

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 972 584**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/557 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2017 PCT/GB2017/052456**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018 WO18033753**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017 E 17758261 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3500858**

(54) Título: **Ensayos**

(30) Prioridad:

18.08.2016 GB 201614152

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.06.2024

(73) Titular/es:

**IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
Level 1 Faculty Building, C/O Imperial College,
Exhibition Road
London SW7 2AZ, GB**

(72) Inventor/es:

**MANN, DAVID JULIAN;
CRAVEN, GREGORY BENEDICT;
MATTHIES, STEFAN y
ARMSTRONG, ALAN**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 972 584 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

Ensayos

La presente invención se refiere a un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre una molécula diana y un candidato a ligando, a ligandos de interés identificados según este procedimiento y a fármacos desarrollados a partir de dichos ligandos. La presente invención también se refiere a un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre un tiol y una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol.

Antecedentes

Los nuevos fármacos son el producto de un largo proceso de desarrollo, cuyo primer paso suele ser el cribado de bancos de candidatos a ligandos que se unen, de forma reversible o irreversible, a una molécula diana. En el pasado, se cribaban enormes bancos de compuestos frente a una molécula diana utilizando procedimientos de cribado de alto rendimiento ("high-throughput screening", HTS) con la esperanza de que surgieran uno o varios prototipos moleculares exitosas.

En los últimos años, un enfoque basado en fragmentos para el descubrimiento de fármacos ("fragment-based approach to drug discovery", FBDD) ha surgido como un enfoque alternativo a la identificación tradicional de prototipos moleculares mediante HTS. A diferencia del HTS, el FBDD identifica compuestos más pequeños, "fragmentos", que se unen a diferentes partes de una diana biológica.

Debido al pequeño número de interacciones realizadas con la molécula diana, muchos fragmentos tienen afinidades intrínsecas débiles por sus dianas. Las interacciones débiles entre un fragmento y su molécula diana pueden ser difíciles de detectar. Además, los cribados pueden complicarse por la necesidad de aplicar fragmentos en altas concentraciones, lo que conlleva problemas de solubilidad, agregación de compuestos, desnaturalización de proteínas y unión de ligandos en múltiples sitios.

Estos problemas se han superado mediante técnicas de anclaje ("tethering"), en las que fragmentos modificados para incluir grupos funcionales electrófilos forman enlaces covalentes con grupos nucleófilos en la superficie de la molécula diana. Dado que el enlace covalente se forma en un lugar predeterminado de la molécula diana, por ejemplo, una cisteína nativa o no nativa, la estequiometría y el lugar de unión son conocidos para los ligandos que se identifican mediante este procedimiento. La formación del enlace covalente entre la molécula diana y el candidato a ligando amplifica la afinidad del fragmento por la molécula diana, lo que permite la detección a concentraciones más bajas.

Inicialmente, las técnicas de anclaje se centraban en la formación de enlaces covalentes reversibles^{1,2,3}. Se produce una distribución de conjugados de molécula diana-ligando en la que el conjugado más estable termodinámicamente domina la mezcla. En los últimos años se han desarrollado técnicas de anclaje que implican la formación de enlaces covalentes irreversibles^{4,5}, utilizando grupos funcionales, tales como vinil sulfonamidas, acrilamidas y aminometil acrilatos de metilo. Con el anclaje irreversible, la mezcla resultante de conjugado de molécula-ligando está dominada por el candidato a ligando que reacciona más rápidamente con la molécula diana.

Para las técnicas de anclaje reversible e irreversible, se incubaron mezclas de fragmentos, normalmente entre 5 y 10, con la molécula diana, y el conjugado que dominaba la mezcla representaba el prototipo molecular más prometedor. Normalmente, los conjugados se identificaban mediante espectrometría de masas ("mass spectrometry", MS) de proteínas intactas donde, debido a la heterogeneidad de la mezcla de reacción, la cuantificación puede resultar difícil. En el caso del anclaje irreversible, la reactividad intrínseca del fragmento puede influir en la velocidad de formación del conjugado, de modo que el conjugado dominante no es necesariamente el prototipo molecular más prometedor.

Por lo tanto, los candidatos a ligando de una agrupación de cribado concreta deben presentar reactividades intrínsecas muy similares, así como pesos moleculares suficientemente diferentes para facilitar una identificación inequívoca de los aciertos. La predeterminación de la reactividad intrínseca de los fragmentos con un tiol modelo, tal como el glutatión, suele basarse en la espectrometría de masas o en la resonancia magnética nuclear (RMN) realizadas en candidatos individuales, lo que se traduce en un bajo rendimiento. Para evitar esta determinación de la reactividad, los candidatos tendrían que seleccionarse dentro de una región similar del espacio químico, de forma que su reactividad intrínseca sea similar. Esto reduce la diversidad de los tipos de candidatos a ligando que pueden cribarse. Además, el análisis del anclaje mediante MS requiere mediciones secuenciales de agrupaciones de fragmentos, lo que reduce significativamente el rendimiento.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de proporcionar un procedimiento de alto rendimiento para el cribado individual de candidatos a ligando frente a una molécula diana que proporcione datos cuantitativos que permitan una comparación directa entre diferentes candidatos a ligando, tras la normalización de la reactividad intrínseca frente a un modelo.

Nonoo, R.H., "Kinetic Template-Guided Tethering of Fragments", tesis doctoral, mayo de 2013 (05-2013), páginas 1-313, describe la incubación de la timidilato sintasa con una mezcla de acrilamidas ligadas a β-alanina tanto positivas como negativas, lo que conduce a la modificación de la proteína con ambos ligandos a lo largo del tiempo. Se tomaron partes alícuotas de la reacción principal para el análisis por espectrometría de masas a distintos intervalos de tiempo.

La formación de aductos de proteína-acrilamida en función del tiempo, normalizada con respecto a la proteína total, se representó gráficamente.

Erlanson, D. et al., "Tethering: Fragment-based drug discovery", Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, vol. 33, 2004, págs. 199-223, describen procedimientos de descubrimiento de fármacos basados en fragmentos que utilizan el anclaje, que comprenden la reacción de una proteína diana que comprende un residuo de cisteína relativamente expuesto en la superficie con un banco de fragmentos que contienen disulfuro, de manera que la cisteína forma un disulfuro con cada uno de los fragmentos.

Sumario de la invención

La presente invención resuelve los problemas descritos anteriormente proporcionando los siguientes procedimientos:

- 10 1. Un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre una molécula diana y un candidato a ligando que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés, en el que el grupo tiol está cerca del sitio de unión de interés cuando está lo suficientemente cerca del sitio de unión de interés para permitir la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol y un grupo funcional en el candidato a ligando, cuando el candidato a ligando se une al sitio de unión de interés;
 - b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
 - c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;
 - d) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
 - e) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma; y
 - f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando.
- 20 2. Un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre un tiol y una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto un tiol con una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol para formar un producto de reacción en una mezcla de reacción;
 - b) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
 - c) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma; y
 - d) calcular la velocidad de reacción entre el tiol y la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol.
- 30 3. Un procedimiento de medición de la constante de disociación entre una molécula diana y un candidato a ligando que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés;
 - b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
 - c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;

- d) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
 - e) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma;
 - f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando;
 - g) repetir las etapas a) a f) con múltiples concentraciones diferentes del candidato a ligando; y
 - h) calcular la constante de disociación entre la molécula diana y el candidato a ligando.

10 Figuras

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los dibujos no limitantes adjuntos, en los que:

La figura 1 es una representación pictográfica de la formación de un conjugado de molécula diana-ligando. En la captura con molde, el candidato a ligando se une de forma no covalente al sitio de unión de interés en la molécula diana, y a continuación se forma un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol (SH) de la molécula diana y el grupo funcional (o "grupo de captura") del candidato a ligando. En la captura sin molde, se forma un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando sin ninguna unión no covalente precedente del candidato a ligando al sitio de unión de interés.

La figura 2(a) ilustra la formación de un modelo de conjugado de tiol-ligando, en concreto un conjugado de glutatión-ligando (arriba) y la formación de un conjugado de molécula diana-ligando, en concreto un conjugado de proteína-ligando (abajo), en el que los candidatos a ligando comprenden un grupo funcional acrilamida.

La figura 2(b) es un ejemplo de un gráfico de la frecuencia de fragmentos frente al aumento de la velocidad ($k_{\text{diana}}/k_{\text{modelo}}$). La línea de puntos vertical representa el nivel de umbral elegido para el aumento de la velocidad. En la mayoría de los casos, los fragmentos que se encuentran a la izquierda de la línea (por debajo del nivel umbral elegido) representan fragmentos con reactividad sin molde. Del mismo modo, en la mayoría de los casos, los fragmentos que se encuentran a la derecha de la línea (por encima del nivel umbral elegido) representan fragmentos con reactividad con molde que tienen una constante de velocidad significativamente aumentada con la molécula diana en relación con el tiol modelo y se clasifican como "aciertos".

30 La figura 3 es una ilustración de las etapas de una realización del procedimiento según el primer aspecto de la presente invención.

La figura 4(a) es un ejemplo de un gráfico de la fluorescencia en función del tiempo para un determinado candidato a ligando. Las constantes de velocidad se obtienen aplicando un decaimiento exponencial de primer orden a los puntos de datos.

35 La figura 4(b) es un ejemplo de un gráfico de $\ln(\text{fluorescencia})$ en función del tiempo para un candidato a ligando determinado. Las constantes de velocidad se obtienen aplicando un ajuste lineal a los puntos de datos.

La figura 5 muestra una distribución normalizada de la velocidad creada en el ejemplo 1, mostrando el aumento de la velocidad (K_{CdK}/K_{GSH}) para cada uno de los 120 candidatos a ligando ensayados. La línea horizontal de puntos representa el nivel umbral elegido para el aumento de la velocidad, por encima del cual los candidatos a ligando se clasifican como "aciertos". Se marcan dos ejemplos de candidatos a ligando: un compuesto negativo (EL-1007) y un fragmento de acierto (EL-1071).

La figura 6(a) es un gráfico de la fluorescencia relativa en función del tiempo para el candidato a ligando EL-1007 con el modelo de tiol glutatión (GSH). Estos datos se utilizaron para calcular una constante de velocidad (k_{GSH}) de 0,025.

La figura 6(b) es un gráfico de la fluorescencia relativa en función del tiempo para el candidato a ligando EL-1007 con la molécula diana, la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2). Estos datos se utilizaron para calcular una constante de velocidad (k_{Cdk2}) de 0,035. Dividiendo k_{Cdk2} por k_{GSH} se obtiene un aumento de la velocidad de 1,4.

La figura 7(a) es un gráfico de la fluorescencia relativa en función del tiempo para el candidato a ligando EL-1071 con el modelo de tiol glutatión (GSH). Estos datos se utilizaron para calcular una constante de velocidad (k_{GSH}) de 0,051.

La figura 7(b) es un gráfico de la fluorescencia relativa en función del tiempo para el candidato a ligando EL-1071 con la molécula diana, la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2). Estos datos se utilizaron para calcular una constante de velocidad (k_{Cdk2}) de 0,433. Dividiendo k_{Cdk2} por k_{GSH} se obtiene un aumento de la velocidad de 8,5.

- 5 La figura 8 ilustra el mecanismo de dos etapas para la formación de un conjugado de molécula diana-ligando.
- La figura 9 es un gráfico de la constante de velocidad observada frente a la concentración del candidato a ligando de acierto (CA37) identificado frente a Cdk2(C177A, F80C).
- 10 La figura 10(a) es un espectro de masas por espectrometría de masas de proteínas intactas que valida la monomodificación completa de Cdk2(F80C, C177A) por EL1071 (en esta figura, Cdk2(AS) = Cdk2(F80C, C177A), 1 = EL1071)
- La figura 10(b) es un espectro de masas por espectrometría de masas en tandem que confirma que el lugar de la modificación es F80C, obtenido digiriendo el complejo 1-Cdk2(AS) con tripsina y secuenciando los péptidos resultantes.
- 15 La figura 10(c) es un gráfico que compara la actividad cinasa de Cdk2(WT), Cdk2(AS) y 1-Cdk2(AS).

La figura 11 es una ilustración de la estructura del complejo 1-Cdk2(AS) cristalizado determinada por cristalográfica de rayos X, que confirma que el ligando se une al residuo de cisteína en F80C

Descripción detallada

Un primer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre una molécula diana y un candidato a ligando que comprende las etapas de:

- 20 a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés, en el que el grupo tiol está cerca del sitio de unión de interés cuando está lo suficientemente cerca del sitio de unión de interés para permitir la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol y un grupo funcional en el candidato a ligando, cuando el candidato a ligando se une al sitio de unión de interés;
- 25 b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
- c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;
- 30 d) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- e) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma; y
- 35 f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando.

Este procedimiento permite el cálculo de la velocidad de reacción entre una molécula diana y un candidato a ligando para cada candidato a ligando individual cribado, proporcionando información cuantitativa que permite una comparación directa entre diferentes candidatos a ligando.

40 La velocidad de reacción calculada puede utilizarse para obtener o aproximar una constante de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando.

La molécula diana comprende un sitio de unión de interés, a saber, un sitio al que se une un ligando específico. Normalmente, las interacciones moleculares entre el ligando y el sitio de unión de interés en la molécula diana son no covalentes e incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones electrostáticas.

La molécula diana también comprende un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés.

45 Un tiol es un compuesto organoazufrado que contiene un grupo sulfhidrilo unido a carbono (-C-SH o R-SH) (en el que R puede representar un resto orgánico o biomolécula) que existe predominantemente como anión tiolato a pH fisiológico y en la mayoría de las condiciones de cribado.

De acuerdo con la presente invención, se considera que el grupo tiol está cerca del sitio de unión de interés si está lo suficientemente cerca del sitio de unión de interés para permitir la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol

y un grupo funcional en el candidato a ligando, cuando el candidato a ligando se une al sitio de unión de interés. Preferentemente, si el candidato a ligando se une al sitio de unión de interés, concomitantemente lleva al grupo funcional en el candidato a ligando hasta una proximidad suficientemente cercana con el grupo tiol para que se produzca la captura covalente del candidato a ligando.

- 5 La formación de este enlace covalente tras la unión del candidato a ligando al sitio de unión de interés en la molécula diana se denomina "captura con molde". La formación de este enlace covalente en ausencia de la unión del candidato a ligando al sitio de unión de interés en la molécula diana se denomina "captura sin molde". La captura sin molde suele producirse cuando el candidato a ligando no tiene afinidad de unión, o es insignificante, por el sitio de unión de interés. La captura con molde se produce cuando el candidato a ligando tiene afinidad por la molécula diana, y da lugar a un aumento de la velocidad de reacción entre el candidato a ligando y la molécula diana.

10 El grupo tiol puede estar a 10 Å o menos, por ejemplo, entre 5 y 10 Å, del sitio de unión de interés. El grupo tiol puede estar más alejado del sitio de unión de interés, por ejemplo, cuando se incluye un conector entre el candidato a ligando y el grupo funcional.

15 El grupo tiol en cuestión debe ser accesible para la formación de enlaces covalentes con el grupo funcional una vez que el candidato a ligando se ha unido a la molécula diana. Preferentemente, el grupo tiol está relativamente expuesto en superficie.

20 El grupo tiol puede ser endógeno a la molécula diana. Como alternativa, la molécula diana puede haber sido modificada para incluir el grupo tiol. Los expertos en la materia estarán familiarizados con diversas técnicas recombinantes, químicas, sintéticas o de otro tipo que pueden emplearse habitualmente para modificar una molécula diana de modo que posea un grupo tiol en un sitio de unión de interés o cerca del mismo. Dichas técnicas incluyen la mutagénesis dirigida al sitio, la mutagénesis en casete y/o la incorporación de aminoácidos no naturales en proteínas utilizando un código genético ampliado.

