



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 025**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04740926 .3**

96 Fecha de presentación : **12.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1644512**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Espectroscopia RMN de flúor para cribado bioquímico.**

30 Prioridad: **10.07.2003 US 486099 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

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

72 Inventor/es: **Dalvit, Claudio;**
Ardini, Elena;
Flocco, Maria, Magdalena;
Fogliatto, Gianpaolo;
Mongelli, Nicola y
Veronesi, Marina

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 313 025 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

Espectroscopia RMN de flúor para cribado bioquímico.

5 Antecedentes de la invención

El análisis de un gran número de moléculas en un ensayo celular o bioquímico adecuado es normalmente una de las primeras etapas en un proyecto de investigación de fármacos [Smith A. *Nature* 418, 453-459 (2002)]. El cribado basado en la Polarización de Fluorescencia (FP, del inglés Fluorescence Polarization) [Checovich, W.J. *et al. Nature* 375, 254-256. (1995); Pope, A. J. *et al. Drug Discov. Today* 4, 350-362 (1999)], en la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET, del inglés Fluorescence Resonance Energy Transfer), en la Fluorescencia Homogénea Resuelta en el Tiempo (HTRF, del inglés Homogeneous Time-Resolved Fluorescence) y en el tradicional Ensayo de Proximidad por Escintilación (SPA, del inglés Scintillation Proximity Assay) son actualmente las tecnologías de elección para un ensayo bioquímico [Parker, G. J. *et al. J. Biomol. Screening* 5, 77-88 (2000)]. La sensibilidad y el formato miniaturizado de estas metodologías permite un cribado de elevado rendimiento (HTS, del inglés high throughput screening) de grandes colecciones de compuestos comerciales. Sin embargo, la complejidad de los ensayos utilizados en HTS a menudo tiene como resultado una gran cantidad de aciertos que después no se confirman en un ensayo secundario posterior. Ahora se acepta que en el cribado la calidad sea más importante que la cantidad [Smith A. *Nature* 418, 453-459 (2002)]. Por tanto, están en continuo desarrollo los métodos para realizar ensayos bioquímicos más fiables para la identificación de nuevas moléculas líder.

A lo largo de los últimos años, el cribado basado en la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha emergido como una herramienta poderosa para la identificación de moléculas líder [Hajduk, P. J. *et al. Quarterly Reviews of Biophysics* 32, 211-240 (1999); Stockman, B. J. *et al. Prog. NMR Spectr.* 41, 187-231 (2002); Meyer, S. *et al. Chem. Int. Ed.* 42, 864 (2003)].

Los experimentos de unión competitiva con RMN de flúor se han usado para el cribado de alto rendimiento de mezclas extensas de compuestos [Dalvit Claudio *et al. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 5, 605-611 (2002)]. Se han estudiado aspectos teóricos detallados, consideraciones prácticas y el rango de aplicabilidad [Dalvit Claudio *et al. Journal of the American Chemical Society* 125, 7696-7703 (2003)]. La proteína quinasa B/Akt (PKB) es una proteína quinasa anti-apoptótica que tiene una actividad muy intensa en las malignidades humanas y se seleccionó del cribado de unos 500 compuestos usando un ensayo radioactivo y un ensayo ELISA [Reuveni Hadas *et al. American Chemical Society* 41, 10304-10314 (2002)]. El inhibidor de proteína quinasa, estauroporina, también se puede usar para la estimulación del estallido respiratorio neutrófilo humano a través del péptido formilo [Combadiere Christophe *et al. Blood*, 82, 2890-2898 (1993)].

Aunque la RMN se ha aplicado de forma extensiva para la caracterización de productos de una reacción enzimática o para conseguir comprender la cinética de las reacciones [Percival, M. D. & Withers, S. G. *Biochemistry* 31, 505-512 (1992)], el cribado bioquímico basado en RMN que mide la inhibición o la activación de un enzima para la identificación de nuevas moléculas líder ha encontrado aplicaciones limitadas [Chiyoda T. *et al. Chem. Pharm. Bull.* 46, 718-720 (1998)]. La baja sensibilidad limita la RMN a reacciones enzimáticas con concentración muy elevada de sustrato. Sin embargo, cuando se compara la RMN con otras técnicas utilizadas en HTS, ésta proporciona conjuntos de datos más fiables. Las técnicas de RMN monitorizan la unión de ligandos al receptor por medio de señales de la molécula pequeña o señales de la proteína.

Desarrollos recientes usando experimentos de unión competitiva ^1H -RMN y en particular ^{19}F -RMN han permitido una reducción del gasto de sustrato y de proteína para el cribado. Además, con la medida de un solo punto, estos experimentos proporcionan el valor de la constante de unión del ligando identificado. Percival y Withers usaron un método de RMN para estudiar la unión de un enzima a sus análogos de sustrato fluorados [Percival, M. D. & Withers, S. G. *Biochemistry* 31, 505-512 (1992)]. Dicho método utiliza la detección ^{19}F -RMN y requiere la presencia de un átomo fluorado en sustratos no peptídicos. Entonces se monitorizan las señales ^{19}F de los sustratos de partida y de los transformados enzimáticamente. Los experimentos se pueden realizar en tiempo real permitiendo que la actividad enzimática observada se pueda monitorizar cinéticamente o en un formato de ensayo de punto final.

55 Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la identificación de inhibidores de quinasa usando tecnología RMN.

