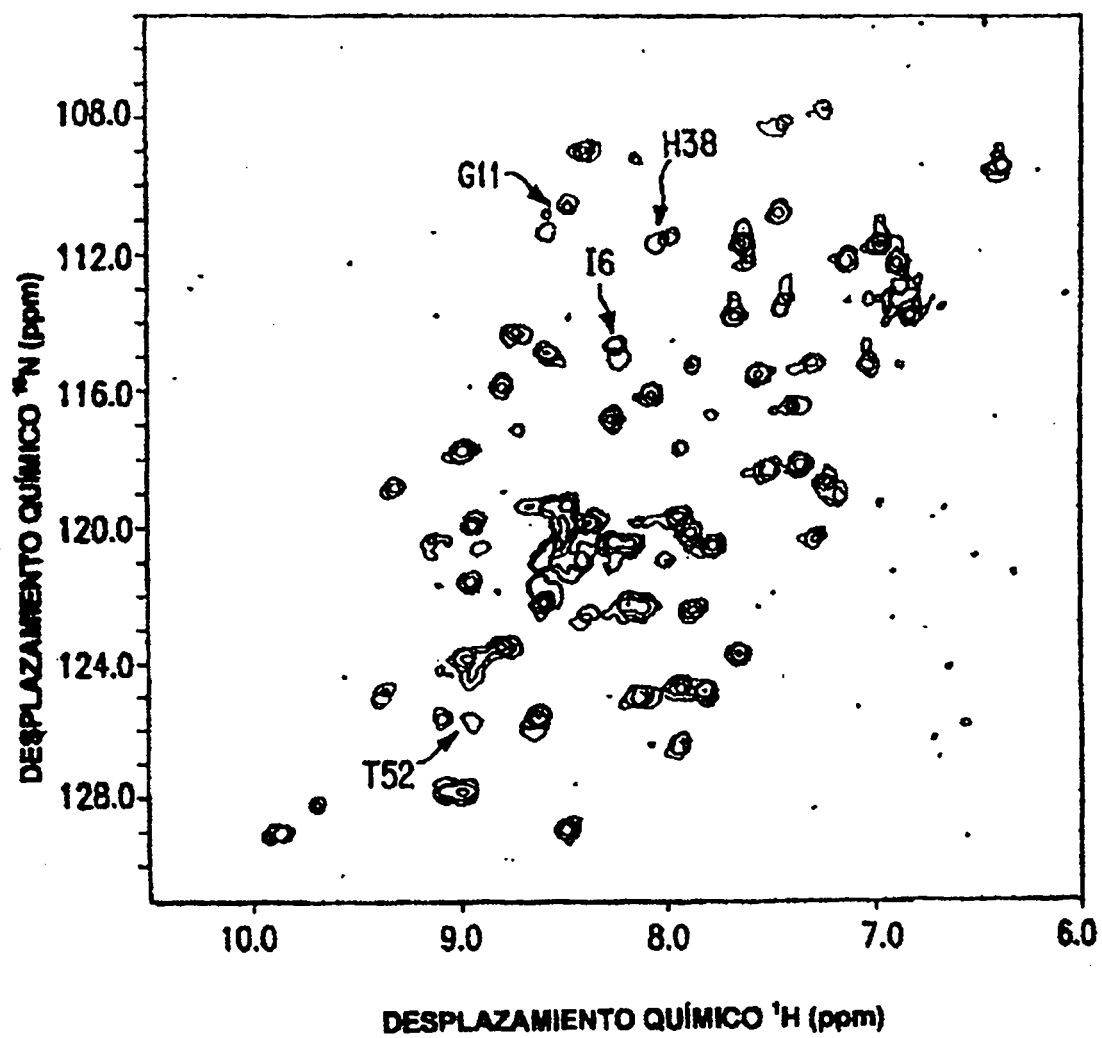


FIG. 3

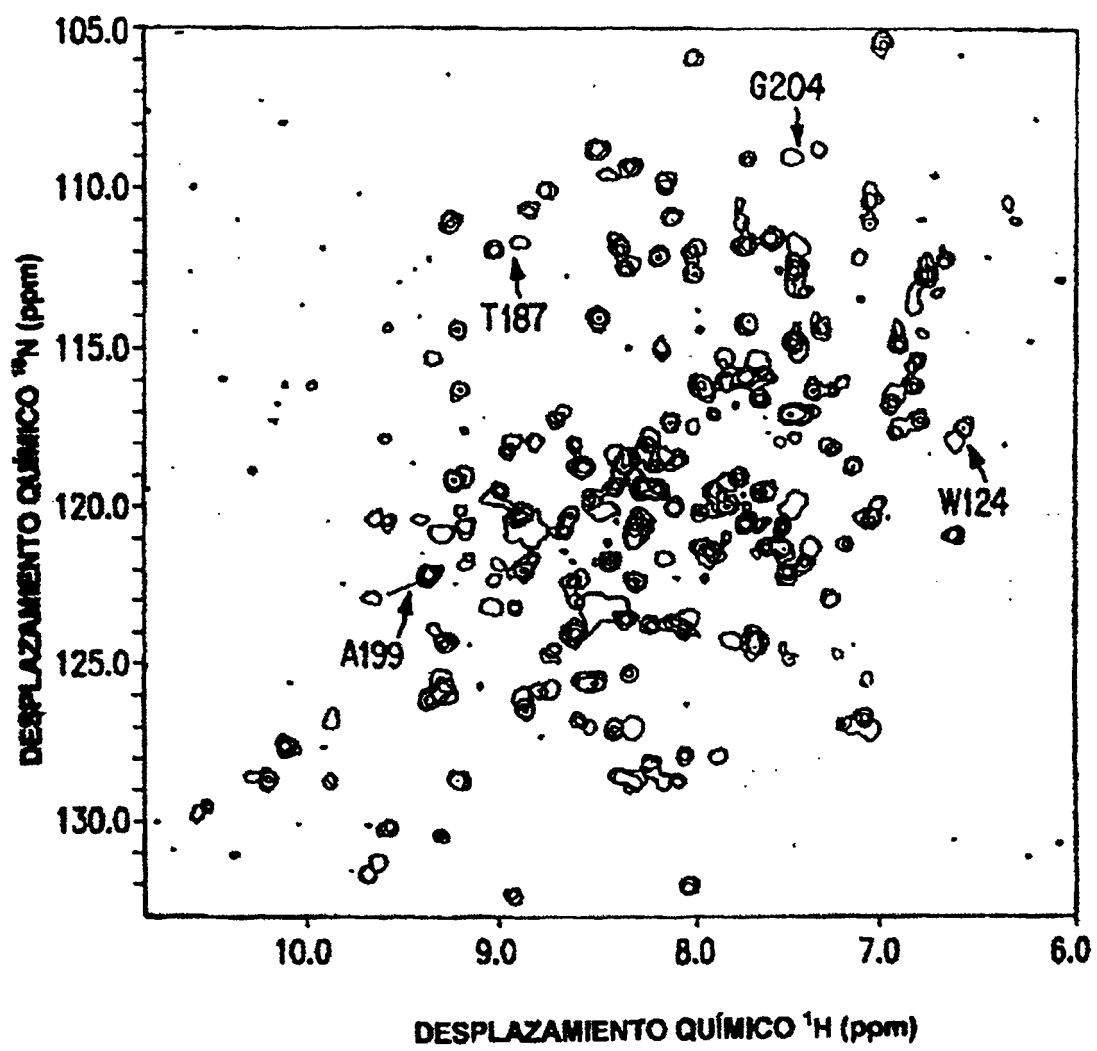


FIG. 4

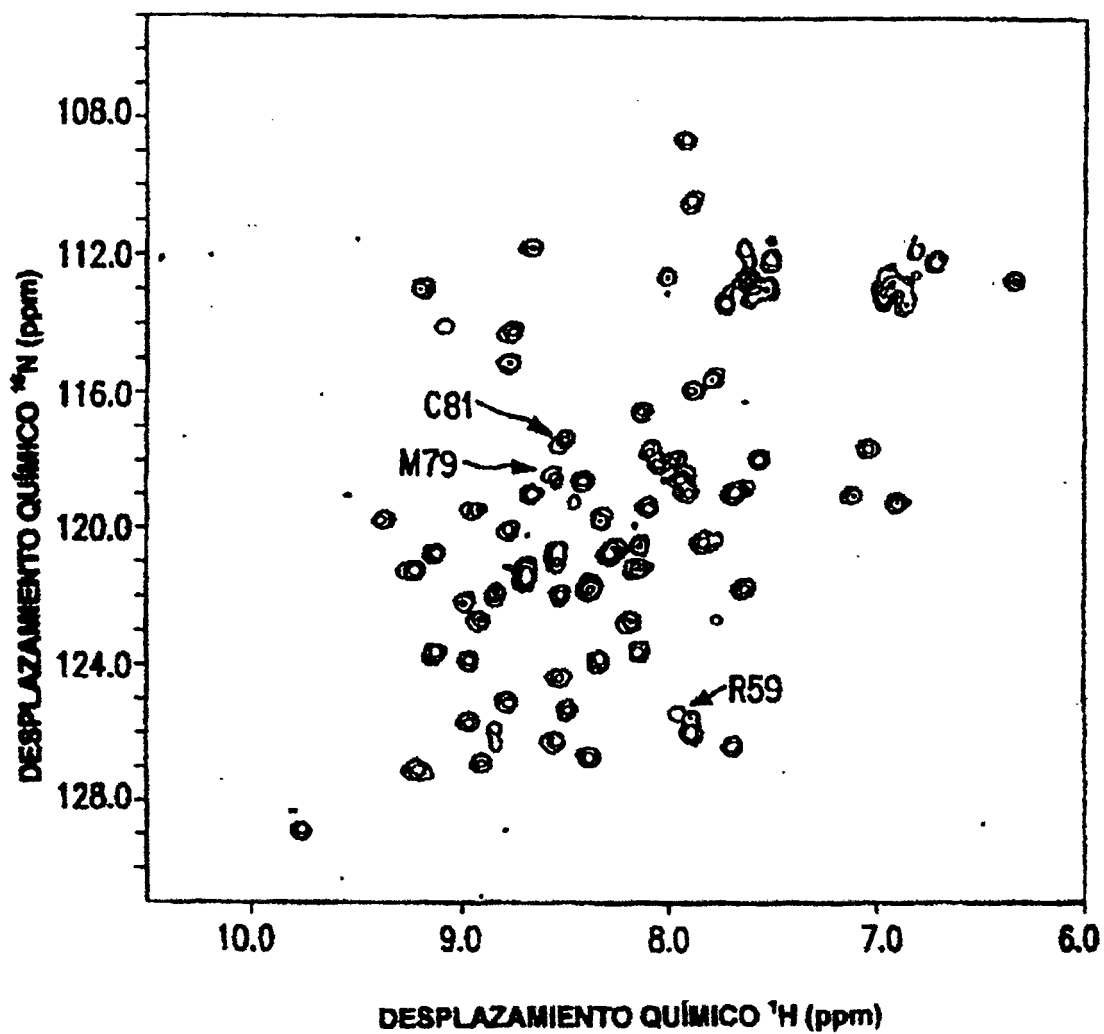


FIG. 5

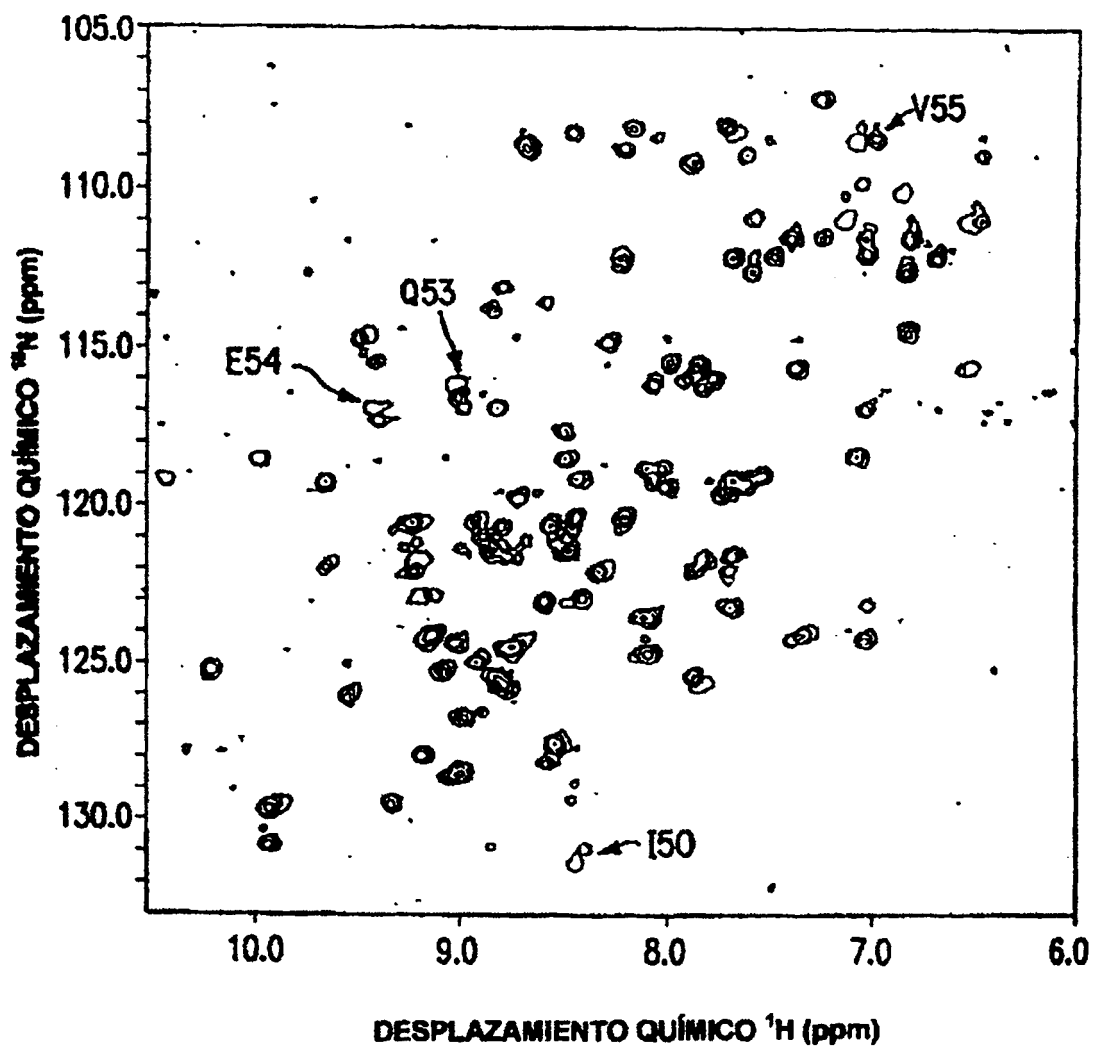


FIG. 6

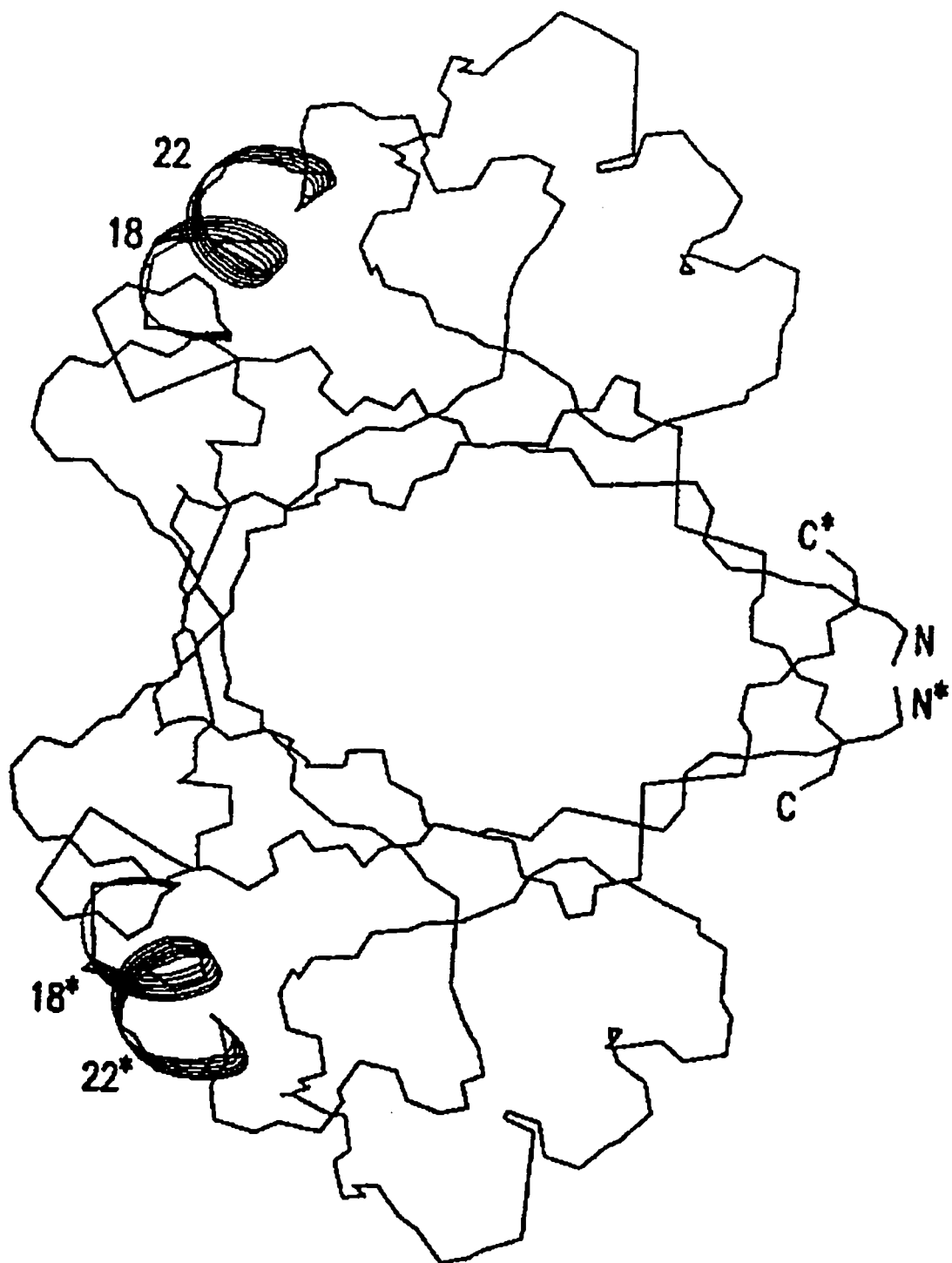


FIG. 7

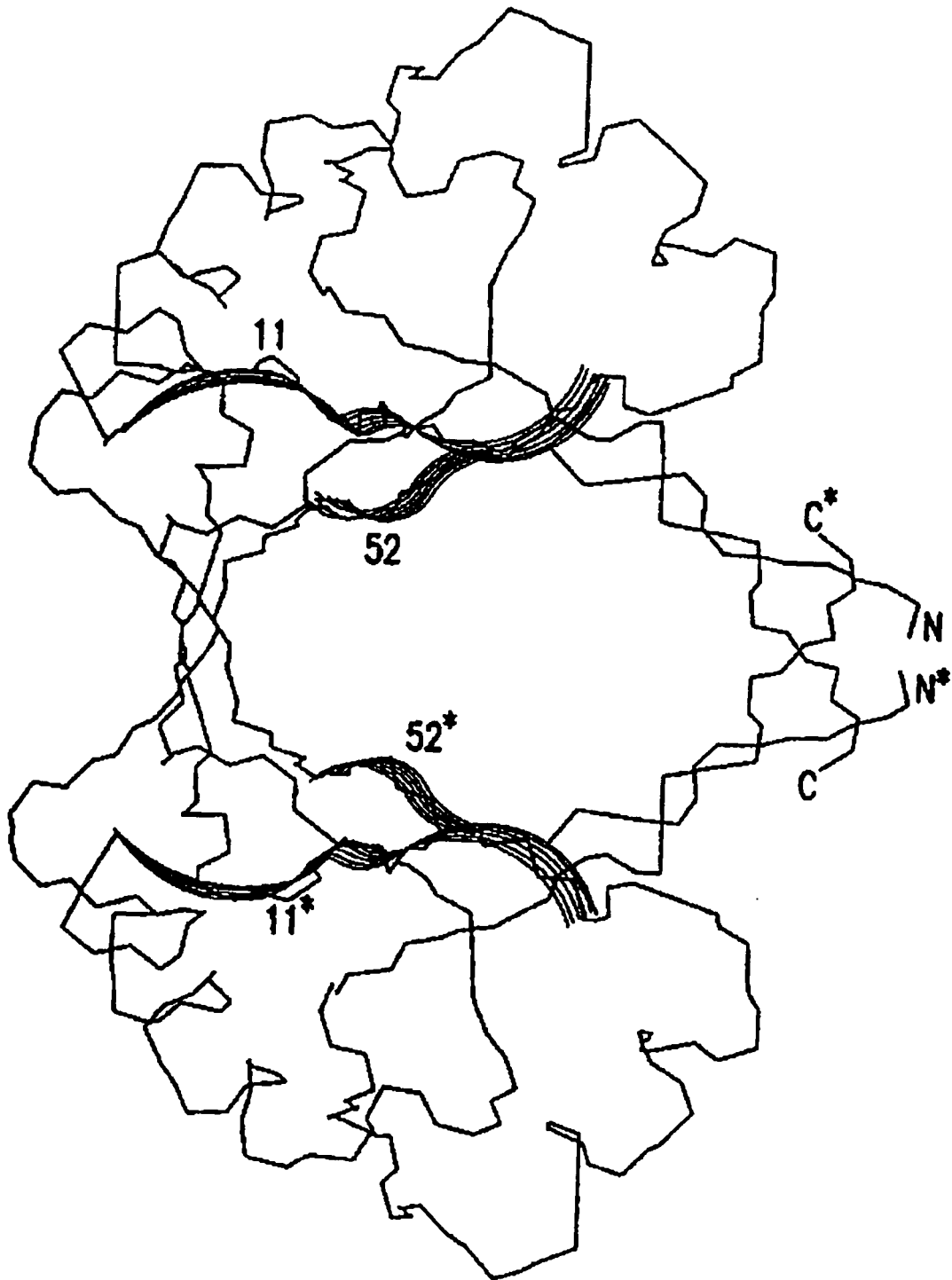


FIG. 8