25 El grupo tiol es preferentemente suministrado por un residuo de aminoácido que contiene tiol, preferentemente un residuo de cisteína. Preferentemente, el grupo tiol es suministrado por un residuo de cisteína expuesto en la superficie. Tal como se ha comentado anteriormente con respecto al grupo tiol, un residuo de cisteína que suministra un grupo tiol puede ser endógeno a la molécula diana o la molécula diana puede haber sido modificada para incluir el residuo de cisteína. Cuando el residuo de cisteína es endógeno, puede ser catalítico o no catalítico.

30 La molécula diana, cuando se obtiene inicialmente o tras su modificación, puede comprender más de un grupo tiol libre accesible para la formación de enlaces covalentes con el grupo funcional del candidato a ligando. Por ejemplo, la molécula diana puede comprender más de un residuo de cisteína expuesto en la superficie. Preferentemente, la molécula diana comprende sólo un número limitado de grupos tiol libres que pueden actuar potencialmente como sitios de unión covalente para un candidato a ligando. La molécula diana puede comprender no más de 5 grupos tiol libres, no más de 4 grupos tiol libres, no más de 3 grupos tiol libres, no más de 2 grupos tiol libres, o sólo 1 grupo tiol libre. La molécula diana puede obtenerse o seleccionarse inicialmente de forma que ya posea el número deseado de grupos tiol libres o puede modificarse para que posea el número deseado de grupos tiol libres. La molécula diana, por supuesto, puede incluir cualquier número de grupos tiol internos que no sean accesibles para la formación de enlaces covalentes con el grupo funcional de la molécula diana.

35 La molécula diana suele comprender una molécula de interés, por ejemplo, una diana potencial afectada por un inhibidor reversible o irreversible. La molécula diana puede ser una diana biológica en el contexto del descubrimiento de fármacos o de la investigación bioquímica.

40 Preferentemente, la molécula diana se selecciona del grupo formado por una proteína o un derivado de la misma, por ejemplo, un polipéptido, una nucleoproteína, un glucopéptido o una fosfoproteína.

45 La molécula diana puede seleccionarse del grupo que consiste en una enzima, una hormona, un factor de transcripción, un receptor, un ligando para un receptor, un factor de crecimiento, una inmunoglobulina, un receptor de esteroides, una proteína nuclear, un componente de transducción de señales, un regulador enzimático alostérico o similares.

50 Algunos ejemplos de enzimas incluyen las enzimas cinasa, fosfatasa, GTPasa, proteasa, ligasa, caspasa, glucosiltransferasa, glucósido hidrolasa, lípido transferasa y reductasa.

Algunos ejemplos de moléculas diana incluyen diversos mutantes de la cinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2), cada uno de los cuales posee un único residuo de cisteína expuesto en la superficie.

55 En el contexto de la presente invención, un "candidato a ligando" es un compuesto que comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con el grupo tiol de la molécula diana. Un candidato a ligando puede tener o no afinidad de unión intrínseca por la molécula diana. Una vez que se determina que un candidato a ligando también tiene afinidad de unión intrínseca por la molécula diana, es decir, que puede unirse al sitio de unión de interés en la molécula diana, el candidato a ligando puede denominarse "ligando".

El candidato a ligando puede comprender una molécula pequeña, que se clasifica como una molécula con un peso molecular de 900 Da o menos. Las moléculas pequeñas preferidas tienen un peso inferior a 500 Da. Como alternativa, el candidato a ligando puede comprender un ligando basado en biopolímeros o cualquier combinación de moléculas sintéticas o endógenas.

- 5 El candidato a ligando también puede comprender un fragmento de una molécula. Los fragmentos tienen muchas más posibilidades de presentar interacciones de "alta calidad" con un sitio de unión definido.

Los fragmentos que tienen afinidad por la molécula diana, aunque sea débil, pueden ampliarse o combinarse para producir un prototipo molecular con mayor afinidad.

- 10 Preferentemente, el fragmento tiene un peso molecular relativamente bajo, preferentemente un peso molecular de 300 Da o menos, 250 Da o menos, 200 Da o menos, 150 Da o menos o 100 Da o menos.

Preferentemente, el fragmento sigue la "regla de tres" (el peso molecular de un fragmento es <300 Da, el cLogP es ≤3, el número de donantes de enlaces de hidrógeno es ≤3 y el número de aceptores de enlaces de hidrógeno es ≤3).

Preferentemente, el fragmento comprende al menos una funcionalidad seleccionada del grupo que consiste en restos alifáticos, restos que contienen heteroátomos, restos cíclicos, aromáticos y heteroaromáticos.

- 15 15 El uso de una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés permite el descubrimiento dirigido al sitio de fragmentos de bajo peso molecular que se unen débilmente a superficies definidas de proteínas.

Los candidatos a ligando de la presente invención pueden comprender moléculas similares a fármacos o fragmentos similares a fármacos. Dichas moléculas y fragmentos son bien conocidos en la técnica y tienen propiedades similares a los fármacos, tales como bajo peso molecular y propiedades fisicoquímicas y farmacológicas deseables, así como subestructuras con propiedades químicas o farmacológicas conocidas.

20 Preferentemente, el candidato a ligando se selecciona del grupo que comprende moléculas orgánicas u otras moléculas de unión específicas de secuencia, tales como péptidos, peptidomiméticos, carbohidratos complejos u otros oligómeros de unidades individuales o monómeros.

- 25 25 Tal como se ha mencionado anteriormente, el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con el grupo tiol de la molécula diana. Dicho grupo funcional también puede denominarse "grupo de captura" u "ojiva".

Preferentemente, el grupo funcional es un electrófilo.

- 30 30 Los electrófilos adecuados incluyen acrilamida, acrilato, cetona α,β-insaturada, vinilsulfonamidas, vinilsulfona, vinilsulfonato, derivados de carbonilo α-halogenados, tales como α-clorocetonas y α-cloroacetamidas, epóxidos, derivados de nitrilo (por ejemplo, A-aminonitrilos), sustratos de S_NAr (por ejemplo, anillos aromáticos con grupos que retiran electrones) y derivados sustituidos de los mismos.

35 35 Los electrófilos preferidos incluyen aceptores de Michael, a saber, compuestos de nitrilo o α,β-carbonilo insaturado que experimentan una reacción de adición 1,4 con nucleófilos de carbono estabilizados por resonancia. Entre los aceptores de Michael especialmente preferidos se encuentran las acrilamidas, los acrilatos de metilo y las vinilsulfonamidas.

- 40 40 Los expertos en la materia estarán familiarizados con diversas técnicas que pueden emplearse de la forma habitual para unir o anclar un grupo funcional, tal como acrilamida, a una molécula o a un fragmento de la misma. Por ejemplo, una técnica adecuada para unir un grupo funcional a una molécula diana de la presente invención puede encontrarse en Allen, C. E. et al.⁶.

45 45 El procedimiento del primer aspecto de la presente invención incluye una etapa de poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, dando lugar a la formación de un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando. Este conjugado de molécula diana-ligando puede haberse formado como resultado de una captura con o sin molde (es decir, con o sin la unión del candidato a ligando al sitio de unión de interés en la molécula diana). El término "ligando" se utiliza en este contexto únicamente en aras de la brevedad. También podría utilizarse el término "conjugado de molécula diana-candidato a ligando".

La molécula diana puede ponerse en contacto con un candidato a ligando en cualquier condición de reacción adecuada, que será conocida por un experto en la materia.

- 50 50 La reacción puede tener lugar dentro de cualquier recipiente adecuado, por ejemplo, un pocillo de una placa de reacción.

La molécula diana puede añadirse al recipiente antes de añadir el candidato a ligando. Como alternativa, el candidato a ligando puede añadirse al recipiente antes de la adición de la molécula diana. En ambos casos, el candidato a ligando y la molécula diana se combinan para crear la mezcla de reacción.

5 Puede utilizarse cualquier cantidad adecuada de molécula diana. La cantidad de molécula diana añadida puede corresponder a 1 a 10 µM de la molécula diana, por ejemplo, aproximadamente 5 µM de la molécula diana.

La molécula diana puede estar en un tampón adecuado, por ejemplo, un tampón fosfato desgasificado (pH 8). Cuando se utiliza un tampón, la cantidad combinada de tampón y molécula diana utilizada puede estar en el intervalo de 1 pl a 1 µl, por ejemplo, de 10 pl a 300 µl, de 10 pl a 100 nl, de 10 pl a 100 pl, de 100 pl a 100 nl, de 10 µl a 300 µl, de 100 µl a 250 µl, de 150 µl a 200 µl, o aproximadamente 150 µl.

10 Preferentemente, la molécula diana y el candidato a ligando se ponen en contacto en presencia de un agente reductor. Puede utilizarse cualquier agente reductor adecuado, por ejemplo, tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o ditiotreitol (DDT).

El agente reductor puede solubilizarse o inmovilizarse en función de la propiedad biofísica que se esté evaluando. Preferentemente, cuando la propiedad biofísica que se evalúa es la fluorescencia, el agente reductor está inmovilizado.

15 El uso de un agente reductor inmovilizado permite la miniaturización del ensayo, de modo que la oxidación del tiol no oculta la verdadera señal. El agente reductor puede estar unido a agarosa.

Puede utilizarse cualquier cantidad adecuada de agente reductor. Por ejemplo, puede utilizarse un 2 % v/v de agente inmovilizado, tal como en los ejemplos siguientes.

20 Cuando se utiliza un agente reductor, la molécula diana puede incubarse con el agente reductor antes de la adición del candidato a ligando, para garantizar que el tiol de la molécula diana se reduce completamente. Así, cualquier reducción en la señal de tiol durante la reacción de cuantificación de tiol puede atribuirse a la reacción con el candidato a ligando. Por ejemplo, la molécula diana puede incubarse con el agente reductor a 4 °C durante 1 hora, tal como en los ejemplos siguientes.

25 El candidato a ligando puede añadirse en un disolvente adecuado, tal como dimetilsulfóxido (DMSO). El candidato a ligando puede añadirse en cualquier cantidad adecuada. El candidato a ligando puede proporcionarse en una cantidad suficiente para producir una concentración final de 100 a 1000 µM del candidato a ligando, por ejemplo, aproximadamente 500 µM del candidato a ligando.

30 Preferentemente, el candidato a ligando se añade en una concentración mucho mayor que la molécula diana. Preferentemente, el candidato a ligando se proporciona en exceso, más preferentemente en un exceso en más de 10 veces.

35 30 El procedimiento según el primer aspecto de la presente invención implica medir la velocidad de reacción entre la molécula diana y el ligando, en otras palabras, la velocidad de formación del conjugado de molécula diana-ligando, utilizando un ensayo novedoso. Este ensayo podría denominarse "ensayo cinético de consumo de tiol", ya que se basa en la medición de la velocidad de consumo del grupo tiol en la molécula diana para indicar la velocidad de formación del conjugado de molécula diana-ligando. Tal como se utiliza en el presente documento, el consumo del grupo tiol se refiere a la modificación química del grupo tiol tras la formación del enlace covalente irreversible con el grupo funcional en el candidato a ligando.

40 40 La velocidad de consumo del grupo tiol en la molécula diana se infiere midiendo la cantidad relativa de grupos tiol "libres" (es decir, que no han reaccionado) en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma en un único punto temporal o en una pluralidad de puntos temporales durante la reacción, utilizando un ensayo de inactivación comparado con un control. Cualquier disminución en la cantidad relativa de grupos tiol libres a lo largo del tiempo se considera resultado del consumo de los grupos tiol libres en la formación del enlace covalente irreversible entre la molécula diana y el candidato a ligando.

45 45 La cantidad relativa de grupos tiol libres en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma en un momento determinado se mide utilizando un reactivo de cuantificación de tiol capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción, o a una parte alícuota de la misma, una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico. La propiedad biofísica proporciona una indicación de la cantidad relativa de conjugado de cuantificación en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma.

50 50 Si se desea, la concentración de conjugado de cuantificación en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma puede determinarse a partir de la medición de la propiedad biofísica, utilizando procedimientos bien conocidos por el experto que emplean un procedimiento de calibración apropiado y que dependen del reactivo de cuantificación de tiol utilizado.

La propiedad biofísica puede ser, por ejemplo, la fluorescencia, la polarización de la fluorescencia, la anisotropía de la fluorescencia o la absorbancia de la luz visible a una determinada longitud de onda.

El propio conjugado de cuantificación puede tener la propiedad biofísica evaluable. Como alternativa, un derivado del conjugado de cuantificación puede tener la propiedad biofísica evaluable, o la producción del conjugado de cuantificación puede dar lugar a la producción de un compuesto con la propiedad biofísica evaluable.

Preferentemente, el reactivo de cuantificación de tiol es un tinte reactivo a tioles.

5 Se han desarrollado muchos reactivos y procedimientos para el ensayo cuantitativo de tioles. Los reactivos que reaccionan frente al tiol incluyen yodoacetamidas, maleimidas, haluros bencílicos y bromometilcetonas, que reaccionan por S-alquilación de los tioles para generar productos de tioéter estables. Los reactivos arilantes, tales como los haluros de NBD, reaccionan con los tioles mediante una sustitución similar del haluro aromático por el nucleófilo. Los tintes a base de disulfuro y tiosulfato permiten la modificación reversible del tiol para su cuantificación.

10 Se prefieren las maleimidas o derivados de maleimida, por ejemplo, N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-il)maleimida (DPCM), fluoresceín-5-maleimida y, en especial, 7-diethylamino-3-(4'-maleimidofenil)-4-metilcumarina (CPM). Estos reactivos de cuantificación de tiol no son apreciablemente fluorescentes hasta después de la conjugación con los tioles. El tiol se añade a través del doble enlace de la maleimida para producir un tioéter altamente fluorescente.

15 También puede utilizarse el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditriobis-(2-nitrobenzoico) o DTNB). Los tioles reaccionan con este compuesto, rompiendo el enlace disulfuro para obtener 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^-), que se ioniza al dianión TNB^{2-} en agua a pH neutro y alcalino. Este ion TNB^{2-} tiene un color amarillo que absorbe la luz visible a 412 nm.

Toda la mezcla de reacción, una proporción sustancial de la misma o sólo una parte alícuota de la misma puede ponerse en contacto con un reactivo de cuantificación de tiol en la etapa d) del procedimiento según el primer aspecto.

20 Si se utilizan partes alícuotas, éstas pueden comprender cualquier volumen adecuado. Los volúmenes de las partes alícuotas pueden estar en el intervalo de μl a μl , por ejemplo, de 1 a 10 μl , de 1 a 8 μl , de 1 a 5 μl o aproximadamente 3 μl . Generalmente, cada parte alícuota comprende del 1 al 5 % del volumen total de reacción.

25 Preferentemente, la mezcla de reacción o una proporción sustancial de la misma se retira del recipiente en el que la molécula diana se pone en contacto con el candidato a ligando, o se retiran partes alícuotas de la mezcla de reacción, de manera que se evite o minimice el riesgo de transferir cualquier agente reductor inmovilizado a la placa de inactivación.

Preferentemente, cada parte alícuota se transfiere a un pocillo separado de una placa de inactivación.

Preferentemente, cada placa de inactivación contiene un exceso del reactivo de cuantificación de tiol. El reactivo de cuantificación de tiol puede estar en una solución tampón, por ejemplo, una solución tampón fosfato desgasificada (pH 7,5).

30 Preferentemente, la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma se incuba en la placa de inactivación durante un periodo de tiempo adecuado antes de medir la propiedad biofísica. La mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma puede incubarse durante 0,1 a 2 horas, por ejemplo, aproximadamente 1 hora. La incubación puede realizarse a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo, a temperatura ambiente.