La presente invención también proporciona un método de RMN para caracterizar la función desconocida de una proteína mediante su interacción con sustratos marcados con CF_3 de otras proteínas de funciones conocidas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona espectros ^{19}F -RMN a 564 MHz para AKTido CF_3 -CO N-prottegido como función del tiempo (indicado en minutos) después del inicio de la reacción enzimática. La proteína activada, el péptido y la concentración de ATP fueron 50 nM, 30 μM y 131 μM , respectivamente. La proteína recombinante WtAKT1 se produjo por infección de células de insecto Sf21 con baculovirus que codifica para la proteína de longitud completa

fundida con el fragmento GST en el extremo N y después se purificó hasta homogeneidad tras eliminación del vector GST. Las muestras estaban en Tris 50 mM pH 7,5, con DTT 1 mM y MgCl_2 5 mM. Los espectros se registraron a 20°C en ausencia (Figura 1A superior) y en presencia (Figura 1B inferior) de estaurosporina 10 μM . Para cada espectro se registraron un total de 256 barridos con un tiempo de repetición de 2,8 s (12 minutos de tiempo de medida). Los desplazamientos químicos están referenciados al ácido trifluoroacético.

La Figura 2 proporciona (Figura 2A superior) espectros ^{19}F -RMN a 564 MHz para AKTido CF_3 -CO N-protégido registrados con tres concentraciones diferentes (indicadas en μM) para ATP. La proteína activada y las concentraciones de péptido fueron 40 nM y 30 μM , respectivamente. Las muestras estaban en Tris 50 mM pH 7,5, con DTT 1 mM y MgCl_2 5 mM. La reacción se realizó a 22°C y tras 60 minutos se inhibió con la adición de estaurosporina 10 μM . (Figura 2B inferior) Integral del péptido fosforilado como función de la concentración de ATP y el mejor ajuste de los datos experimentales con la K_M derivada para ATP de 89 +/- 17 μM .

La Figura 3 proporciona (Figura 3A superior) espectros ^{19}F -RMN a 564 MHz para AKTido CF_3 -CO N-protégido registrados con tres concentraciones diferentes (indicadas en μM) para el inhibidor H89. La proteína activada, el péptido y la concentración de ATP fueron 40 nM, 30 μM y 131 μM , respectivamente. Las muestras estaban en Tris 50 mM pH 7,5, con DTT 1 mM y MgCl_2 5 mM. La reacción se realizó a 22°C y tras 120 minutos se inhibió con la adición de estaurosporina 10 μM . (Figura 3B inferior) Integral del péptido fosforilado como función de la concentración de inhibidor y el mejor ajuste de los datos experimentales con la IC_{50} derivada para H89 de 0,72 +/- 0,05 μM .

La Figura 4 proporciona el cribado de proteasas, donde el sustrato es el péptido de Sec. ID nº 2 y la proteína es tripsina de páncreas bovino. Espectro ^{19}F RMN para el péptido, en ausencia (a) y en presencia (b-e) de tripsina. La reacción se realizó a 22°C y tras 30 minutos se inhibió con la adición de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM. La reacción se realizó en ausencia del compuesto (b), en presencia de una mezcla de cinco compuestos (2-amino-6-metilquinazolin-4-ol, etil 2-quinoxalincarboxilato, 5-metil-benzimidazol, metil isoquinolin-3-carboxilato y leupeptina) (c), en presencia de la misma mezcla sin leupeptina (d) y sólo en presencia de leupeptina (e). La proteína, el péptido y las concentraciones de compuesto fueron 15 nM, 30 μM y 20 μM , respectivamente. Para cada espectro se registraron un total de 128 barridos con un tiempo de repetición de 2,8 s (6 minutos de tiempo de medida). Pep y C-pep son el sustrato y el producto, respectivamente. Los asteriscos en (c) y (e) indican el desplazamiento químico de la señal que falta del péptido roto.

La Figura 5 proporciona el espectro ^{19}F del péptido de Sec. ID nº 2 en presencia de tres proteínas diferentes, AKT1 25 nM (Figura 5A superior), tripsina 15 nM (Figura 5B central) y PAK4 150 nM (Figura 5C inferior). El péptido es un buen sustrato para AKT1 y tripsina. El desplazamiento químico del péptido roto es bastante diferente si se compara con el desplazamiento químico del péptido fosforilado. La reacción llevada a cabo en presencia de proteína PAK4 activada en p-21 tiene como resultado la aparición de una señal en el desplazamiento químico del péptido fosforilado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención supera las limitaciones del cribado bioquímico con RMN en lo referente a las concentraciones de proteína y sustrato, si se compara con técnicas HTS anteriores. La presente invención proporciona un método de RMN novedoso y sensible en el que se usa un fragmento con tres átomos de flúor (CF_3) para marcar un sustrato. El uso de un sustrato marcado con CF_3 , p. ej., un péptido marcado con CF_3 , permite el cribado bioquímico rápido y fiable a concentraciones de proteína y sustrato comparables a las concentraciones utilizadas en las técnicas HTS estándar. El método de RMN de la presente invención tiene ventajas únicas. i) La espectroscopia RMN de fluoruro es muy sensible, 0,83 veces la de protón. ii) Las señales de flúor aparecen como resonancias singulete agudas (los experimentos no requieren desacoplamiento de protón si el CF_3 no está acoplado escalarmente a protones) que se originan a partir de los tres átomos de flúor, y por tanto, la señal es muy intensa. Esta propiedad es crucial para el cribado porque permite el uso de concentraciones de sustrato en el intervalo de su K_m , permitiendo así la detección de inhibidores medios y débiles. iii) No hay interferencias espectrales de solventes protonados, tampones o detergentes usados típicamente en reacciones enzimáticas. La superposición con las señales del sustrato en presencia de las moléculas que contienen CF_3 representa un evento extremadamente raro debido al número limitado de señales ^{19}F singulete agudas (las moléculas tendrán típicamente un grupo CF_3) y a la gran dispersión del desplazamiento químico ^{19}F . iv) El desplazamiento químico isotrópico ^{19}F es muy sensible al entorno químico [Gerig, J.T. Prog. NMR Spectrosc. 26, 293-370 (1994)], lo que da como resultado desplazamientos químicos diferenciales para las resonancias del sustrato de partida y del sustrato transformado enzimáticamente, permitiendo así una comparación directa de sus intensidades.