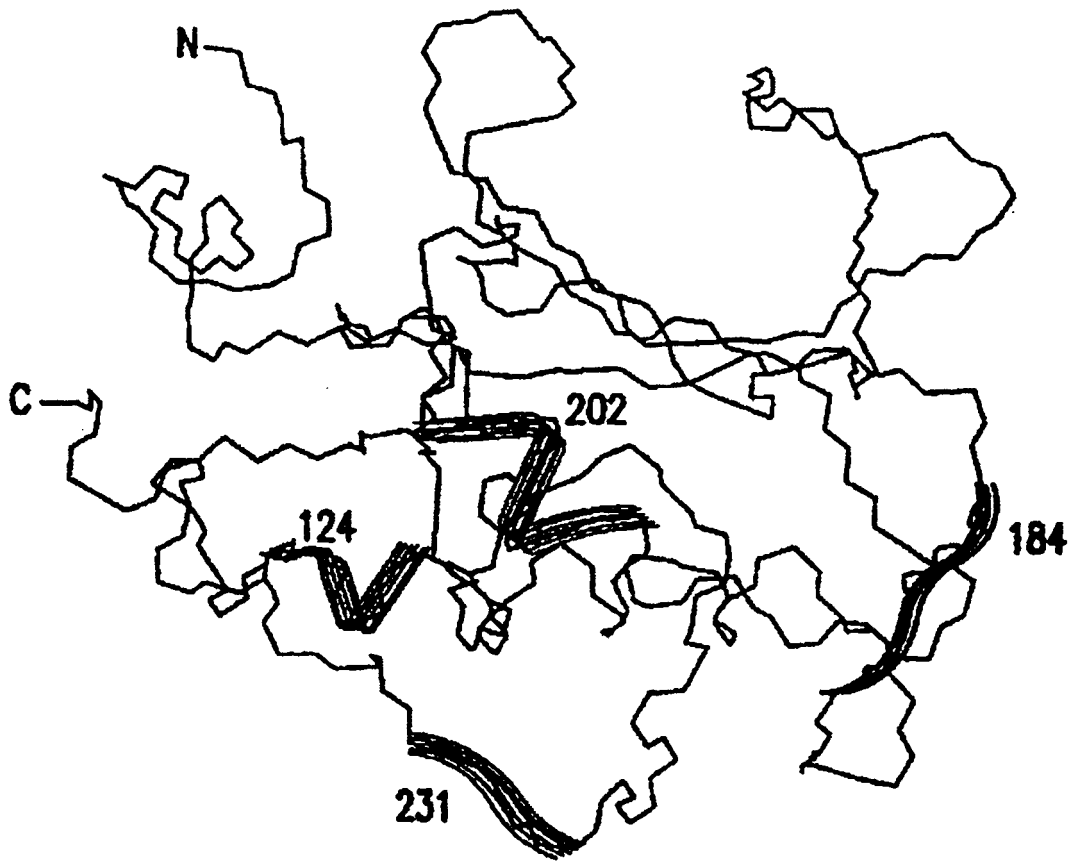


FIG. 9

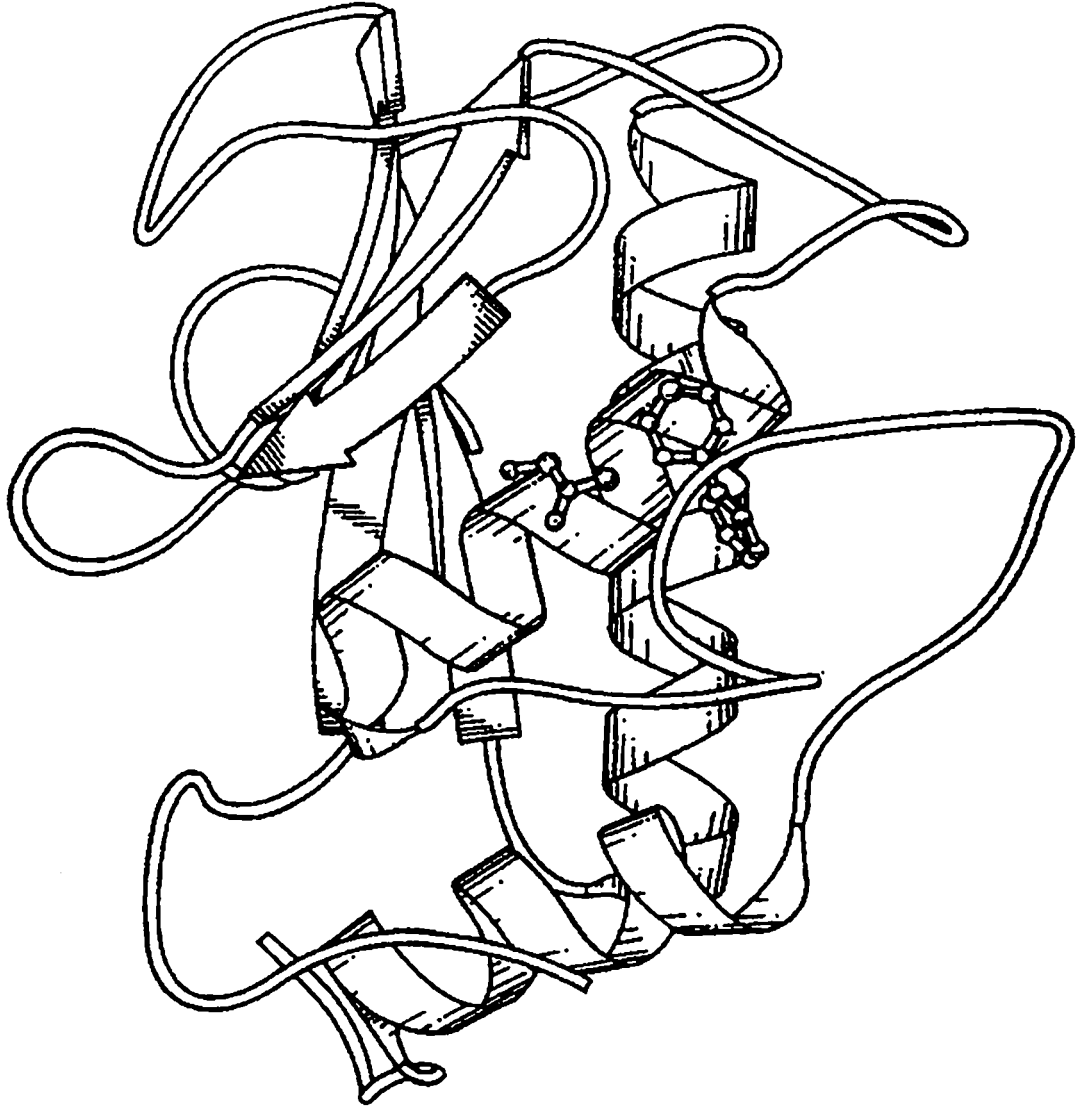


FIG. 10

ES 2 143 793 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Fesik, Stephen W.
Hajduk, Philip J.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Empleo de Resonancia Magnética Nuclear para Identificar Ligandos a