35 La propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma puede medirse utilizando cualquier procedimiento biofísico adecuado. Por ejemplo, la fluorescencia o la polarización de fluorescencia pueden medirse utilizando un fluorómetro, tal como un lector de placas EnVision. La absorbancia de la luz a una determinada longitud de onda puede medirse con un espectrofotómetro.

40 La concentración de conjugado de cuantificación en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma refleja la concentración de grupos tiol "libres" en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma en un momento concreto, que, a su vez, refleja la concentración de molécula diana sin reaccionar (es decir, moléculas diana que no han reaccionado con el candidato a ligando). A partir de ahí, puede deducirse la concentración de la molécula diana que ha reaccionado (es decir, el conjugado de molécula diana-ligando) en ese momento concreto y, por tanto, la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando.

45 Tal como se utilizan en el presente documento, las referencias a un "momento concreto" o "punto temporal concreto" en relación con la concentración de grupos tiol "libres" en la mezcla de reacción o en una parte alícuota de la misma, con la concentración de molécula diana sin reaccionar y, por tanto, con la concentración de molécula diana que ha reaccionado (es decir, conjugado de molécula diana y ligando) se refieren al momento en el que la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma se pone en contacto con el reactivo de cuantificación de tiol. Tras el contacto de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma con el reactivo de cuantificación de tiol, las moléculas diana seguirán reaccionando con los candidatos a ligando durante cualquier periodo de incubación. Sin embargo, el reactivo de cuantificación de tiol se selecciona preferentemente para que reaccione mucho más rápidamente con las moléculas diana que con el candidato a ligando, de modo que, en una primera aproximación, cualquier reacción entre las moléculas diana y los candidatos a ligando tras la adición del reactivo de cuantificación de tiol sea mínima.

La velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando puede calcularse basándose en una única medición de la propiedad biofísica o basándose en múltiples mediciones, cada una de ellas tomada tras la inactivación en un punto temporal diferente durante el desarrollo de la reacción.

5 Cuando se utilizan mediciones múltiples, la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma se pone en contacto con el reactivo de cuantificación de tiol en diversos puntos temporales diferentes medidos desde el punto en el que comienza la reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando. El experto en la materia puede seleccionar un número adecuado de puntos temporales diferentes, de intervalos adecuados entre estos puntos temporales y una duración adecuada a lo largo de la cual se extienden estos puntos temporales. Por ejemplo, estas etapas podrían repetirse en entre 1 y 10 puntos temporales diferentes. Estos puntos temporales podrían extenderse a lo largo de un periodo de tiempo adecuado, en función de la combinación de candidato a ligando y molécula diana utilizada y, en especial, de la reactividad del candidato a ligando. Por ejemplo, los puntos temporales podrían extenderse a lo largo de 300 horas, 250 horas, 200 horas, 150 horas, 100 horas, 50 horas, 20 horas o 10 horas desde el momento en que comienza la reacción. Para mejorar la precisión, pueden repetirse las mediciones.

10 15 Las mediciones de la propiedad biofísica pueden utilizarse entonces para calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando. Preferentemente, las mediciones de la propiedad biofísica se representan gráficamente frente al tiempo. A continuación, se puede aplicar una operación matemática a estos datos; por ejemplo, se puede ajustar un decaimiento exponencial o calcular la derivada de primer orden de una función de ajuste. A continuación, puede cuantificarse un parámetro, tal como la constante de velocidad, la semivida o el gradiente de la pendiente en un punto temporal definido. Este parámetro puede utilizarse para comparar la velocidad de reacción entre diferentes candidatos a ligando.

20 Preferentemente, las mediciones de la propiedad biofísica se utilizan para calcular una constante de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando. Esto puede hacerse utilizando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, las mediciones de la propiedad biofísica, en primer lugar, pueden representarse gráficamente frente al tiempo. Las constantes de velocidad pueden calcularse ajustando a los datos un decaimiento exponencial de primer orden, tal como se ilustra en la figura 4a). Como alternativa, las constantes de velocidad pueden calcularse realizando un ajuste lineal a un gráfico del logaritmo de la propiedad biofísica frente al tiempo, tal como se ilustra en 4b).

25 30 Tal como se mencionó anteriormente, la etapa de inactivación en cada punto temporal puede implicar a toda la mezcla de reacción, a una proporción sustancial de la misma o sólo a una parte alícuota de la misma. Cuando se inactiva toda la mezcla de reacción o una proporción sustancial de la misma, se repiten las etapas de proporcionar una molécula diana, poner en contacto la molécula diana con el candidato a ligando, formar el conjugado de molécula diana-ligando, poner en contacto la mezcla de reacción con el reactivo de cuantificación de tiol y medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción (es decir, las etapas a) a e)). En cada repetición, la mezcla de reacción se pone en contacto con el reactivo de cuantificación de tiol en un punto temporal diferente durante la reacción, es decir, una cantidad de tiempo diferente tras el contacto de la molécula diana con el candidato a ligando. El reactivo de cuantificación de tiol puede añadirse directamente a la mezcla de reacción, por ejemplo, en el recipiente en el que se puso en contacto la molécula diana con el candidato a ligando. Como alternativa, toda la mezcla de reacción (o prácticamente toda la mezcla de reacción) puede transferirse a una placa de inactivación que contenga el reactivo de cuantificación de tiol.

35 40 Cuando se enfriá toda la mezcla de reacción o una proporción sustancial de la misma, generalmente se requiere un volumen mucho menor de la mezcla de reacción en la etapa b) que cuando se enfrián partes alícuotas de la mezcla de reacción, ya que se formará una nueva mezcla de reacción para cada repetición del procedimiento.

45 Si sólo se transfiere una parte alícuota de la mezcla de reacción a la placa de inactivación, generalmente se requiere un volumen mayor de la mezcla de reacción en la etapa b), ya que se retirará una parte alícuota de esta mezcla de reacción para cada repetición del procedimiento. Además, sólo es necesario repetir las etapas d) y e). En cada repetición, la parte alícuota de la mezcla de reacción se pone en contacto con el reactivo de cuantificación de tiol en un punto temporal diferente durante la reacción, es decir, una cantidad de tiempo diferente tras el contacto de la molécula diana con el candidato a ligando.

Una realización preferida del procedimiento según el primer aspecto de la invención comprende las etapas de:

- 50 a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés, en el que el grupo tiol está cerca del sitio de unión de interés cuando está lo suficientemente cerca del sitio de unión de interés para permitir la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol y un grupo funcional en el candidato a ligando, cuando el candidato a ligando se une al sitio de unión de interés;
- 55 b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
- c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;

- d) transferir una parte alícuota de la mezcla de reacción a una placa de inactivación que comprende un reactivo de cuantificación de tiol en un primer momento de la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la parte alícuota una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- 5 e) medir la propiedad biofísica de la parte alícuota; y
- f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el ligando;
- en el que las etapas d) y e) se repiten una o más veces, durante las cuales la etapa d) se lleva a cabo en uno o más momentos diferentes durante la reacción.
- 10 Las mediciones de la propiedad biofísica pueden normalizarse con respecto a un control, por ejemplo, un control de sólo molécula diana.
- 15 Cuando sólo se toma una única medida de la propiedad biofísica, la etapa de inactivación se produce en un único punto temporal durante el desarrollo de la reacción. Así, las etapas del procedimiento según el primer aspecto se realizan una sola vez para cada candidato a ligando. Esto, por supuesto, no excluye la posibilidad de que este procedimiento pueda repetirse para cualquier candidato a ligando determinado, con la inactivación llevada a cabo en el mismo punto temporal en cada repetición.
- Incluso con una sola medición de la propiedad biofísica, se puede calcular, o al menos aproximar, la velocidad de reacción entre la molécula diana y el ligando.
- 20 Por ejemplo, el cálculo de la conversión de la molécula diana en el conjugado de molécula diana-ligando permite una primera aproximación de la velocidad de reacción. Para permitir el cálculo de la conversión de la molécula diana en el conjugado de molécula diana-ligando a partir de una única medición de la propiedad biofísica, se pueden realizar dos aproximaciones:
- 25 1. el valor de la propiedad biofísica en $T = 0$ (cuando no se ha formado ningún conjugado de molécula diana-ligando) es igual a la propiedad biofísica cuando no se ha introducido ningún candidato a ligando (equivalente a saltarse las etapas b) y c) del procedimiento según el primer aspecto); y
2. el valor de la propiedad biofísica cuando la molécula diana se ha convertido totalmente en conjugado de molécula diana-ligando es: a) igual a la propiedad biofísica cuando no se ha introducido ninguna molécula diana; o b) es igual a cero.
- Una vez que estos dos valores de la propiedad biofísica han sido determinados, los candidatos a ligando pueden ser cribados usando una sola medida de la propiedad biofísica.
- 30 La medición única de la propiedad biofísica puede utilizarse para aproximar una velocidad de reacción para la formación del conjugado de molécula diana-ligando, por ejemplo, relacionando la propiedad biofísica medida en la etapa e) con la conversión de la molécula diana en el conjuntado de molécula diana-candidato a ligando. Específicamente, si se caracteriza una descripción matemática de la reacción, entonces se puede derivar una constante de velocidad para la reacción. Por ejemplo, cuando todas las reacciones se llevan a cabo con una cinética de pseudoprimer orden, se sabe que la reacción seguirá un decaimiento exponencial de una fase.
- Mientras que el uso de múltiples mediciones de la propiedad biofísica tras la inactivación en múltiples puntos temporales diferentes permite un análisis y una comparación más precisos de la velocidad de reacción entre diferentes candidatos a ligando, el uso de una única medición de la propiedad biofísica para cada candidato a ligando representa una técnica de mayor rendimiento que puede ser preferible en determinadas circunstancias.
- 40 El procedimiento según el primer aspecto de la presente invención puede comprender además la etapa de calcular el aumento de la velocidad para el candidato a ligando. Esto puede comprender:
- g) repetir las etapas a) a f) utilizando un tiol modelo en lugar de la molécula diana, para calcular la velocidad de reacción entre el tiol modelo y el candidato a ligando, utilizando el mismo candidato a ligando; y
- h) calcular el aumento de la velocidad del candidato a ligando comparando la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando con la velocidad de reacción entre el tiol modelo y el candidato a ligando.
- 45 La descripción anterior de las condiciones en las que la molécula diana reacciona con el candidato a ligando y el cálculo de la velocidad de reacción, la constante de velocidad, etc. se aplican *mutatis mutandis* a la reacción del tiol modelo con el candidato a ligando.
- 50 El tiol modelo puede comprender cualquier tiol modelo adecuado, por ejemplo, una molécula pequeña que contenga un grupo tiol. El tiol modelo puede comprender un derivado de aminoácido, tal como el glutatión, un péptido o una proteína. El tiol modelo puede comprender una variante de la molécula diana con un grupo tiol en una posición en la

superficie diferente en comparación con la molécula diana. Puede utilizarse más de un tiol modelo, por ejemplo, un pequeño número de variantes de la molécula diana con grupos tiol en diferentes posiciones en la superficie. Cuando se utilizan múltiples tioles modelo, por ejemplo, un pequeño número de variantes de la molécula diana con grupos tiol en diferentes posiciones en la superficie, puede calcularse la velocidad de reacción media de las variantes y utilizarse como velocidad de reacción de control global.

Cuando se calculan las constantes de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando y del conjugado de tiol modelo-ligando, el aumento de la velocidad puede calcularse comparando la constante de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando con la constante de velocidad para la formación del conjugado de tiol modelo-ligando. Por ejemplo, el aumento de la velocidad para el candidato a ligando puede calcularse dividiendo la constante de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando por la constante de velocidad para la formación del conjugado de tiol modelo. El experto también conocerá otros procedimientos adecuados.

El cálculo del aumento de la velocidad para un candidato a ligando determinado tiene en cuenta la reactividad intrínseca del grupo funcional. De este modo, se pueden utilizar diferentes tipos de grupos funcionales y andamiajes más diversos en el mismo cribado.

El aumento de la velocidad para un candidato a ligando puede utilizarse para determinar si el candidato a ligando es de interés, por ejemplo, como punto de partida para el desarrollo de un nuevo fármaco. Este candidato a ligando se denomina "acerto". El procedimiento según el primer aspecto de la presente invención puede comprender además la etapa de: i) determinar si el aumento de la velocidad para el candidato a ligando está por encima de un nivel umbral elegido, en el que un candidato a ligando con un aumento de la velocidad por encima de este nivel umbral se clasifica como ligando de acierto.

Un candidato a ligando se clasifica normalmente como "acierto" si tiene una constante de velocidad significativamente aumentada en comparación con el tiol modelo.

El nivel umbral puede determinarse empíricamente. Debido a que la reactividad intrínseca del residuo de tiol variará en función de la molécula diana, se prefiere que el nivel umbral se base en desviaciones estándar de la media. El nivel umbral puede ser, por ejemplo, dos desviaciones estándar sobre la media o tres desviaciones estándar sobre la media.

El procedimiento según el primer aspecto de la invención puede comprender además la etapa de: j) repetir las etapas a) a f) con uno o más candidatos a ligando adicionales.

Por supuesto, cada uno de la pluralidad de candidatos a ligando puede someterse a las etapas a) a f) simultánea o secuencialmente, en paralelo.

Las etapas g) a i) también pueden repetirse para cada candidato a ligando. Un candidato a ligando puede definirse como un "acierto" de acuerdo con la etapa i) después de que se hayan calculado los aumentos de la velocidad para toda la pluralidad de candidatos a ligando que se están cribando, o un subconjunto de ellos. Esto se debe a que el intervalo de aumento de la velocidad para los candidatos a ligando puede afectar al nivel umbral por encima del cual un candidato a ligando se clasifica como "acierto".

Además, dado que las reacciones entre los candidatos a ligando y la proteína diana obedecen al mecanismo de dos etapas expuesto en la figura 8, la constante de velocidad observada muestra la siguiente dependencia hiperbólica de la concentración del candidato a ligando (en la que $[I]$ = concentración del candidato a ligando, k_{obs} = constante de velocidad observada)

$$k_{obs} = k_2[I]/(K_d + [I])$$

Por lo tanto, el ensayo puede utilizarse para calcular tanto k_2 como K_d determinando experimentalmente k_{obs} en un intervalo adecuado de concentraciones del candidato a ligando. Generalmente, K_d y k_2 se determinarían entonces ajustando una curva hiperbólica a un gráfico de k_{obs} frente a la concentración del candidato a ligando (figura 9).

En consecuencia, las etapas a) a e) del procedimiento según el primer aspecto de la presente invención pueden llevarse a cabo múltiples veces con diferentes concentraciones del candidato a ligando. El procedimiento también puede comprender una etapa adicional de: j) determinar la constante de disociación para el candidato a ligando.

Las constantes K_d y k_2 se pueden utilizar para clasificar los ligandos de acierto independientemente o en combinación con el aumento de la velocidad como se ha analizado anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de medición de la constante de disociación entre una molécula diana y un candidato a ligando que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés;

- b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
- 5 c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;
- d) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- 10 e) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma;
- f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando;
- g) repetir las etapas a) a f) con múltiples concentraciones diferentes del candidato a ligando; y
- h) calcular la constante de disociación entre la molécula diana y el candidato a ligando.

15 Preferentemente, la pluralidad de candidatos a ligando comprende un banco de candidatos a ligando. El procedimiento de la presente invención permite obtener una velocidad de reacción, una constante de velocidad y/o un aumento de la velocidad independientes para cada candidato a ligando del banco.