En una realización de la presente invención, se ha utilizado RMN para medir la fosforilación de un sustrato marcado con CF_3 mediante la proteína Ser/Thr quinasa AKT1. La proteína quinasa AKT1 es una proteína quinasa anti-apoptótica que tiene una actividad elevada en varias malignidades humanas [Staal, S. P. *et al.* J. Exp. Med. 167, 1259-1264 (1988); Bellacosa, A. *et al.* Science 254, 274-277 (1991)]. El sustrato AKTido es un péptido de 14 aminoácidos [Obata, T. *et al.* J. Biol. Chem. 46, 36108-36115 (2000)] que fue marcado con un fragmento CF_3 por protección terminal con anhídrido trifluoroacético, dando como resultado el péptido (CF_3 -CO-ARKRERAYSFGHHA) (Sec. ID nº 1). Las alternativas pueden incluir la introducción del grupo CF_3 en el C terminal vía formación de amida con una trifluorometilamina o la sustitución de un aminoácido durante la síntesis peptídica por un aminoácido fluorado (CF_3) (p. ej., Tyr con para- CF_3 Phe). El CF_3 en el N terminal, el C terminal o el aminoácido sustituido (el para- CF_3 Phe apunta hacia el solvente, mientras la Ser que debe ser fosforilada apunta hacia el enzima) está situado fuera del sitio

de fosforilación de la serina y por consiguiente no interfiere en la unión. En el caso de sustratos no peptídicos, es necesaria la síntesis química para la introducción del fragmento CF₃ en la posición apropiada en el sustrato.

Se realizó una reacción enzimática mediante incubación del péptido marcado con CF₃ no fosforilado de Sec. ID nº 1 en presencia de ATP y proteína quinasa AKT1 activada. La conversión del péptido no fosforilado en un péptido fosforilado generó un desplazamiento de la señal ¹⁹F como se indica en la Figura 1 (arriba), que muestra el espectro ¹⁹F que contiene la señal del fragmento CF₃ del sustrato como una función del tiempo tras el inicio de la reacción enzimática. A tiempo 0 sólo se observa una señal, correspondiente a las especies no fosforiladas del péptido. Con el tiempo la señal del péptido no fosforilado disminuye y aparece una nueva señal en el espectro, correspondiente al péptido fosforilado. La suma de las dos señales integrales en cualquier momento después del inicio de la reacción corresponde a la integral de la señal del péptido no fosforilado a tiempo 0. La reacción enzimática es completa tras 149 minutos y sólo la señal del péptido fosforilado es visible en el espectro.

La misma reacción realizada en presencia del fuerte inhibidor estaurosporina no tuvo como resultado la formación de péptidos fosforilados, como es evidente en la Figura 1 (abajo). A pesar de la gran distancia del grupo CF₃ desde el sitio de fosforilación, los desplazamientos químicos de este fragmento son diferentes en los péptidos fosforilados y en los no fosforilados.

Como método de cribado, la reacción se puede llevar a cabo en presencia de una mezcla de compuestos que contiene un inhibidor. Así, se realiza la deconvolución de la mezcla activa para identificar cuál de los compuestos de la mezcla es el inhibidor. De acuerdo con la presente invención, deconvolución significa que la reacción se realiza repetidamente en presencia de una mezcla y en ausencia de cada uno de los compuestos. Es decir, no hay inhibición cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de la mezcla menos el compuesto inhibidor. Para confirmar el efecto inhibidor de uno de los compuestos, se puede observar la inhibición cuando la reacción se realiza también en presencia de un solo compuesto inhibidor que fue identificado a partir de la muestra. Como ejemplo, la reacción del péptido no fosforilado marcado con CF₃ de Sec. ID nº 1, ATP y proteína quinasa activada AKT1 también se realizó en presencia de una mezcla de cinco moléculas que contienen el compuesto H89 [Reuveni, H. *et al.* Biochemistry 41, 10304-10314 (2002)], un inhibidor de AKT1. El resultado fue la inhibición de la fosforilación del péptido. No hubo inhibición de la fosforilación del péptido cuando esta reacción se llevó a cabo en presencia de la mezcla en ausencia de H89. El efecto inhibidor de H89 sobre la fosforilación del péptido fue confirmado cuando la reacción se realizó sólo en presencia de H89.

Con finalidades de cribado y mediciones de IC₅₀, la reacción se para típicamente tras un retraso establecido que dependerá de las concentraciones de enzima y ATP y de K_{cat}. La reacción puede ser inhibida, bien por adición de una solución concentrada de EDTA o por desnaturalización de la proteína. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, se emplea un método más económico para inhibir la reacción, es decir, la adición del fuerte inhibidor estaurosporina aproximadamente 5 a 10 µM (IC₅₀ en el rango nM inferior). Incluso tras varias horas desde la adición de estaurosporina no se observaron cambios del espectro ¹⁹F. Tras la inhibición se monitorizó la relación de las intensidades de señal de las dos señales ¹⁹F. En ausencia de un inhibidor, la relación de intensidades de señal I_(p) / I_(noP) corresponde al 0% de la inhibición mientras que cuando la relación es 0 corresponde al 100% de la inhibición. Este método sólo es válido si la concentración de péptido es siempre la misma, de otro modo se debe monitorizar la integral de la señal del péptido fosforilado.