10 Biomoléculas Diana
- 10 (ii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: Steven F. Weinstock, Dept. 377 AP6D,
Abbott Laboratories
- (B) CALLE: 100 Abbott Park Road
- (C) CIUDAD: Abbott Park
- 20 (D) ESTADO: Illinois
- (E) PAÍS: Estados Unidos
- (F) ZIP: 60064-3500
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO MEDIO: Floppy disk
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERADOR: PC-DOS/MS-DOS
- 30 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version # 1.30
- (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:
- (B) NÚMERO DE SOLICITUD:
- 35 (C) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (D) CLASIFICACIÓN:
- (viii) ABOGADO/AGENTE INFORMACIÓN:
- 40 (A) NOMBRE: Janssen, Jerry F.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 29.175
- (ix) INFORMACIÓN POR TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: (708) 937-4558
- (B) TELEFAX: (708) 938-7742

(1) INFORMACIÓN PARA N° de ID SEC: 1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 174 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 55 (C) BANDICIDAD: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° de ID SEC: 1:

65

ES 2 143 793 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° de ID SEC: 3:

GAAATGAAGA GTCTTCAA

18

5

(2) INFORMACIÓN PARA N° de ID SEC: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) BANDICIDAD: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° de ID SEC: 4:

GCGTCCCAGG TTCTGGAG

18

20

(2) INFORMACIÓN PARA N° de ID SEC: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) BANDICIDAD: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° de ID SEC: 5:

ATACCATGGC CTATCCATTG GATGGAGC

28

35

(2) INFORMACIÓN PARA N° de ID SEC: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) BANDICIDAD: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: N° de ID SEC: 6:

ATAGGATCCT TAGGTCTCAG GGGAGTCAGG

30

55

60

65