20 Los expertos en la materia estarán familiarizados con diversas técnicas que pueden emplearse de la forma habitual para crear bancos de moléculas o fragmentos modificados para incluir un grupo funcional capaz de unirse covalentemente al grupo tiol de la molécula diana. El banco de moléculas que se cribarán frente a la molécula diana puede obtenerse de diversas maneras, por ejemplo, a través de fuentes comerciales y no comerciales, sintetizando dichos compuestos mediante la tecnología de síntesis química convencional o la tecnología de síntesis combinatoria. Por ejemplo, una técnica adecuada para crear un banco de moléculas que se cribarán en el procedimiento de la presente invención puede encontrarse en Allen, C. E. et al.⁶.

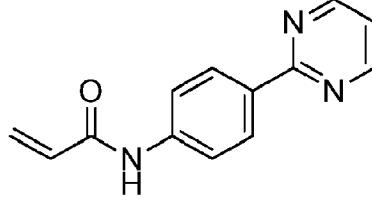
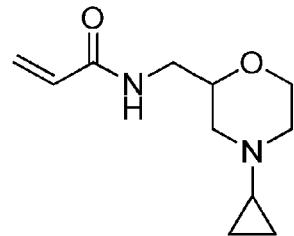
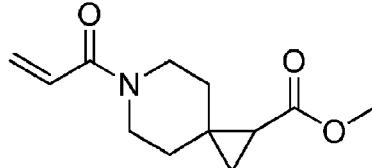
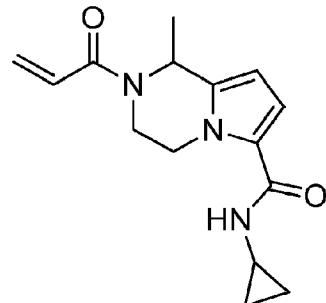
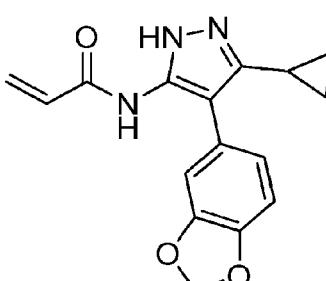
25 El banco comprende preferentemente al menos 25 moléculas o fragmentos diferentes, por ejemplo, al menos 100, al menos 500, al menos 1000, o al menos 10 000 moléculas o fragmentos diferentes.

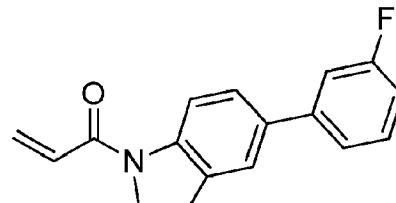
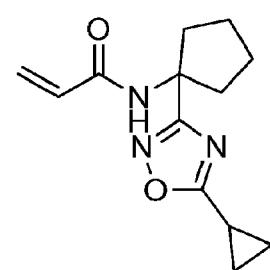
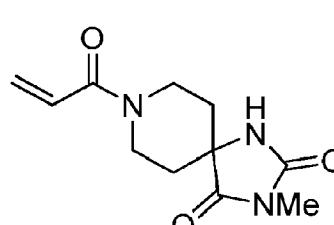
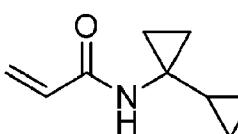
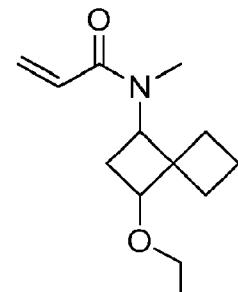
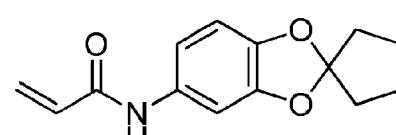
En la tabla 1 se muestra un ejemplo de un banco en el que el grupo funcional comprende acrilamida. En la tabla 2 se indican otros candidatos, entre cuyos grupos funcionales se incluyen cloroacetamida, epóxido, sustratos de SNAr, vinilsulfona, cianamidas y arilnitrilos.

Tabla 1: Ejemplo de banco de candidatos a ligandos. Todas las soluciones son 50 mM en DMSO

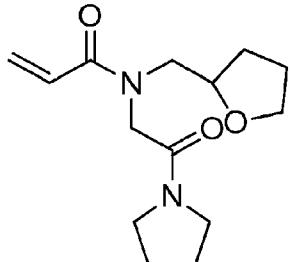
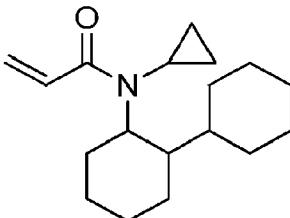
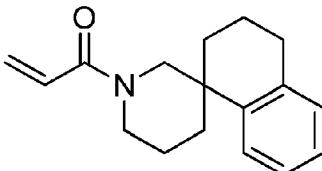
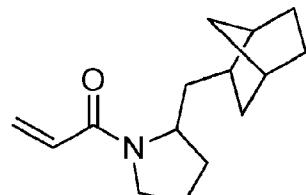
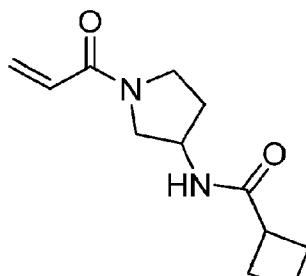
Referencia	Estructura
CA-009	
CA-012	
CA-028	

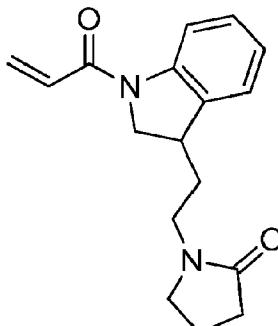
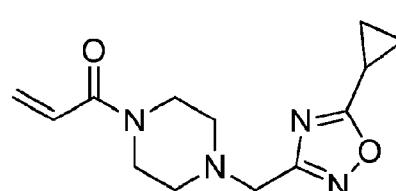
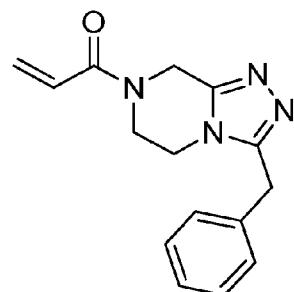
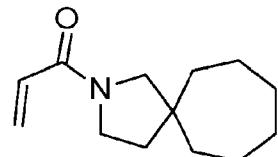
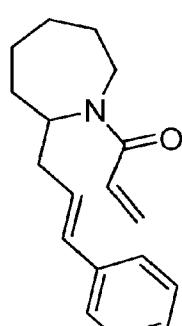
Referencia	Estructura
CA-029	
CA-030	
CA-031	
CA-032	
CA-034	

Referencia	Estructura
CA-037	
CA-038	
CA-039	
CA-040	
CA-041	
CA-042	

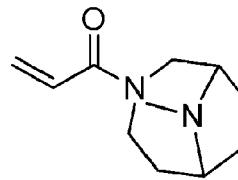
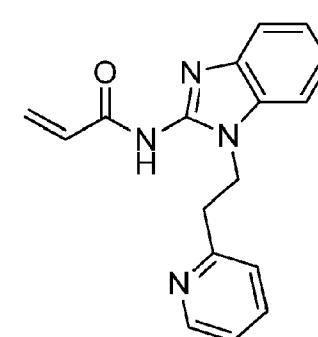
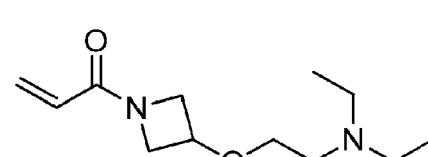
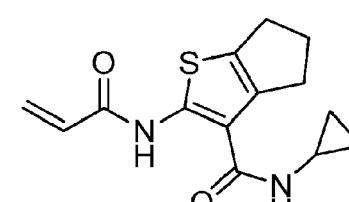
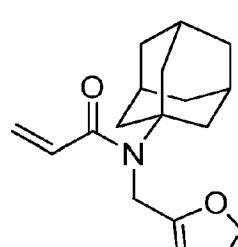
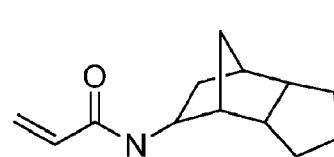
Referencia	Estructura
	
CA-044	
CA-046	
CA-047	
CA-048	
CA-054	

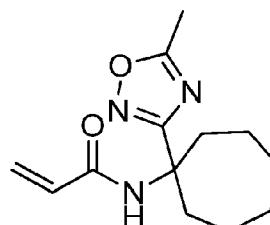
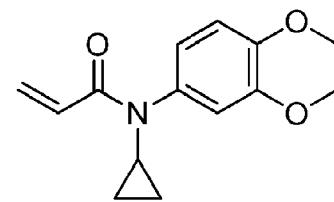
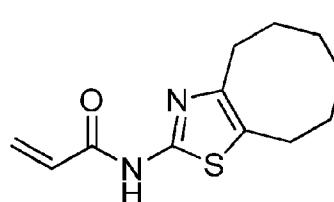
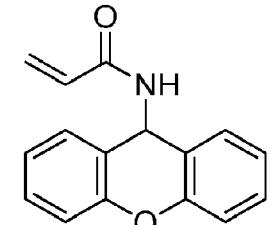
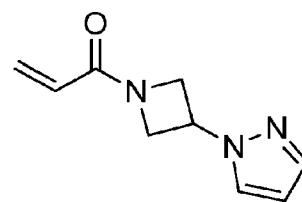
Referencia	Estructura
CA-055	
CA-056	
CA-057	
CA-060	
CA-072	
CA-079	
CA-080	

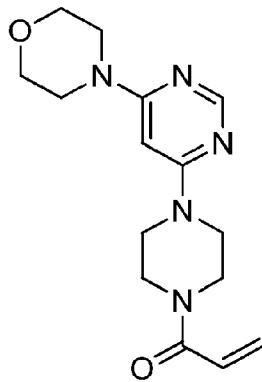
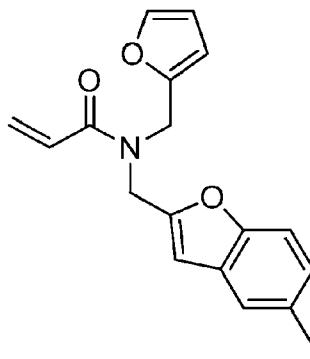
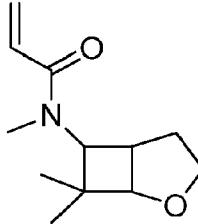
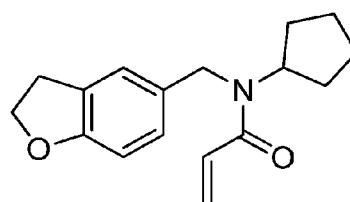
Referencia	Estructura
	
CA-081	
CA-084	
CA-087	
CA-088	
CA-089	

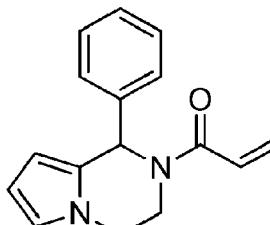
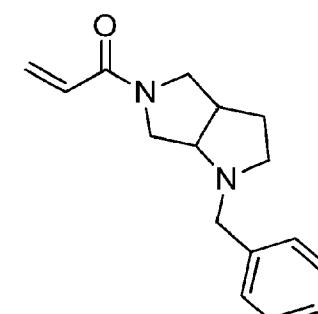
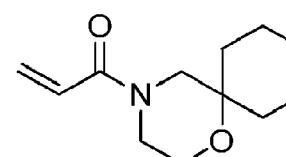
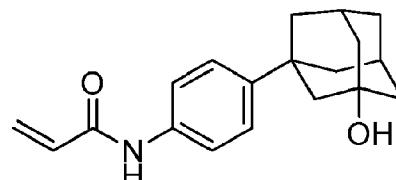
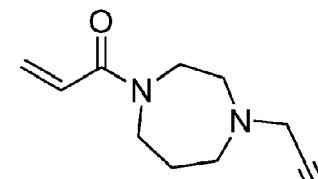
Referencia	Estructura
	
CA-091/238	
CA-092	
CA-093	
CA-096	
CA-097	

Referencia	Estructura
CA-098	
CA-099	
CA-129	
CA-141	
CA-142	
CA-143	

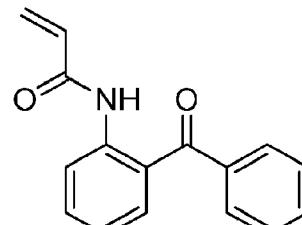
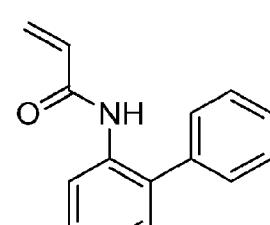
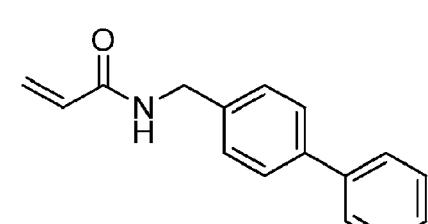
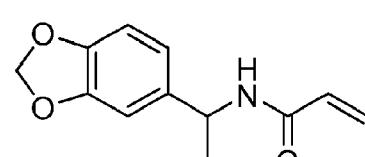
Referencia	Estructura
	
CA-144	
CA-145	
CA-155	
CA-157	
CA-159	

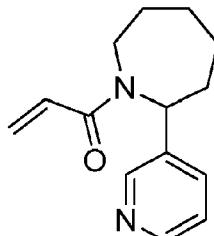
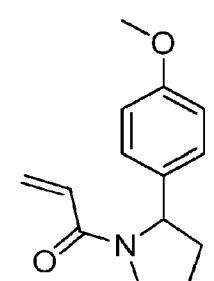
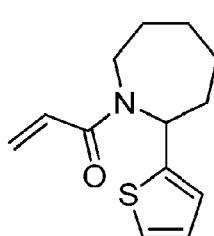
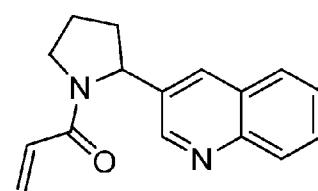
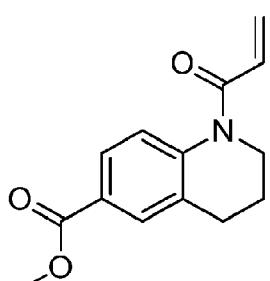
Referencia	Estructura
CA-162	
CA-167	
CA-170	
CA-171	
CA-173	
CA-179	

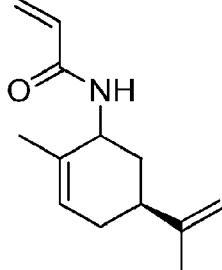
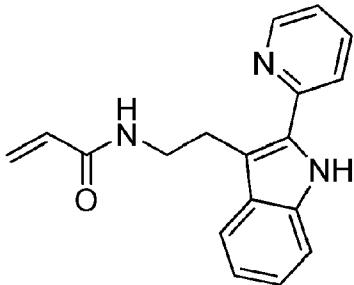
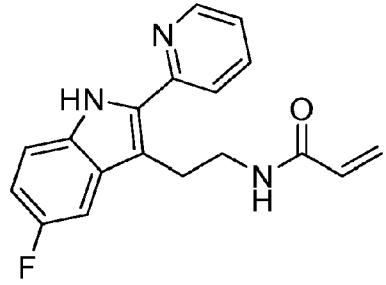
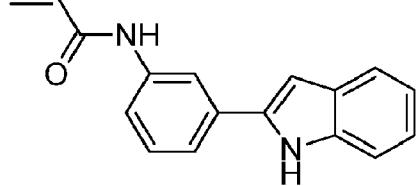
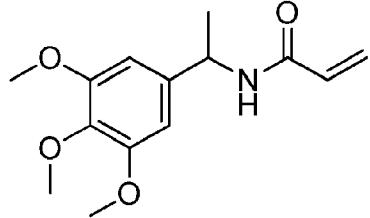
Referencia	Estructura
	