La constante de unión disociación del ATP se debe calcular primero para optimizar la concentración de ATP usada para los experimentos de cribado y para derivar la constante de unión de los aciertos de su IC₅₀. Para este propósito se registran reacciones a diferentes concentraciones de ATP [Fersht, A. Enzyme Structure and Mechanism, W.H. Freeman and Company, New York 1985]. La intensidad de señal del péptido fosforilado como función de la concentración de ATP se muestra en la Figura 2. El ajuste de los datos experimentales tiene como resultado una constante de unión para ATP (en presencia de sustrato 30 µM) de 89 +/- 17 µM.

De acuerdo con la presente invención, el cribado se realiza primero a una sola concentración para los compuestos de la librería. Los compuestos pueden ser cribados en mezclas pequeñas o grandes. Por ejemplo, si sólo se consideran inhibidores fuertes con IC₅₀ < 5 µM, entonces será suficiente usar moléculas a una concentración de aproximadamente 5 µM. En la práctica, la fiabilidad del método de la presente invención permite la identificación de un inhibidor más débil, con p. ej., un IC₅₀ en el intervalo 10-20 µM, incluso si la concentración de las moléculas cribadas es sólo de aproximadamente 5 µM. Como muestra la Figura 5, las concentraciones de sustrato pueden bajar hasta aproximadamente 10-20 nM. Esta baja concentración permite la preparación de mezclas con un gran número de componentes sin graves problemas de agregación o solubilidad. Entonces se lleva a cabo la deconvolución de la mezcla activa para la identificación del inhibidor. Para la caracterización del IC₅₀ de los aciertos se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de inhibidor, como muestra la Figura 3 para el compuesto H89 [Reuveni, H. *et al.* Biochemistry 41, 10304-10314 (2002)]. En ausencia de efectos alostéricos un valor significativo de IC₅₀ se deriva con una medida de punto único. Con el método de la presente invención también se puede usar un análogo de ATP marcado con CF₃. En este caso se monitorizan las señales ¹⁹F de ATP y ADP. Se pueden identificar los inhibidores que se unen en el bolsillo de unión del ATP o los inhibidores que compiten con el péptido por el sitio de unión del sustrato.

Por consiguiente, el método de la presente invención representa un ensayo simple y fiable, porque es homogéneo y detecta directamente tanto el sustrato fosforilado como el no fosforilado. El ensayo de ¹⁹F-RMN no requiere i) la presencia de reacciones secundarias realizadas con enzimas o anticuerpos específicos o ii) etapas de separación y/o

lavado necesarias para la lectura con otros métodos. La simplicidad del método tiene como resultado una identificación fiable de las moléculas líder y una cuantificación de la actividad inhibidora de las moléculas. También se pueden seleccionar con seguridad compuestos que muestran sólo una actividad inhibidora débil. Pequeños cambios químicos de los inhibidores débiles o la selección de moléculas similares que presentan la misma estructura puede dar como resultado la identificación de inhibidores potentes.

En otras técnicas HTS reconocidas, a menudo la concentración real difiere de la concentración nominal. Una gran diferencia en la concentración del compuesto tiene como resultado un error significativo de la IC_{50} derivada. Las causas de las diferencias de concentración en otras técnicas HTS anteriores de esta ciencia se pueden atribuir a errores de pesada, impurezas de la muestra, baja solubilidad del compuesto e inestabilidad química en medio acuoso. Por el contrario, con el método de RMN de la presente invención, estas propiedades químicas se pueden medir fácilmente adquiriendo un espectro de protón, además del espectro de flúor. Por consiguiente, la concentración real de inhibidor determinada con 1H -RMN permite una medida significativamente más precisa del valor IC_{50} .

El método de la presente invención no se limita sólo a la identificación de inhibidores, sino que también se puede usar para la detección de agonistas. En el caso de las proteína quinasas, la señal ^{19}F del péptido fosforilado en presencia de un agonista es mayor si se compara con la misma señal de la muestra de referencia (es decir, la muestra para la cuál se realizó la reacción en ausencia de los compuestos que se tienen que cribar).

La concentración de la proteína usada con este método puede reducirse a nanomolar, comparándose favorablemente con la concentración usada en otras técnicas HTS. Sin embargo, el volumen necesario para cada muestra de RMN usando una sonda de 5 mm es aproximadamente 500-550 μl . De acuerdo con la presente invención, con el uso de una sonda de inyección de flujo o una sonda de 3 mm se consigue una reducción de 2 a 3 veces el volumen. La elevada sensibilidad de la señal de CF_3 permite la adquisición rápida de los espectros. Además, los mismos espectros se pueden registrar incluso con mayor rapidez con el uso de tecnología criogénica aplicada a la detección ^{19}F . Por consiguiente, con los ajustes del método actual, espectros que requieren un tiempo de adquisición de 3 minutos se pueden registrar en sólo 12 segundos. Además, los problemas de amortiguación de la radiación encontrados en los experimentos detectados con protón registrados con criosondas no se producen en la metodología de detección de flúor de la presente invención, por la baja concentración del sustrato marcado con CF_3 .

Se puede usar albúmina de suero bovino (BSA, del inglés Bovine serum albumin) con el método de la presente invención para evitar la adhesión de la proteína a la pared del tubo [Hlady, V. *et al.* Curr. Opin. Biotechnol. 7, 72-77 (1996)]. Sin embargo, mientras la reacción enzimática en presencia de BSA se vuelve más rápida debido al hecho que todo el enzima está disponible en la solución, la IC_{50} del compuesto se puede debilitar a causa del secuestro de compuestos de la solución por parte de BSA. Por consiguiente, el presente método llevado a cabo en presencia o ausencia de BSA o albúmina de suero humano (HSA, del inglés human serum albumin), para que los compuestos acierto dirijan la fase de optimización, puede proporcionar importante información estructural para el diseño de análogos con actividad inhibidora retenida al enzima diana y afinidad reducida a la albúmina.