CA-178	
CA-182	
CA-184	
CA-187	

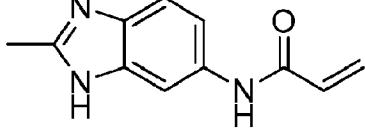
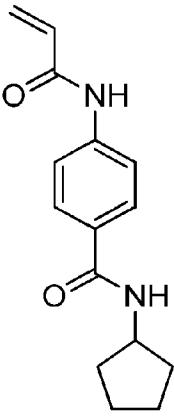
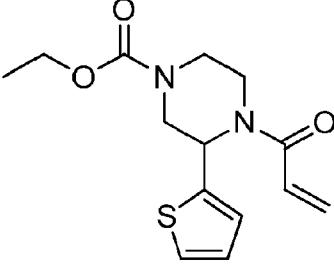
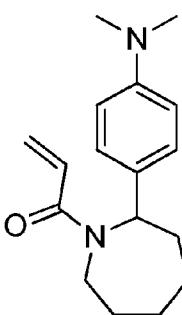
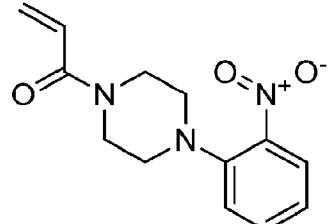
Referencia	Estructura
	
CA-190	
CA-193	
CA-194	
CA-196	
CA-202	

Referencia	Estructura
CA-203	
CA-207	
CA-211	
CA-218	
CA-219	
EL-1004	

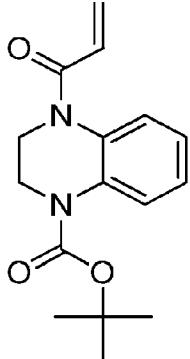
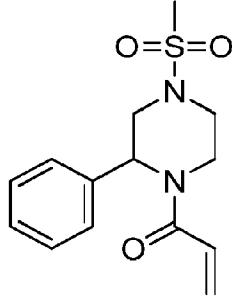
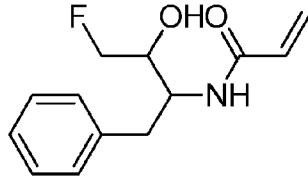
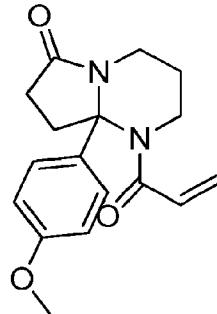
Referencia	Estructura
	
EL-1007	
EL-1012	
EL-1050	
EL-1051	
EL-1059	

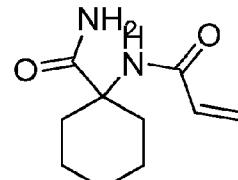
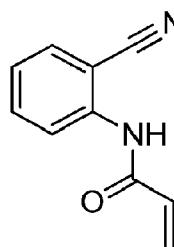
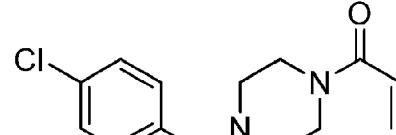
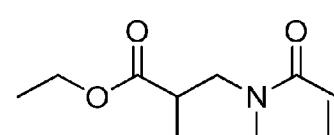
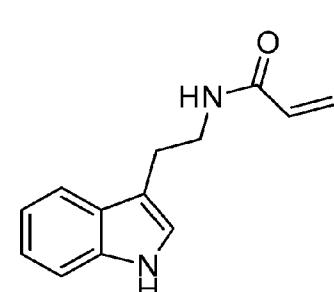
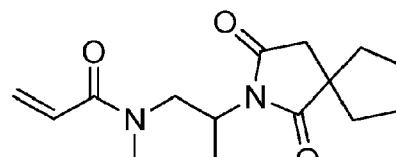
Referencia	Estructura
	
EL-1062	
EL-1063	
EL-1064	
EL-1071	
EL-1074	

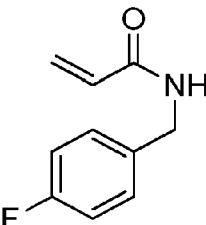
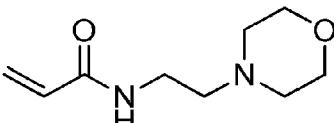
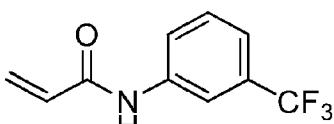
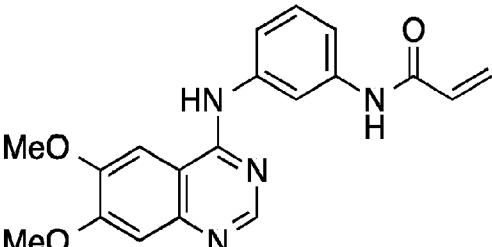
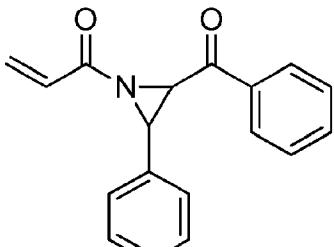
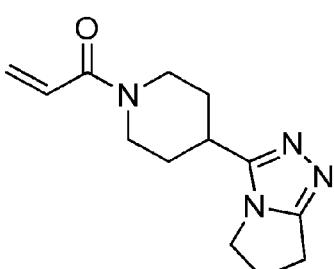
Referencia	Estructura
	
EL-1083	
EL-1084	
EL-1098	
EL-1101	
EL-1109	

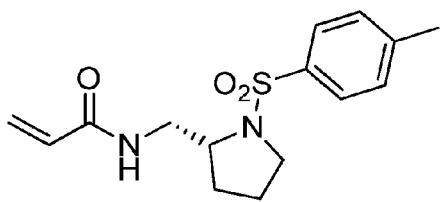
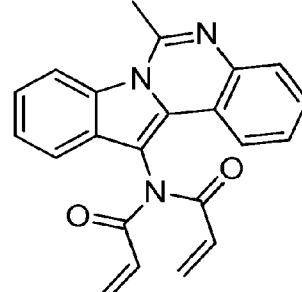
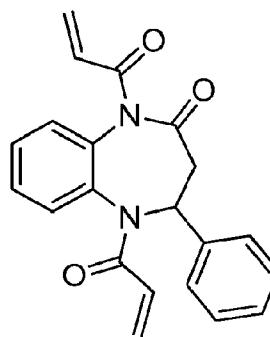
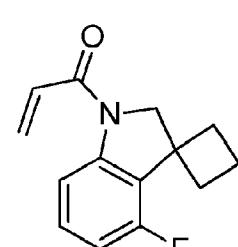
Referencia	Estructura
	
EL-1114	
EL-1121	
EL-1140	
EL-1134	

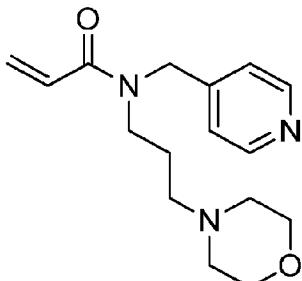
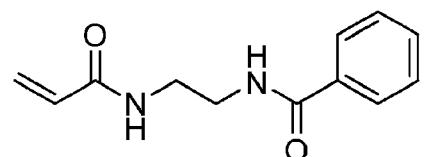
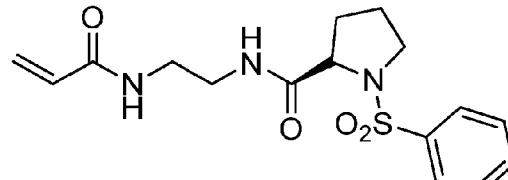
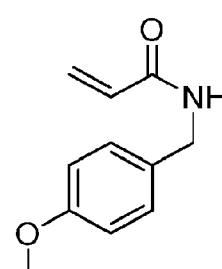
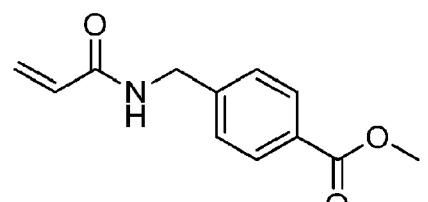
Referencia	Estructura
EL-1143	
EL-1152	
EL-1153	
EL-1155	
EL-1156	
EL-1157	

Referencia	Estructura
	
EL-1160	
EL-1164	
EL-1168	
EL-1170	

Referencia	Estructura
	
EL-1178	
EL-1183	
EL-1187	
EL-1174	
CA-236	
BN-62	

Referencia	Estructura
	
BN-346	
BN-80	
GC-248	
CA-053	
CA-106	

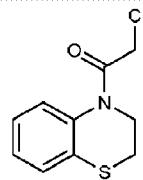
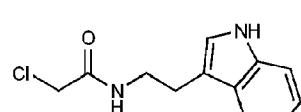
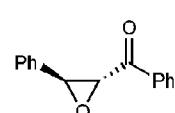
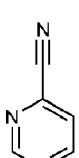
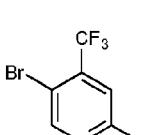
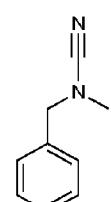
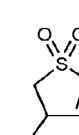
Referencia	Estructura
CA-118	
CA-152	
CA-165-1	
CA-188	
CA-192	

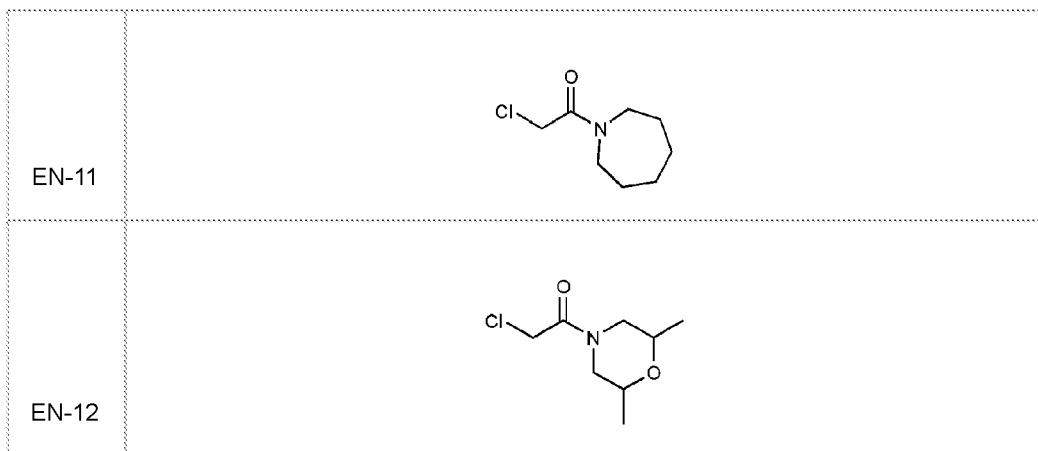
Referencia	Estructura
	
CA-216	
CA-224	
BN63	
BN62	
BN66	

Referencia	Estructura
BN78	
BN122	

Tabla 2: Otros ejemplos de candidatos a ligandos. Todas las soluciones son 50 mM en DMSO

EN-01	
EN-02	
EN-03	
EN-04	

		
EN-05		
EN-06		
EN-07		
EN-08		
EN-09		
EN-10		



Las condiciones exactas de reacción para el cribado de un banco de candidatos a ligando frente a la molécula diana que comprende el grupo tiol dependerán de factores tales como la naturaleza química del banco elegido y pueden ser determinadas por el experto de manera empírica.

5 El procedimiento según el primer aspecto de la presente invención puede comprender además la etapa de: k) desarrollar un ligando de acierto para producir un fármaco u otro inhibidor.

Cuando el grupo tiol es endógeno a la molécula diana, el ligando de acierto puede convertirse en un inhibidor covalente irreversible. Como alternativa, el ligando de acierto puede modificarse en un análogo no covalente (por ejemplo, eliminando el grupo funcional) y convertirse en un inhibidor reversible.

10 Cuando la molécula diana ha sido modificada para incluir el grupo tiol, el ligando de acierto puede modificarse para transformarse en un análogo no covalente (por ejemplo, eliminando el grupo funcional) y convertirse en un inhibidor reversible.

15 Cuando el ligando de acierto comprende un fragmento, este fragmento puede desarrollarse, por ejemplo, por medio de enlace de fragmentos, cultivo de fragmentos, combinación con otras moléculas o combinación entre sí para proporcionar prototipos moleculares de fármacos de alta afinidad. Los nuevos fragmentos pueden fusionarse con elementos de inhibidores conocidos para producir nuevos inhibidores de alta afinidad.

El desarrollo del ligando de acierto puede comprender uno o más de las siguientes etapas:

- obtención de estructuras del ligando unido a la molécula diana, por ejemplo, mediante cristalograffía de rayos X o RMN;
- 20 • desarrollo de fragmentos realizada según las técnicas convencionales de la química médica;
- repetición del procedimiento según el primer aspecto de la presente invención utilizando análogos del ligando de acierto para seleccionar candidatos a ligando de mayor afinidad;
 - uso de la espectrometría de masas o RMN para confirmar la modificación de las proteínas e identificar el residuo de modificación;
- 25 • realizar en paralelo otros ensayos bioquímicos con los aciertos y sus derivados, por ejemplo, para comprobar la inhibición de proteínas (cuando la molécula diana sea Cdk2, estos otros ensayos bioquímicos podrían incluir un ensayo de unión a ciclina y/o un ensayo de actividad cinasa)

30 Los ligandos identificados según los procedimientos de la presente invención se utilizan, por ejemplo, como nuevos compuestos de prototipos de moléculas terapéuticas, inhibidores enzimáticos, sondas para ensayos bioquímicos o agentes de entrecruzamiento de proteínas y similares.

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se ilustran ejemplos de realizaciones del procedimiento según el primer aspecto de la presente invención.

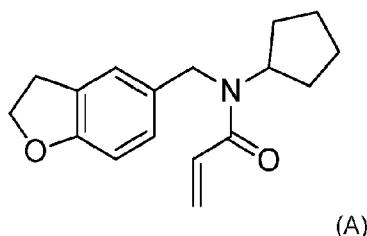
También se divulga en el presente documento un ligando de acierto o candidato a ligando identificado según el procedimiento del primer aspecto de la presente invención.

Esta faceta de la divulgación incluye, por tanto, cualquiera de los candidatos a ligando expuestos en la anterior tabla 1, si se identifican como ligandos de acierto utilizando el procedimiento según el primer aspecto de la presente invención.

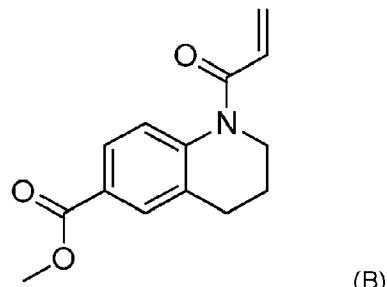
5 Esta faceta de la divulgación también abarca a derivados de dichos ligandos. Los derivados pueden incluir diversas sustituciones aromáticas o alifáticas, tales como cualquier halógeno, cualquier átomo excepto H, cualquier cadena de alquilo, cualquier ciclo, cualquier carbociclo o cualquier heterociclo. Además, pueden utilizarse otros grupos electrófilos en lugar de la funcionalidad acrilamida, por ejemplo, acrilato, α,β -cetonas insaturadas, vinilsulfonamidas, vinilsulfona, vinilsulfonato, α -cetonas halogenadas, epóxidos y derivados sustituidos de los mismos.