El método de la presente invención se puede aplicar también a varios tipos y subtipos diferentes de enzimas (p. ej., proteasas, fosfatasas, ligasas, etc.). En otra realización de la presente invención, el cribado se puede realizar con tripsina, una proteasa que rompe enlaces peptídicos C terminales de lisina y arginina [Price, N.C. *et al.* Fundamentals of Enzymology, Oxford University Press, Oxford, U.K. (1999)], y como sustrato, el péptido (ARKRERAF(3- CF_3) SFGHHA) (Sec. ID n° 2). Como muestra la Figura 4b, en presencia de tripsina, dos señales ^{19}F son visibles en el espectro a 13,38 y 13,33 ppm originadas por el péptido de partida y el péptido roto, respectivamente. Se realizó el cribado en un formato de ensayo de punto final donde la reacción se inhibió tras un retraso definido usando un inhibidor de tripsina conocido (Figura 4c). La deconvolución de la mezcla activa se realizó entonces para la identificación del inhibidor (Figura 4d, e). Por consiguiente, con este método se pueden cribar fácilmente extractos de productos naturales. Los componentes de los extractos activos se separan entonces vía cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se analizan como compuestos individuales con el método de la presente invención para la identificación del compuesto responsable de la actividad inhibidora.

Otra aplicación del método de la presente invención es la determinación de la función de la proteína. En vista de la disponibilidad de secuenciación de genoma de alto rendimiento, se han identificado centenares de proteínas. Sin embargo, se desconoce la función de muchas de estas proteínas. La función de la proteína puede ser inferida de los tipos de sustratos que pueden ser modificados. Con esta finalidad se ha generado una librería genómica funcional de sustratos marcados con CF_3 de enzimas de función conocida. Estos sustratos se ensayan primero en sus respectivos enzimas conocidos para determinar los desplazamientos químicos de ^{19}F del sustrato de partida y del modificado. Algunos sustratos pueden actuar como sustratos para diferentes clases de enzimas. Esta librería de sustratos se criba entonces como compuestos simples o en pequeñas muestras frente a la proteína con función desconocida. La reducción en la intensidad de señal de una señal ^{19}F y la aparición de una nueva resonancia en un desplazamiento químico conocido permite reconocer la función de la proteína.

En otra realización de la presente invención, tres proteínas diferentes, AKT1, tripsina y proteína activada en p-21 (PAK4) se incubaron con el péptido marcado con CF_3 de Sec. ID n° 2. Como se muestra en la Figura 5, la reacción en presencia de PAK4 tiene como resultado la aparición de una señal ^{19}F con un desplazamiento químico similar al desplazamiento de un péptido fosforilado, como con la señal ^{19}F de la reacción en presencia de AKT1. El resultado permitió la clasificación de PAK4 en la familia quinasa. Puede ser necesaria una concentración mayor de la proteína

con función desconocida y un periodo de incubación más largo, porque el sustrato puede no ser óptimo para la proteína con función desconocida. La velocidad de la reacción enzimática de PAK4 es sólo 1/22 veces la velocidad de AKT1, por consiguiente, el periodo de tiempo para la reacción en presencia de PAK4 fue más largo que el periodo de tiempo para la reacción en presencia de AKT1. El método de la presente invención también es aplicable a enzimas activados.

El método de la presente invención extiende las capacidades de la RMN a las reacciones enzimáticas realizadas por Ser/Thr quinasas. El método se comporta bien y proporciona un conjunto fiable de datos experimentales.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

La proteína recombinante WtAKT1 se produjo por infección de células de insecto sf21 con baculovirus codificante para la proteína de longitud completa fundida a GST en el extremo N. Las células se trataron con ácido oadaico durante 4 horas antes del sembrado. Este tratamiento que inhibe las fosfatasas celulares incrementa el nivel de fosforilación total de la proteína conduciendo a la fosforilación de los dos sitios críticos para la actividad AKT, la treonina 308 en el bucle de activación y la serina 473 en el motivo hidrófobo C terminal. La lisis, la purificación y la eliminación del vector GST se realizaron mediante los procedimientos estándar siguientes. La tripsina, adquirida de Roche Molecular Biochemical (n° Cat. 1418025) se disolvió en solución de ácido acético 1% a una concentración madre final de 8,33 μ M.

La serina/treonina quinasa activada en p-21 PAK4 se expresó como una proteína de fusión GST en *Escherichia coli* y se purificó hasta homogeneidad tras eliminación del vector GST.

Todos los compuestos se prepararon en soluciones madre en DMSO (20-40 nM). Los péptidos de Sec. ID n° 1 y Sec. ID n° 2 y leupeptina se prepararon en soluciones acuosas a una concentración de 10 y 2,1 mM, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en Tris 50 mM pH 7,5 con DTT 1mM y $MgCl_2$ 5 mM para AKT1 y Tris 50 mM pH 7,5 para tripsina. Se añadió D_2O a las soluciones (concentración final 8%) para la señal de enclavamiento. Las reacciones enzimáticas se realizaron a temperatura ambiente en viales Eppendorf y después se inhibieron tras un retraso definido con la adición de estaurosporina para AKT1 y PMSF para tripsina. Las soluciones se transfirieron después a tubos de RMN de 5 mm.