10 El ejemplo 1 describe el cribado de un banco de 120 acrilamidas contra la cinasa dependiente de ciclina de tipo salvaje 2 (Cdk2) que contiene un residuo de cisteína endógeno expuesto en la superficie (C177), utilizando glutatión como tiol modelo. Este procedimiento identificó dos "ligandos de acierto": CA-184 y EL-1071, cuyas estructuras se exponen a continuación:

CA-184:

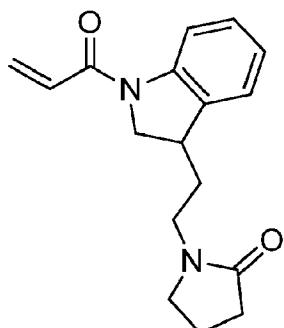


15 EL-1071:



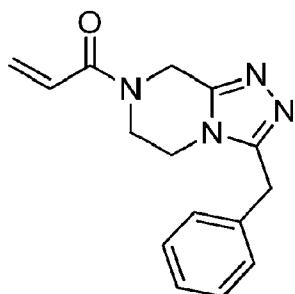
20 El ejemplo 2 describe el cribado de un banco de 120 acrilamidas contra la cinasa dependiente de ciclina de tipo salvaje 2 (Cdk2) que contiene un residuo de cisteína endógeno expuesto en la superficie (C177). En este ejemplo, se utilizó como tiol modelo un mutante de Cdk2 (C177A, F80C, K278C) que contenía dos residuos de cisteína expuestos en la superficie introducidos. Este procedimiento identificó dos "ligandos de acierto": CA-89 y CA-92, cuyas estructuras se exponen a continuación:

CA-89:



(C)

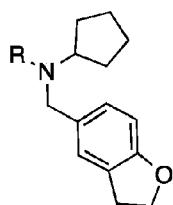
CA-92:



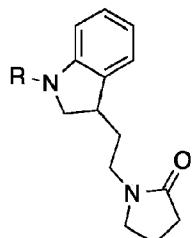
(D)

Esta faceta de la divulgación incluye por tanto CA-184 (fórmula A), CA-89 (fórmula C) y CA-92 (fórmula D), que son fragmentos novedosos creados por los presentes inventores e identificados como ligandos de acierto utilizando el procedimiento según el primer aspecto de la presente invención.

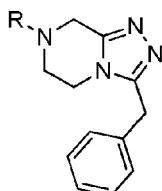
- 5 Esta faceta de la divulgación también incluye derivados de CA-184 (fórmula A), CA-89 (fórmula C) y CA-92 (fórmula D), tal como se han definido anteriormente. Por lo tanto, esta faceta de la divulgación incluye compuestos con las fórmulas siguientes y derivados de los mismos, en las que R comprende cualquier grupo electrófilo adecuado, por ejemplo, un grupo electrófilo seleccionado del grupo que consiste en funcionalidades acrilamida, acrilato, α,β -cetonas insaturadas, vinilsulfonamidas, vinilsulfona, vinilsulfonato, α -cetonas halogenadas, epóxidos y derivados sustituidos de los mismos:
- 10



(I)



(II)



(III)

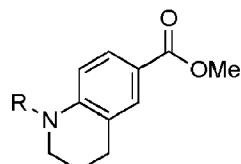
- 15 Tal como se analizó anteriormente, los derivados de estos compuestos pueden incluir diversas sustituciones aromáticas o alifáticas, tales como cualquier halógeno, cualquier átomo excepto H, cualquier cadena de alquilo, cualquier ciclo, cualquier carbociclo o cualquier heterociclo.

También se describe en el presente documento un fármaco desarrollado utilizando el procedimiento según el primer aspecto de la invención.

- 20 Por lo tanto, esta faceta de la divulgación incluye un fármaco desarrollado a partir de cualquiera de los candidatos a ligando establecidos en la anterior tabla 1, si se identifican como ligandos de acierto utilizando el procedimiento según el primer aspecto de la presente invención, y derivados de los mismos.

Así, por ejemplo, esta faceta de la divulgación comprende un fármaco desarrollado a partir de cualquiera de los "ligandos de acierto" analizados anteriormente, tales como los de fórmula I, fórmula II y fórmula III, incluidos CA-184 (fórmula A), CA-89 (fórmula C) o CA-92 (fórmula D) o derivados de los mismos, tal como se ha definido anteriormente.

- 5 Esta faceta de la divulgación también comprende un fármaco desarrollado a partir de EL-1071 (fórmula B) o derivados del mismo, por ejemplo, los de fórmula IV, en los que R comprende cualquier grupo electrófilo adecuado, por ejemplo, un grupo electrófilo seleccionado del grupo que consiste en funcionalidades acrilamida, acrilato, α,β -cetonas insaturadas, vinilsulfonamidas, vinilsulfona, vinilsulfonato, α -cetonas halogenadas, epóxidos y derivados sustituidos de los mismos:



(IV)

- 10 Tal como se analizó anteriormente, los derivados de estos compuestos pueden incluir diversas sustituciones aromáticas o alifáticas, tales como cualquier halógeno, cualquier átomo excepto H, cualquier cadena de alquilo, cualquier ciclo, cualquier carbociclo o cualquier heterociclo.

- 15 El ensayo cinético de consumo de tiol analizado anteriormente también tiene usos potenciales fuera del contexto del procedimiento según el primer aspecto de la invención. Un segundo aspecto de la invención por lo tanto proporciona un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre un tiol y una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol que comprende las etapas de:

- 20 a) poner en contacto un tiol con una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol para formar un producto de reacción en una mezcla de reacción;
- b) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- c) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma; y
- d) calcular la velocidad de reacción entre el tiol y la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol.

- 25 Todos los detalles del primer aspecto de la invención se aplican *mutatis mutandis* al segundo aspecto de la invención.

Así, la etapa b) del segundo aspecto de la invención puede comprender poner en contacto una parte alícuota de la mezcla de reacción con el reactivo de cuantificación de tiol, en el que las etapas b) y c) se repiten una o más veces más, y en el que, durante cada repetición, la etapa b) se lleva a cabo en uno o más puntos temporales diferentes durante la reacción.

- 30 La etapa b) del segundo aspecto de la invención puede comprender, como alternativa, poner en contacto toda la mezcla de reacción o una proporción sustancial de la misma con el reactivo de cuantificación de tiol, en el que las etapas a) a c) se repiten una o más veces más, y en el que, durante cada repetición, la etapa b) se lleva a cabo en uno o más puntos temporales adicionales diferentes durante la reacción.

- 35 En cualquier caso, la etapa d) puede comprender el cálculo de una constante de velocidad para la formación del producto de reacción.

Como alternativa, la etapa b) puede realizarse en un único punto temporal durante la reacción, y la etapa d) puede comprender el cálculo de la conversión del tiol al producto de reacción en ese punto temporal. Este procedimiento puede comprender además el cálculo de una aproximación de una constante de velocidad para la formación del producto de reacción.

- 40 Una realización preferida del procedimiento según el segundo aspecto de la invención comprende las etapas de:

- a) poner en contacto un tiol con la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol para formar un producto de reacción en una mezcla de reacción;
- b) transferir una parte alícuota de la mezcla de reacción a una placa de inactivación que contenga un reactivo de cuantificación de tiol en un punto temporal definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporcione a la parte alícuota una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;

- c) medir la propiedad biofísica de la parte alícuota; y
- d) calcular la velocidad de reacción entre el tiol y la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol;

en el que las etapas b) y c) se repiten una o más veces, durante las cuales la etapa b) se lleva a cabo en uno o más momentos diferentes durante la reacción.

- 5 Tal como se ha descrito anteriormente, el procedimiento según el segundo aspecto de la presente invención puede utilizarse en el procedimiento según el primer aspecto de la presente invención, para permitir medir la velocidad de reacción entre una molécula diana y un candidato a ligando. Sin embargo, el procedimiento según el segundo aspecto de la presente invención puede tener otros usos. Por ejemplo, puede utilizarse en ensayos enzimáticos, especialmente en relación con enzimas que actúan sobre grupos tiol o requieren grupos tiol.
- 10 Otra realización preferida del procedimiento del segundo aspecto puede implicar el uso de un reactivo de cuantificación de tiol que se une al tiol de forma irreversible. El significado de unión irreversible en este contexto será comprendido por el experto, pero se entiende que, una vez unido al tiol, el reactivo de cuantificación de tiol no se desliga en las condiciones utilizadas en el procedimiento. Tales agentes incluyen, entre otros, maleimidas (incluidas, entre otras, N-(7-dimetilamino-4-metilcumarin-3-il)maleimida y fluoresceín-5-maleimida), el compuesto 5a divulgado en Hong *et al.*, 2009⁷ y el éster metílico del ácido 3-(7-hidroxi-2-oxo-2H-cromo-3-ilcarbamoyl)acrílico⁸. El uso de un reactivo irreversible puede proporcionar una medición más precisa. Los reactivos de detección de tiol se tratan con más detalle en Chen *et al.*, 2010⁹.
- 15 Otra realización preferida del procedimiento del segundo aspecto implica el uso de un agente reductor para evitar la oxidación no deseada del tiol. El agente reductor se separa del tiol antes de la cuantificación del tiol, lo que permite una cuantificación más precisa de la velocidad de reacción. La eliminación del agente reductor puede conseguirse utilizando un agente reductor inmovilizado, que puede añadirse en paralelo con la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol. El agente reductor inmovilizado puede separarse entonces del tiol antes de la cuantificación del tiol. Así, en una realización preferida del procedimiento del segundo aspecto, en la etapa a) el tiol se pone en contacto con un agente reductor en paralelo con la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol, eliminándose dicho agente reductor en la etapa b) antes de que la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma se ponga en contacto con un reactivo de cuantificación de tiol.

- 20 Un agente reductor inmovilizado preferido es la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) inmovilizada sobre esferas de agarosa (disponibles en el mercado en Thermo Fisher). La TCEP también podría inmovilizarse de otras formas, que resultarán evidentes para la persona experta (véase, por ejemplo, Alzahrani y Welham, 2014¹⁰). Otros agentes reductores de disulfuro (por ejemplo, fosfinas y tioles) podrían inmovilizarse y utilizarse de forma similar.

25 Los aspectos de la presente invención se ilustrarán a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos 1 y 2

Metodología:

- 30 Se cribó un banco de 120 acrilamidas contra a) la cinasa dependiente de ciclina humana 2 (Cdk2, que contiene un residuo de cisteína expuesto en la superficie, C177), preparada clonando el ADNC en el vector de expresión bacteriano pRSETA para generar una fusión de Cdk2 marcada con polihistidina que se purificó de *E. coli* utilizando técnicas convencionales, y b) un tiol modelo (los detalles específicos se ofrecen a continuación). Las estructuras de estas 120 acrilamidas figuran en la tabla 1.
- 35 A los pocillos que contenían 150 µl de tiol (Cdk2 o tiol modelo) (5 µM) en tampón fosfato desgasificado (pH 8) se le añadieron esferas con TCEP inmovilizada (al 2 % v/v). Tras incubar a 4 °C durante 1 hora para garantizar la reducción completa del tiol, se añadieron soluciones madre de acrilamida en DMSO para obtener una concentración final de 500 µM de ligando.
- 40 En intervalos de tiempo de entre 0,25 y 250 horas, se extrajeron partes alícuotas de 3 µl (sin transferir ninguna esfera con TCEP) y se inactivaron en placas de fluorescencia distintas, en las que cada pocillo contenía 27 µl de CPM (concentración final de 1,25 µM) en tampón fosfato desgasificado (pH 7,5).
- 45 Después de incubar las placas de fluorescencia durante 1 hora a temperatura ambiente, se tomaron mediciones de fluorescencia (excitación/emisión de 380/470 nm) en un lector de placas de múltiples marcadores EnVision de PerkinElmer y se procesaron con la versión 1.12 de EnVision Workstation.
- 50 Las mediciones de fluorescencia se normalizaron frente a un control de DMSO/tiol solo, y se representaron gráficamente frente al tiempo.
- 55 Las constantes de velocidad se calcularon utilizando el programa informático Prism, versión 6 de GraphPad ajustando un decaimiento exponencial de primer orden a los datos. La constante de velocidad de cada acrilamida con Cdk2 se

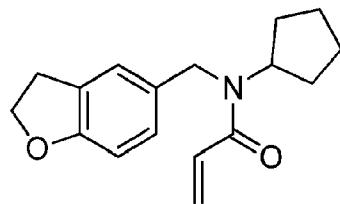
dividió por la constante de velocidad de ese fragmento con el tiol modelo para obtener el aumento de velocidad de cada candidato a ligando.

Ejemplo 1:

5 El tiol modelo del ejemplo 1 es el glutatión (GSH). Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación. Los aciertos se definieron como fragmentos en los que $k_{\text{Cdk2}}/k_{\text{GSH}} > 5,8$ (determinado empíricamente como 3 desviaciones estándar sobre la media).

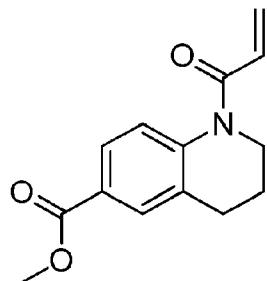
El gráfico de distribución de la velocidad normalizada se muestra en la figura 5. Tal como puede observarse en esta figura, se identificaron dos fragmentos de acierto, correspondientes a CA-184 y EL-1071, cuyas estructuras se exponen a continuación:

10 CA-184:



(A)

EL-1071:



(B)

15

Dos ejemplos de compuestos, un compuesto negativo EL-1007 y un fragmento de acierto EL-1071, se analizarán con más detalle a continuación a modo de ilustración.

20 Tal como se ilustra en las figuras 6(a) y (b), la constante de velocidad para la formación del conjugado de EL-1007-GSH (k_{GSH}) fue de 0,025, mientras que la constante de velocidad para la formación del conjugado de EL-1007-Cdk2 (K_{Cdk2}) fue de 0,035. Si se divide la constante de velocidad de formación del conjugado de EL-1007-Cdk2 (K_{Cdk2}) por la constante de velocidad de formación del conjugado de EL-1007-GSH (k_{GSH}), se obtiene un aumento de la velocidad del EL-1007 de 1,4. Este valor está por debajo del umbral del aumento de la velocidad elegido de 5,8 y, por lo tanto, EL-1007 se definió como un compuesto negativo.

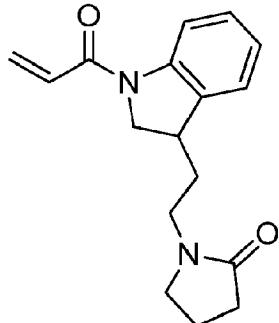
25 Tal como se ilustra en las figuras 7(a) y (b), la constante de velocidad para la formación del conjugado de EL-1071-GSH (k_{GSH}) fue de 0,051, mientras que la constante de velocidad para la formación del conjugado de EL-1071-Cdk2 (K_{Cdk2}) fue de 0,433. Si se divide la constante de velocidad de formación del conjugado de EL-1071-Cdk2 (K_{Cdk2}) por la constante de velocidad de formación del conjugado de EL-1071-GSH (k_{GSH}), se obtiene un aumento de la velocidad del EL-1071 de 8,5. Este valor está por encima del umbral del aumento de la velocidad elegido de 5,8 y, por lo tanto, EL-1071 se definió como un fragmento de acierto.

30 Ejemplo 2:

35 El tiol modelo utilizado en el ejemplo 2 es una forma mutante de la Cdk2 humana (C177A, F80C, K278C) que contiene dos residuos de cisteína expuestos en la superficie introducidos. Las mutaciones se introdujeron mediante mutagénesis dirigida al sitio y el ADNc resultante se clonó en el vector de expresión bacteriano pRSETA para generar una fusión de Cdk2 marcada con polihistidina que se purificó a partir de *E. coli* mediante técnicas convencionales. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Los siguientes candidatos a ligandos (CA-89 y CA-92) fueron identificados como aciertos, ya que muestran un aumento significativo de la velocidad frente a ambos tioles modelo (GSH y Cdk2 mutante). Las estructuras de los aciertos se exponen a continuación:

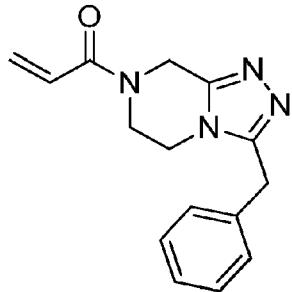
CA-89:



(C)

5

CA-92:



(D)

Resultados:

10 La constante de velocidad con glutatión ($k(GSH)$), la constante de velocidad con Cdk2 ($k(Cdk2)$), la constante de velocidad con Cdk2[C177A, F80C, K278C] ($k(Cdk2_mut)$) y los aumentos de velocidad calculados para cada candidato a ligando cribado ($k(Cdk2)/k(GSH)$ y $k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)$) se muestran en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Constantes de velocidad y aumento de la velocidad para cada candidato a ligando cribado

Ligando	Constante velocidad glutatión	Constante velocidad Cdk2	Constante de velocidad con Cdk2 [C177A, F80C, K278C]	$k(Cdk2)/k(GSH)$	$k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)$
	($k(GSH)$)	($k(Cdk2)$)	($k(Cdk2_mut)$)		
CA-009	0,00469	0,00446	0,00402	0,94969	1,10766
CA-012	0,05132	0,09635	0,41570	1,87744	0,23178
CA-028	0,05986	0,17330	0,31380	2,89509	0,55226
CA-029	0,01716	0,00892	0,00615	0,51964	1,44968
CA-030	0,01590	0,01069	0,03859	0,67233	0,27701
CA-031	0,01687	0,00688	0,00466	0,40806	1,47852
CA-032	0,01642	0,02299	0,01104	1,40012	2,08243

ES 2 972 584 T3

Ligando	Constante de velocidad glutatión con	Constante de velocidad Cdk2 con	Constante de velocidad con Cdk2 [C177A, K278C]	k(Cdk2)/k(GSH)	k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)
	(k(GSH))	(k(Cdk2))	(k(Cdk2_mut))		
CA-034	0,01354	0,02784	0,00997	2,05613	2,79350
CA-037	0,01523	0,05015	0,19520	3,29284	0,25692
CA-038	0,00650	0,00332	0,00345	0,51015	0,96228
CA-039	0,00141	0,00187	0,00304	1,32670	0,61549
CA-040	0,03530	0,02965	0,03020	0,83994	0,98179
CA-041	0,54410	1,14600	1,93300	2,10623	0,59286
CA-042	0,00825	0,04257	0,13510	5,15750	0,31510
CA-044	0,00557	0,00269	0,00154	0,48375	1,74935
CA-046	0,00955	0,00343	0,00249	0,35934	1,37736
CA-047	0,00756	0,00560	0,00346	0,74074	1,61710
CA-048	0,01364	0,01116	0,00791	0,81818	1,41034
CA-054	0,00434	0,00267	0,04027	0,61400	0,06620
CA-055	0,00243	0,00070	0,00101	0,28813	0,69367
CA-056	0,01740	0,02004	0,13610	1,15172	0,14724
CA-057	0,02585	0,07160	0,09413	2,76983	0,76065
CA-060	0,00283	0,00226	0,00223	0,79880	1,01346
CA-072	0,01236	0,02410	0,00481	1,94984	5,01561
CA-079	0,00593	0,00553	0,00210	0,93285	2,63411
CA-080	0,00706	0,00195	-	0,27638	-
CA-081	0,00172	0,00879	0,00475	5,10756	1,85103
CA-084	0,01002	0,00872	0,00438	0,87006	1,98859
CA-087	0,00510	0,00508	-	0,99569	-
CA-088	0,01352	0,00595	0,00177	0,43987	3,36559
CA-089	0,04608	0,20340	0,02054	4,41406	9,90263
CA-091	0,00525	0,00230	-	0,43757	-

ES 2 972 584 T3

Ligando	Constante de velocidad glutatión con	Constante de velocidad Cdk2 con	Constante de velocidad con Cdk2 [C177A, K278C]	k(Cdk2)/k(GSH)	k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)
	(k(GSH))	(k(Cdk2))	(k(Cdk2_mut))		
CA-092	0,08170	0,26340	0,01236	3,22399	21,31068
CA-093	0,00740	0,00196	0,00507	0,26510	0,38729
CA-096	0,01134	0,00340	0,01283	0,30009	0,26524
CA-097	0,00533	0,00152	0,00407	0,28545	0,37346
CA-098	0,01614	0,01499	0,00546	0,92875	2,74542
CA-099	0,23000	0,28990	0,01590	1,26043	18,23270
CA-129	0,00771	0,00274	0,00208	0,35533	1,31716
CA-141	0,01384	0,00693	0,00257	0,50094	2,69347
CA-142	0,02031	0,03086	0,02268	1,51945	1,36067
CA-143	0,02930	0,01115	0,00505	0,38055	2,20661
CA-144	0,04140	0,04682	0,01242	1,13092	3,76973
CA-145	0,00318	0,00205	-	0,64248	-
CA-155	0,26780	0,74300	1,39100	2,77446	0,53415
CA-157	0,00399	0,00288	-	0,72335	-
CA-159	0,00418	0,00232	0,00130	0,55468	1,78996
CA-162	0,02564	0,02529	0,00171	0,98635	14,75496
CA-167	0,01009	0,01101	0,00264	1,09118	4,17678
CA-170	0,06955	0,29720	0,91970	4,27318	0,32315
CA-171	0,00416	0,00423	0,00127	1,01755	3,34281
CA-173	0,01577	0,00754	0,00504	0,47793	1,49544
CA-179	0,00683	0,00760	0,00719	1,11243	1,05644
CA-178	0,14150	0,15070	0,61070	1,06502	0,24677
CA-182	0,00304	0,00381	-	1,25444	-
CA-184	0,01856	0,22350	0,07366	12,04203	3,03421
CA-187	0,04403	0,02811	0,01772	0,63843	1,58634

ES 2 972 584 T3

Ligando	Constante de velocidad con glutatión	Constante de velocidad Cdk2	Constante de velocidad con Cdk2 [C177A, K278C]	k(Cdk2)/k(GSH)	k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)
	(k(GSH))	(k(Cdk2))	(k(Cdk2_mut))		
CA-190	0,01268	0,00347	0,00305	0,27350	1,13630
CA-193	0,02378	0,02444	0,01059	1,02775	2,30784
CA-194	0,00306	0,00505	0,01393	1,65054	0,36246
CA-196	0,00365	0,00372	-	1,02056	-
CA-202	0,00506	0,00543	0,00132	1,07374	
CA-203	0,01382	0,04586	0,07903	3,31838	0,58029
CA-207	0,00972	0,00578	0,00111	0,59465	5,21861
CA-211	0,00538	0,00368	0,00172	0,68395	2,14386
CA-218	0,01290	0,03272	0,11920	2,53643	0,27450
CA-219	0,06515	0,23170	0,71880	3,55641	0,32234
EL-1004	0,01818	0,06444	0,19230	3,54455	0,33510
EL-1007	0,02461	0,03473	0,05859	1,41121	0,59276
EL-1012	0,00837	0,00519	0,03512	0,62036	0,14786
EL-1050	0,00204	0,00166	0,00126	0,81296	1,31742
EL-1051	0,00461	0,00298	0,00361	0,64636	0,82508
EL-1059	0,00656	0,00213	0,00449	0,32444	0,47382
EL-1062	0,00509	0,00448	0,00663	0,88023	0,67617
EL-1063	0,00353	0,00274	0,00461	0,77749	0,59553
EL-1064	0,01205	0,00589	0,00766	0,48896	0,76909
EL-1071	0,05049	0,43300	0,32300	8,57596	1,34056
EL-1074	0,00876	0,00300	0,00342	0,34208	0,87734
EL-1083	0,00618	0,00098	0,00284	0,15827	0,34461
EL-1084	0,00286	0,00314	0,00599	1,10123	0,52470
EL-1098	0,01147	0,01063	0,03487	0,92677	0,30485
EL-1101	0,00780	0,00341	0,00226	0,43725	1,50996

ES 2 972 584 T3

Ligando	Constante de velocidad glutatión con	Constante de velocidad Cdk2	Constante de velocidad con Cdk2 [C177A, K278C]	k(Cdk2)/k(GSH)	k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)
	(k(GSH))	(k(Cdk2))	(k(Cdk2_mut))		
EL-1109	0,00862	0,00827	0,00922	0,95950	0,89656
EL-1114	0,02997	0,07947	0,22990	2,65165	0,34567
EL-1121	0,02567	0,01328	0,01555	0,51734	0,85402
EL-1140	0,00797	0,00303	0,00407	0,38057	0,74551
EL-1134	0,00444	0,00710	0,02097	1,59743	0,33853
EL-1143	0,00493	0,01400	0,00802	2,83918	1,74607
EL-1152	0,00606	0,00612	0,00580	1,00891	1,05501
EL-1153	0,00284	0,00103	0,00419	0,36187	0,24487
EL-1155	0,00836	0,00466	0,00382	0,55755	1,22117
EL-1156	0,01763	0,01873	0,02157	1,06239	0,86834
EL-1157	0,12600	0,20060	0,30460	1,59206	0,65857
EL-1160	0,02860	0,01181	0,00414	0,41294	2,85404
EL-1164	0,00485	0,00239	0,00073	0,49340	3,26155
EL-1168	0,01343	0,00974	0,00175	0,72494	5,55074
EL-1170	0,00243	0,00308	-	1,27052	-
EL-1178	0,04788	0,16110	0,16500	3,36466	0,97636
EL-1183	0,00676	0,00376	0,00864	0,55643	0,43532
EL-1187	0,00634	0,00596	0,00336	0,93943	1,77420
EL-1174	0,00253	0,00090	0,00688	0,35547	0,13095
CA-236	0,00506	0,00116	0,00395	0,22855	0,29244
BN-62	0,00157	0,00190	0,00167	1,21315	1,13628
BN-346	0,00299	0,00428	0,00146	1,42948	2,92145
BN-80	0,02984	0,04190	0,12840	1,40416	0,32632
GC248	0,01495	0,01014	0,01560	0,67826	0,65000
CA-53	0,00428	0,00097	0,00547	0,22599	0,17704

ES 2 972 584 T3

Ligando	Constante de velocidad glutatión con	Constante de velocidad Cdk2	Constante de velocidad con Cdk2 [C177A, F80C, K278C]	k(Cdk2)/k(GSH)	k(Cdk2)/k(Cdk2_mut)
	(k(GSH))	(k(Cdk2))	(k(Cdk2_mut))		
CA-106	0,00227	0,00145	0,00151	0,63672	0,95762
CA-118	0,00280	0,00698	0,00415	2,49090	1,68242
CA-152	0,25010	0,83580	3,05900	3,34186	0,27323
CA-165-1	0,44440	0,39450	1,13600	0,88771	0,34727
CA-188	0,19030	0,55000	1,16100	2,89017	0,47373
CA-192	0,00676	0,00341	0,00447	0,50481	0,76252
CA216	0,00254	0,00676	0,01899	2,66037	0,35598
CA-224	0,00508	0,00155	0,00358	0,30454	0,43289
BN-63	0,00215	0,00194	0,00330	0,90111	0,58818
BN-65	0,00292	0,00121	0,00398	0,41344	0,30309
BN-66	0,00160	0,00089	0,00350	0,55648	0,25413
BN-78	0,00403	0,00116	0,00196	0,28734	0,59052
BN122	0,00283	0,00219	0,00117	0,77530	1,87907

Ejemplo 3

Otro conjunto de mutantes Cdk2 adicionales fueron cribados, en los que todos contenían la mutación C177A y, por lo tanto, sólo tenían una cisteína en la superficie:

5 F80C (sin la mutación K278C)

H71C

S276C

N272

T182C

10 R122C

S181C

Las mutaciones se introdujeron mediante mutagénesis dirigida al sitio y el ADNc resultante se clonó en el vector de expresión bacteriano pRSETA para generar una fusión de Cdk2 marcada con polihistidina que se purificó a partir de *E. coli* utilizando técnicas convencionales.

15 Los datos de este cribado se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4: Constantes de velocidad para cada ligando con cada Cdk2 mutante

ES 2 972 584 T3

	Proteína	Glutatión	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2
	Posición de la cisteína	NA	WT	F80C	H71C	S276C	N272C	T182C	R122C	S181C
	Otras mutaciones		-	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A
Nombre del ligando										
CA-009		0,006985	0,01679	0,003513	0,001981	0,005718	0,009206	0,1507	0,004047	0,003288
CA-012		0,05195	0,09635	0,202	0,01647	0,05118	0,02176	0,3013	0,03583	0,1301
CA-028		0,06113	0,1733	0,07185	0,06327	0,06356	0,04653	0,3207	0,02124	0,03097
CA-029		0,0211	0,008917	0,002607	0,002672	0,006904	0,005738	0,03726	0,004289	0,006959
CA-030		0,01673	0,01069	0,025	0,002204	0,004445	0,00403	0,009966	0,004845	0,01251
CA-031		0,0174	0,003072	0,0005005		0,009212	0,02034	0,01849	0,003846	0,009769
CA-032/228		0,01636	0,02299	0,03651	0,2513	0,03029	0,04919	0,2422	0,02509	0,01707
CA-034		0,01847	0,01944	0,02361	0,03232	0,0502	0,01334	0,1874	0,01185	0,01082
CA-037		0,01516	0,05015	0,964	0,02977	0,02673	0,02636	0,1865	0,0147	0,02267
CA-038		0,01131	0,005901		0,009335	0,006591	0,006696	0,01973	0,004175	0,005333
CA-039		0,002035	0,0005702			0,002319	0,001526	0,0029	0,001809	0,001289
CA-040/230		0,04288	0,02965	0,0133	0,03145	0,03282	0,1319	0,05436	0,01222	0,01059
CA-041		0,5506	1,146		0,003968	0,003524	0,004727	0,471	0,002178	0,003169
CA-042		0,01463	0,04257	0,006272	0,007409	0,008245	0,001395	0,08115	0,001778	0,004663
CA-044		0,008146	0,002694			0,0009087		0,002365	0,001875	0,0009239
CA-046		0,01631	0,003432	0,001897	0,00116	0,01153	0,001516	0,009705	0,00391	0,00324
CA-047		0,0123	0,0056	0,001607		0,006721	0,002048	0,01308	0,003233	0,003402
CA-048		0,01891	0,01346	0,01517	0,004408	0,01473	0,01029	0,05001	0,003826	0,0114
CA-054		0,004326	0,002666	0,006411	0,004426	0,004109	0,005397	0,004582	0,001816	0,002032
CA-055		0,002381	0,0009681		0,001157	0,00166	0,01093	0,0006241	0,001021	0,002556
CA-056		0,01742	0,02004	0,08682	0,02185	0,03094	0,02696	0,3197	0,01362	0,03604
CA-057		0,02651	0,0716	0,05671	0,04338	0,04258	0,07649	0,4908	0,03118	0,02834
CA-060		0,005138	0,00367	aprox. 0,0004944		0,005711	0,01889	0,00832	0,002402	0,004014
CA-072		0,02221	0,0241	0,0057	0,3655	0,08965	0,2085	0,1492	0,00778	0,04813
CA-079		0,009223	0,00939	0,001299	0,002765	0,006132	0,004534	0,007716	0,004453	0,04575