Todos los espectros RMN se registraron a 20°C con un espectrómetro RMN 600 operando a una frecuencia de Larmor ^{19}F de 564 MHz. Una sonda de 5 mm sintonizable tanto para frecuencia ^{19}F como 1H . El instrumento se equipó con un muestreador automático con sistema de gestión de muestras (SMS, del inglés sample management system) para la recogida automática de datos. Los datos se adquirieron sin desacoplamiento de protón con un tiempo de adquisición de 0,8 segundos y un retraso de relajación de 2,8 segundos. Los desplazamientos químicos se referencian al ácido trifluoroacético.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de inhibidores de un enzima que comprende:

- a) marcaje de un sustrato de dicho enzima con un fragmento CF_3 ;
- b) medición de un desplazamiento de la señal ^{19}F para dicho sustrato marcado con CF_3 en presencia de dicho enzima a lo largo de un periodo de tiempo, siendo dicho periodo de tiempo el tiempo requerido para la conversión de un sustrato no modificado marcado con CF_3 en un sustrato marcado con CF_3 modificado por dicho enzima;
- c) medición de un desplazamiento de la señal ^{19}F para dicho sustrato marcado con CF_3 en presencia de dicho enzima, y un inhibidor o una mezcla que contiene un inhibidor a lo largo de dicho periodo de tiempo, y
- d) identificación de un inhibidor por deconvolución de dicha mezcla que contiene el inhibidor.

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho enzima es una quinasa.

3. Un método para la identificación de agonistas de un enzima que comprende:

- a) marcaje de un sustrato de dicho enzima con un fragmento CF_3 ;
- b) medición de un desplazamiento de la señal ^{19}F para dicho sustrato marcado con CF_3 en presencia de dicho enzima a lo largo de un periodo de tiempo, siendo dicho periodo de tiempo el tiempo requerido para la conversión de un sustrato no modificado marcado con CF_3 en un sustrato marcado con CF_3 modificado por dicho enzima;
- c) medición de un desplazamiento de la señal ^{19}F para dicho sustrato marcado con CF_3 en presencia de dicho enzima, y un agonista o una mezcla que contiene un agonista a lo largo de dicho periodo de tiempo; y
- d) identificación de un agonista por deconvolución de dicha mezcla que contiene el agonista.

4. El método según la reivindicación 3, en el que dicho enzima es una quinasa.

5. Un método para la caracterización de la función desconocida de un enzima que comprende:

- a) marcaje de un sustrato de un enzima de función conocida con un fragmento CF_3 ;
- b) medición de un desplazamiento de la señal ^{19}F para dicho sustrato marcado con CF_3 en presencia del enzima activado de función conocida a lo largo de un periodo de tiempo, siendo dicho periodo de tiempo el tiempo requerido para la conversión de un sustrato no modificado marcado con CF_3 en un sustrato marcado con CF_3 modificado por dicho enzima de función conocida; y
- c) medición de un desplazamiento de la señal ^{19}F para dicho sustrato marcado con CF_3 en presencia de un enzima activado de función desconocida a lo largo de un periodo de tiempo, siendo dicho periodo de tiempo el tiempo requerido para la conversión de un sustrato no modificado marcado con CF_3 en un sustrato marcado con CF_3 modificado por dicho enzima de función desconocida.

6. El método según la reivindicación 5, en el que el enzima de función conocida es una quinasa, una proteasa, una fosfatasa o una ligasa.

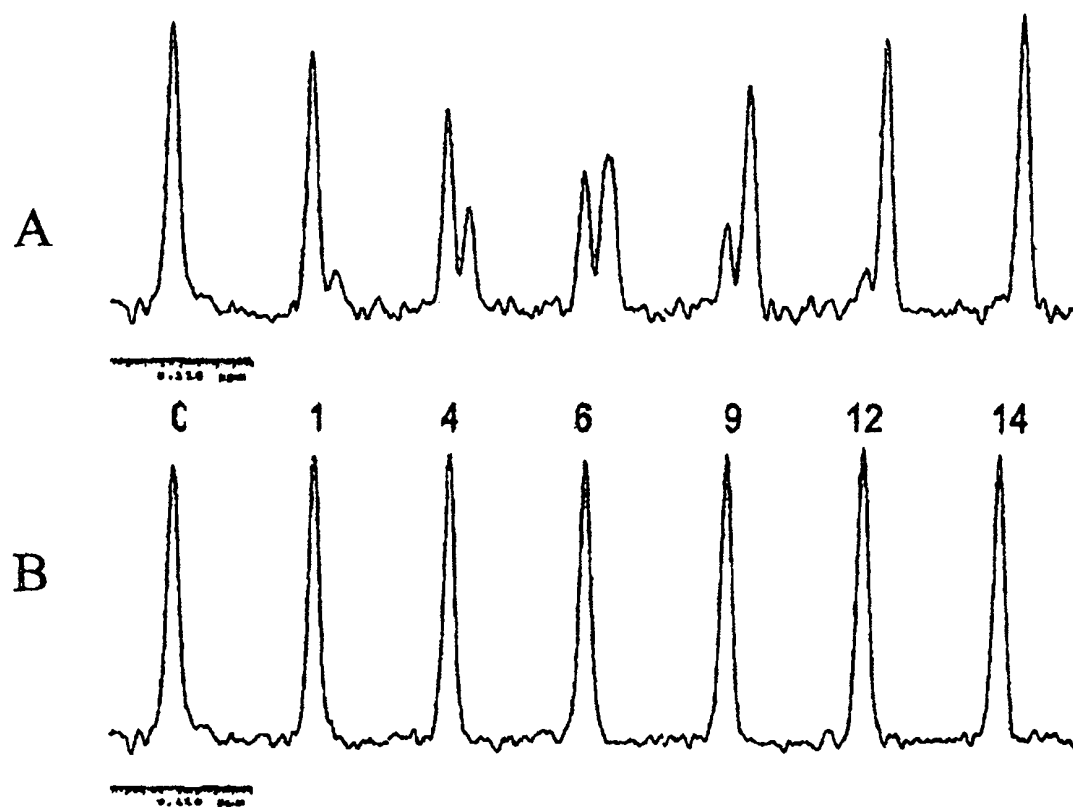


Figura 1

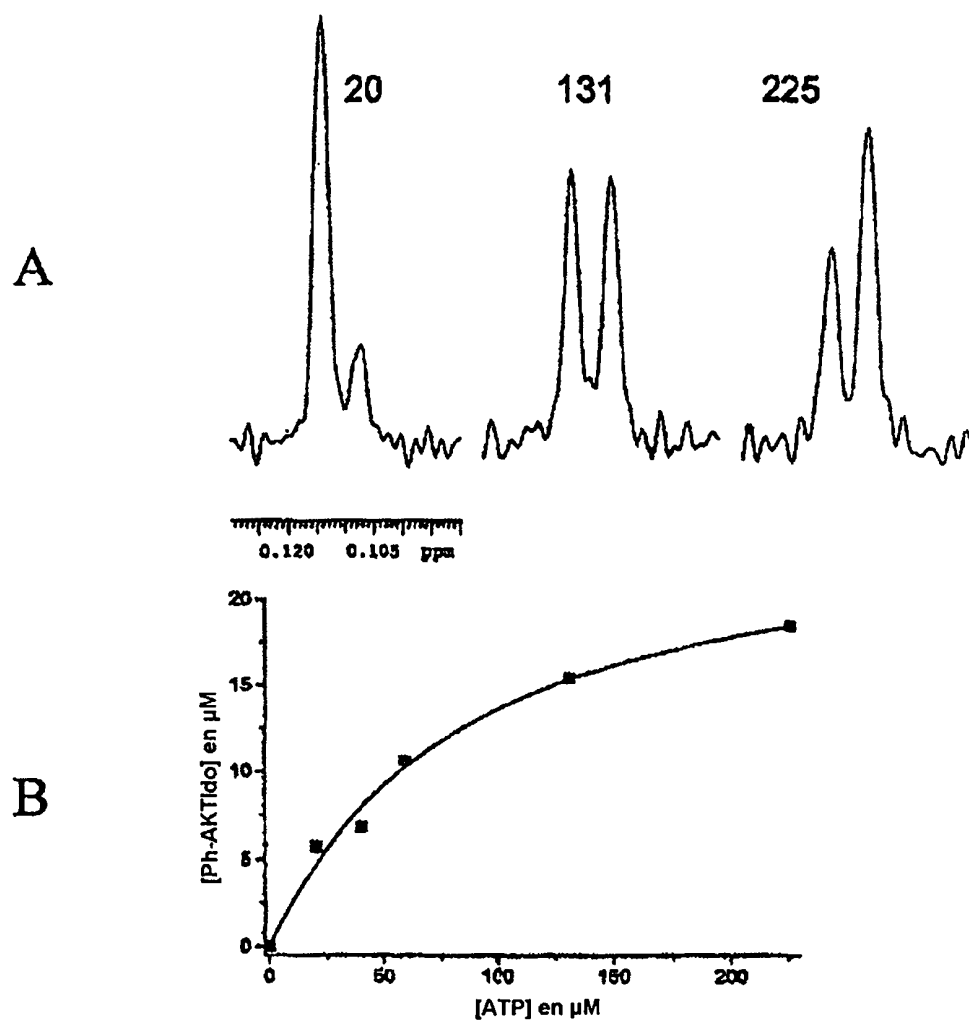


Figura 2

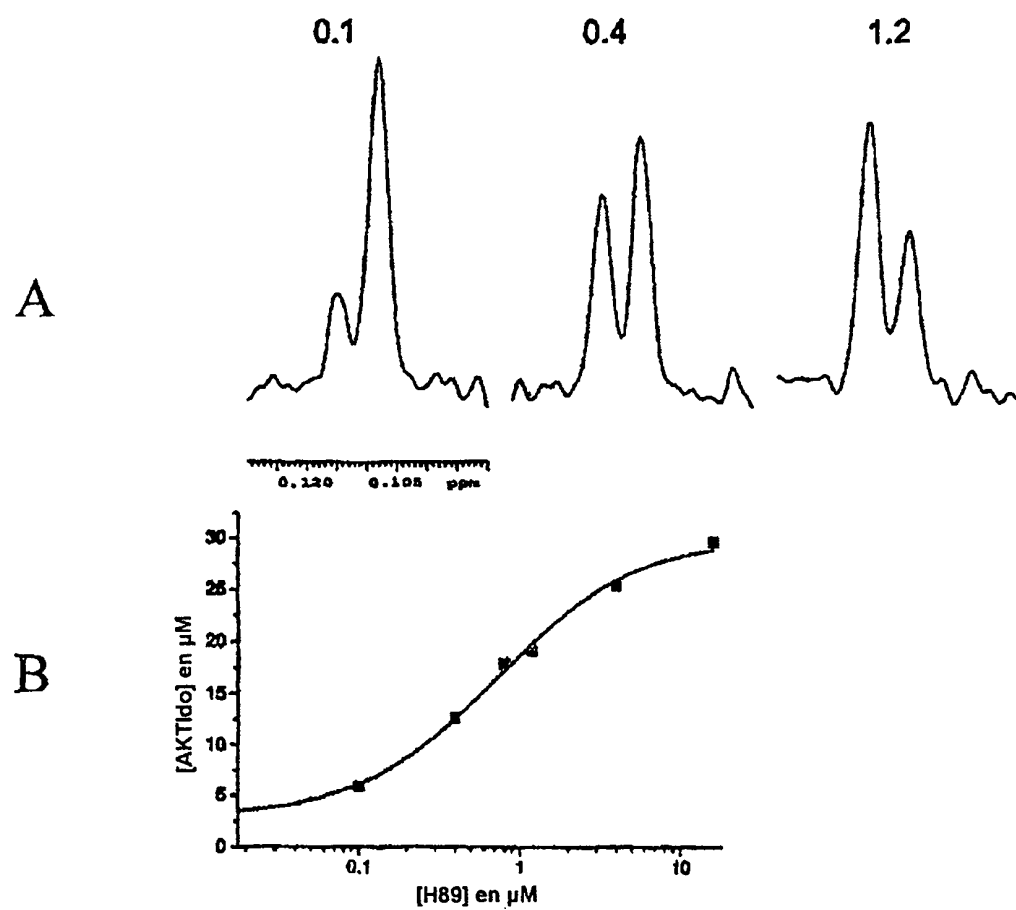


Figura 3

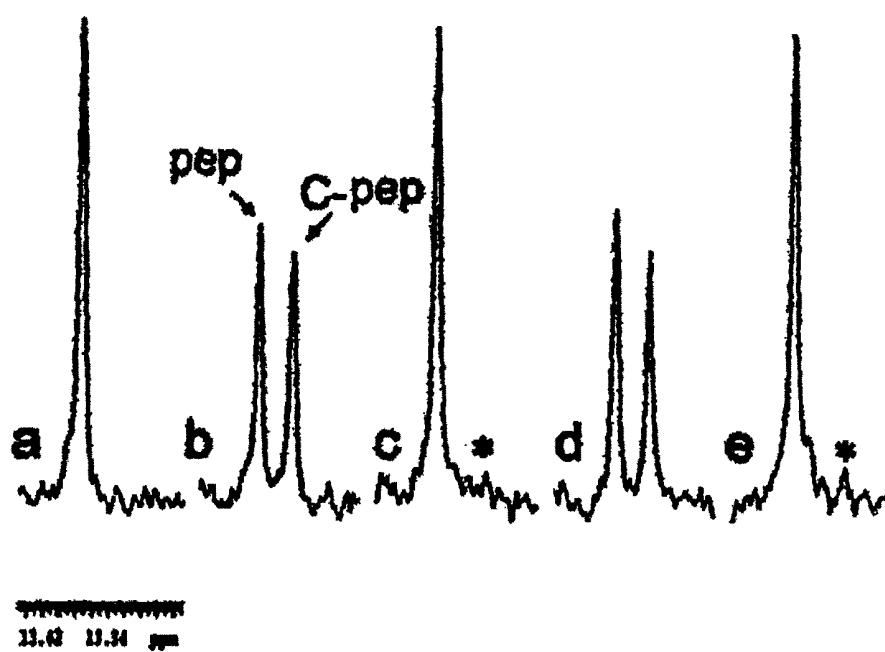


Figura 4

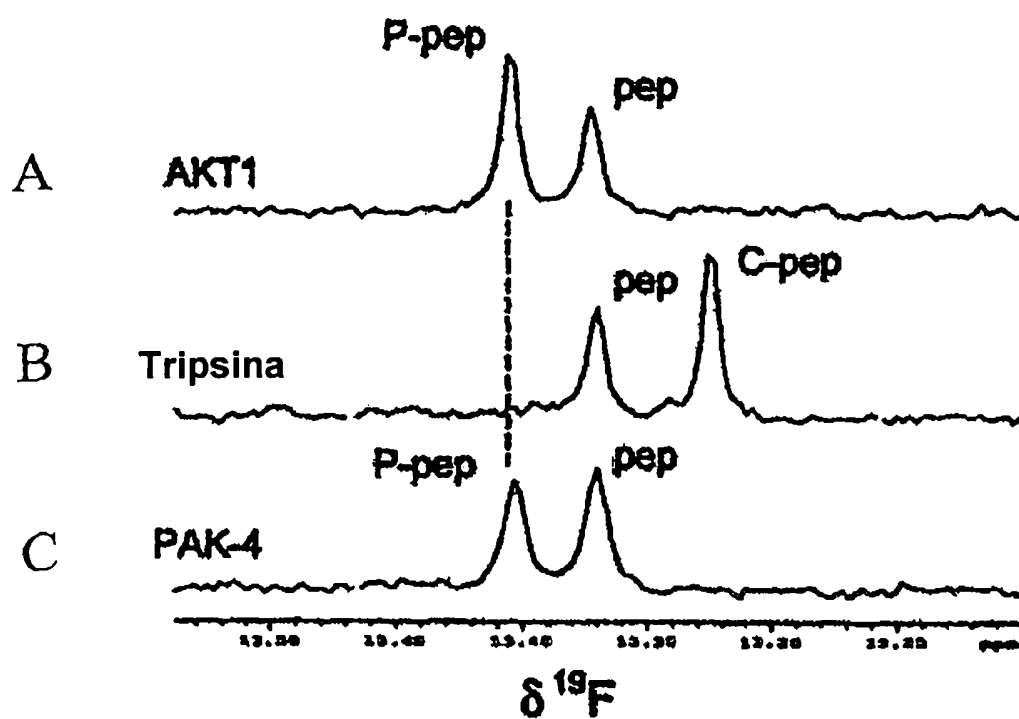


Figura 5

ES 2 313 025 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 Dalvit, Claudio
Ardini, Elena
Flocco, Maria Magdalena
Fogliatto, Gianpaolo
Mongelli, Nicola
Veronesi, Marina

10 <120> Espectroscopia RMN de flúor para cribado bioquímico.
<130> 17789 (PC28074A)

15 <140> 10/888,378
<141> 2004-07-09

20 <160> 2
<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sustrato marcado con CF₃

35 <400> 1
Ala Arg Lys Arg Glu Arg Ala Tyr Ser Phe Gly His His Ala
1 5 10

40 <210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sustrato marcado con CF₃

50 <400> 2
Ala Arg Lys Arg Glu Arg Ala Phe Ser Phe Gly His His Ala
1 5 10

55

60

65