ES 2 972 584 T3

	Proteína	Glutatión	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2
	Posición de la cisteína	NA	WT	F80C	H71C	S276C	N272C	T182C	R122C	S181C
	Otras mutaciones		-	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A
Nombre del ligando										
CA-080/239		0,01204	0,00279	0,001007		0,003474	0,003318	0,01162	0,002083	0,001658
CA-081/240		0,002337	0,01776	0,0108	0,002113	0,01732	0,007657	0,01943	0,001659	0,02322
CA-084		0,01681	0,008718	0,03044	0,0138	0,01813	0,001146	0,06469	0,004528	0,007158
CA-087		0,00846	0,00896	0,004048	0,3006	0,006194	0,002576	0,05469	0,002699	0,005463
CA-088		0,01947	0,005947	0,002347		0,008557	0,01092	0,01771	0,009119	0,003708
CA-089		0,04691	0,2034	0,08953	0,163	0,1436	0,2038	0,784	0,02168	0,02699
CA-091/238		0,007745	0,002299	0,0007964	0,001506	0,007277	0,002919	0,01551	0,005358	0,008821
CA-092		0,08356	0,2634	0,008842	0,2247	0,5455	0,5985	0,5417	0,1896	0,07642
CA-093		0,01326	0,003412	0,01686	0,007628	0,0176	0,005578	0,05399	0,004124	0,01029
CA-096/146		0,01125	0,003401	0,01846	0,01	0,01436	0,01002	0,1161	0,008035	0,1459
CA-097		0,009838	0,001519	0,001856	0,001541	0,008009	0,005802	0,01424	0,003442	
CA-098		0,02562	0,0242	0,01519	0,0205	0,08188	0,1716	0,1221	0,008918	0,02273
CA-099/153		0,2123	0,2899	0,03506	0,06172	0,481	0,5081	0,4326	0,5145	0,314
CA-129/235		0,01093	0,002741	0,001988	0,0003575	0,01838	0,004302	0,009647	0,01011	0,002434
CA-141		0,01802	0,006933	0,001715			0,004517	0,009235	0,0043	0,003487
CA-142		0,02028	0,03086	0,1954	0,003644	0,07463	0,006229	0,2609	0,002674	0,00817
CA-143		0,02932	0,01115	0,002972	0,002353	0,0186	0,01449	0,06917	0,006009	0,02691
CA-144		0,04163	0,04682	0,02063	0,3437	0,05252	0,08909	0,09687	0,03951	0,0188
CA-145		0,003156	0,002046				0,003646	0,00601	0,00267	0,008117
CA-149		6,692		1,228	4,657	aprox. 18,74	2,211	10,02	2,599	3,648
CA-155		0,2656	0,743		0,2926	0,1839	0,1899	0,6945	0,3736	0,2049
CA-157		0,008283	0,01041	0,001367	0,008761	0,5651	0,7224	0,08469	0,003114	0,007651
CA-158		2,209	10,36	aprox. 17,76	aprox. 36,89	3,81	2,623		2,07	1,524
CA-159		0,007067	0,003842		0,003769	0,001155	0,001525	0,00663	0,001758	
CA-162		0,05936	0,03304	0,003047	0,02429	0,06352	0,02211	0,3922	0,006071	0,007555

ES 2 972 584 T3

	Proteína	Glutatión	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2
	Posición de la cisteína	NA	WT	F80C	H71C	S276C	N272C	T182C	R122C	S181C
	Otras mutaciones		-	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A
Nombre del ligando										
CA-165-2		7,516	10,6	0,2398	3,767	aprox. 30,67		12,1	aprox. 38,45	0,9827
CA-167		0,02315	0,01101	0,00669	0,003628	0,008135	0,006256	0,04668	0,003155	0,00794
CA-170		0,07188	0,2972	0,9829	0,06628	0,05196	0,03358	0,3786	0,02508	0,03578
CA-171		0,00729	0,01128		0,003488	0,003794	0,007502	0,09852	0,00155	0,006213
CA-173		0,01565	0,007537	0,005323	0,002746	0,01857	0,01019	0,04347	0,005288	0,02111
CA-179		0,006802	0,007599	0,002671	0,007227	0,007953	0,002721	0,0479	0,004389	0,01774
CA-178		0,1581	0,1507	0,2499	0,8769	0,4669	0,5306	0,4599	0,2555	0,1409
CA-182		0,003007	0,003813		0,002021	0,001855	0,004691	0,02065	0,004115	0,009074
CA-183		0,0007893		1,536E-14			0,001349	0,0008805	0,001326	0,0007859
CA-184		0,02938	0,2235	0,06488	0,2251	0,6153	0,2113	0,3446	0,02228	0,3106
CA-187		0,04405	0,02811	0,01676	0,06414	0,08156	0,03139	0,2035	0,01967	0,00897
CA-190		0,01399	0,003469	0,005293		0,004934	0,003265	0,01138	0,007009	0,003565
CA-193		0,02785	0,02444	0,03952	0,05131	0,03841	0,02375	0,108	0,01697	0,01137
CA-194		0,004494	0,005049	0,004454		0,003434	0,0009551	0,04819	0,003275	0,003139
aprox.-196		0,003626	0,003735	0,001711		0,001518	0,003008	0,009935	0,002681	0,002753
aprox.-197		3,738	10,3	0,04547	2,974	0,2369	0,3767	1,244	0,4882	0,00915
CA-202		0,007805	0,009448	0,00203		0,002734	0,004999	0,01796	0,001773	0,008545
CA-203		0,01374	0,04586	0,05916	0,05046	0,05406	0,0379	0,1913	0,04516	0,122
CA-207		0,01696	0,006162	0,002354		0,00287	0,005695	0,01562	0,006109	0,003519
CA-211		0,00937	0,003681	0,002339		0,004395	0,02289	0,02043	0,003595	0,02341
CA-218		0,01283	0,03272	0,1527	0,01038	0,0278	0,004522	0,1279	0,008768	0,01432
CA-219		0,06668	0,2317	1,187	0,03732	0,08025	0,0558	0,6559	0,01159	0,03984
EL-1004		0,01811	0,06444	0,4042	0,03859	0,02319	0,007455	0,1284	0,01783	0,01697
EL-1007		0,02462	0,03473	0,02991	0,007199	0,03236	0,008386	0,06154	0,01687	0,01199
EL-1012		0,008054	0,005124	0,01378	0,002949	0,002288		0,0172	0,005312	0,006108

ES 2 972 584 T3

	Proteína	Glutatión	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2
	Posición de la cisteína	NA	WT	F80C	H71C	S276C	N272C	T182C	R122C	S181C
	Otras mutaciones		-	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A
Nombre del ligando										
EL-1050		0,002862	0,001657				0,0005105	0,001525		0,001472
EL-1051		0,004569	0,003025	0,0006296		0,005603	0,001691	0,003057	0,00156	0,002912
EL-1059		0,00648	0,002126	0,0008934	0,002376	0,004731	0,002106	0,00654	0,002315	0,006168
EL-1062		0,005063	0,006301	0,006191		0,0014	0,001556	0,0266	0,003068	0,007918
EL-1063		0,003394	0,002743	0,009353	0,003705	0,001905	0,003977	0,03082	0,002484	0,005297
EL-1064		0,01195	0,00589	0,01966	0,01034	0,01284	0,01262	0,02031	0,006914	0,01756
EL-1071		0,05081	0,433	3,073	0,3666	0,05538	0,03091	0,3945	0,01447	0,02559
EL-1074		0,01025	0,006082	0,004669	0,002542	0,004381	0,006635	0,01875	0,0033	0,002194
EL-1083		0,01092	0,0009768			0,005508	0,001714	0,00998	0,0005988	0,001672
EL-1084		0,004273	0,005012	7,515E-14		0,001759	0,002598	0,007812	0,0009787	0,0003879
EL-1098		0,01151	0,01063	0,008291	0,002978	0,0117	0,009773	0,02907	0,006443	0,00499
EL-1101		0,007427	0,003421	0,002538	0,006227	0,007413	0,005051	0,009691	0,002286	0,002941
EL-1109		0,008572	0,008316	0,01663	0,004838	0,007876	0,003319	0,04531	0,006219	0,01361
EL-1114		0,03014	0,07947	0,2784	0,1021	0,02403	0,001386	0,4929	0,007805	0,01188
EL-1121		0,02567	0,01328	0,01257	0,03901	0,0198	0,01425	0,03623	0,006872	0,02699
EL-1140		0,008126	0,00499	0,005854		0,001645	0,0009109	0,01087	0,003006	0,005455
EL-1134		0,004413	0,007099	0,01742	0,02042	0,006242	0,004938	0,06354	0,005054	0,007065
EL-1143		0,008837	0,03792	0,009355	0,002426	0,03045	0,01321	0,1517	0,002778	0,021
EL-1152		0,005936	0,007039	0,004844	0,003943	0,01203	0,001935	0,02276	0,004438	0,005678
EL-1153		0,002823	0,001028			7,68E-14	0,0128	0,001338	0,00274	0,002097
EL-1155		0,01124	0,004658	0,003532	0,00523	0,01513	0,01235	0,02393	0,006445	0,006043
EL-1156		0,01759	0,01873	0,01786	0,006834	0,02375	0,005976	0,07206	0,0121	0,01759
EL-1157		0,06726333	0,2006	0,03933	0,02618	0,07038	0,002862	0,1572	0,004819	0,01381
EL-1160		0,02865	0,01181	0,01348	0,02783	0,02201	0,0163	0,05729	0,007767	0,01342
EL-1164		0,007698	0,003662	0,002151		2,302E-14	0,0007233	0,001408		0,007559

ES 2 972 584 T3

	Proteína	Glutatión	Cdk2							
	Posición de la cisteína	NA	WT	F80C	H71C	S276C	N272C	T182C	R122C	S181C
	Otras mutaciones		-	C177A						
Nombre del ligando										
EL-1168		0,01334	0,009736	0,004166	0,01145	0,008034	0,008745	0,03904	0,004032	0,02323
EL-1170		0,002427	0,004821	0,001226		0,0007587	0,0008836	0,001391	0,0007379	0,002313
EL-1178		0,04821	0,1611	0,09345	0,02706	0,04503	0,008888	0,2419	0,02367	0,02566
EL-1176		0,0009643	0,0006931	0,002745	0,001174	0,00199	0,002431			0,0006332
EL-1183		0,006554	0,003762	0,01874	0,01195	0,005301	0,002748	0,01481	0,003828	0,005591
EL-1187		0,01328	0,00921	0,005875	0,005929	0,005321	0,00704	0,05839	0,001907	0,003834
EL-1174		0,004201	0,001449	0,01365	0,003601	0,003008		0,005783	0,002235	0,002125
CA-236		0,009189	0,001156	0,003744	0,001749	0,0006497	0,0009059	0,009576	0,001846	0,002114
BN-62		0,001539	0,002863	0,001062	3,908E-14	0,001184	0,001549	0,001045	0,0001923	1,74E-14
BN-346		0,004652	0,005514	0,0008792	0,0004445	0,0009323	0,001994	0,000862		0,001084
BN-80		0,02983	0,0419	0,03902	0,003721	0,01797	0,006181	0,1201	0,01649	0,0138
GC248		0,01493	0,01361	0,001799	0,009473	0,002781	0,01579	0,5214	0,01243	0,01548
CA-53		0,004301	0,000968	0,009547	0,005009	0,004301	0,006086	0,05877	0,004377	0,06402
CA-106		0,003956	0,002317			0,002984	0,01199	0,01571	0,001115	0,006686
CA-118		0,006004	0,0105	0,003604	0,001184	0,002454	0,3682		0,001844	0,02877
CA-152		8,003	3,498	1,27						7,297
CA-165-1		5,198	5,676	3,436						
CA-188		0,1987	0,55	0,5106	0,3055	0,007587	0,06304	0,3741	0,01775	0,04931
CA-192		0,01342	0,00584	0,001553	0,002926	0,001086	0,004987	0,006134	0,001825	0,00198
CA216		0,004286	0,01619	0,07999	0,004427	0,007064	0,01252	0,2557	0,001824	0,003795
CA-224		0,003765	0,001548	0,000611	0,003169	0,0006465	0,002107	0,004866		
BN-63		0,002052	0,002998	0,001168	6,534E-14	0,0008064	0,001026	0,001476		0,0009
BN-65		0,002366	0,001861	0,006255	0,001273	0,002789	0,002156	0,002061		0,001226
BN-66		0,001496	0,001459	0,003494	0,00113		0,002323	0,005204		0,001268
BN-78		0,007274	0,001157	0,001773		0,00118	0,003673	0,0009576	0,00174	0,0006548

ES 2 972 584 T3

	Proteína	Glutatión	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2
	Posición de la cisteína	NA	WT	F80C	H71C	S276C	N272C	T182C	R122C	S181C
	Otras mutaciones	-		C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A
Nombre del ligando										
BN122		0,005992	0,002191	0,002336		0,0009842	0,004448	0,01499	0,002587	0,005838
EN001		6,115	9,832	0,00407	2,131	3,146	2,432	8,524	1,352	0,4008
EN002			0,006451	0,2493	3,825E-14		0,00573	0,01298	0,0006932	0,001495
EN003			0,003627	0,01484		0,004134	0,002228	0,003946	0,0005805	0,002251
EN004		0,366	1,596	0,006096	0,1289	1,689	0,08895		0,04566	0,03286
EN005		0,002533	0,01562	0,002202	0,002158	0,03433		0,02869	0,001439	0,01491
EN006		0,002219	0,002918	1,724E-14	0,02873	0,1659	0,01282	0,07618	0,000912	0,01045
EN007				0,001332			0,001652	0,001386		
EN008				0,2076		6,908E-15	0,009116	0,005911		0,001089
EN009				0,02092	3,52E-14	0,005935		0,006898	0,0008504	0,004061
EN010		0,603	1,708	0,005192	0,06183	0,5747	0,1194	2,544	0,2291	0,1896
EN011		0,1325	0,08018		0,0114	0,1424	0,01938	0,06061	0,002863	0,01298
EN012		027	0,2933		0,009738	0,1594	0,02849	0,08536	0,00759	0,01809

Tabla 5: Aumento de la velocidad para cada ligando con cada Cdk2 mutante

	Cdk2	Cdk2							
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C	
Otras mutaciones	-	C177A	C177A						
Ligando									
CA-009	2,40372226	0,50293486	0,28360773	0,81861131	1,31796707	21,5748031	0,5793844	0,47072298	
CA-012	1,85466795	3,88835419	0,31703561	0,98517806	0,41886429	5,79980751	0,68970164	2,50433109	
CA-028	2,83494193	1,17536398	1,03500736	1,03975135	0,76116473	5,24619663	0,34745624	0,50662522	
CA-029	0,42260664	0,1235545	0,12663507	0,32720379	0,27194313	1,76587678	0,20327014	0,32981043	
CA-030	0,63897191	1,49432158	0,13173939	0,26569038	0,24088464	0,59569635	0,28959952	0,74775852	
CA-031	0,17655172	0,02876437	0	0,52942529	1,16896552	1,06264368	0,22103448	0,56143678	

ES 2 972 584 T3

	Cdk2	Cdk2							
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C	
Otras mutaciones	-	C177A							
Ligando									
CA-032/228	1,40525672	2,23166259	15,3606357	1,85146699	3,00672372	14,804401	1,53361858	1,04339853	
CA-034	1,0525176	1,27828912	1,74986465	2,71792095	0,7222523	10,146183	0,64158094	0,58581483	
CA-037	3,30804749	63,5883905	1,96372032	1,76319261	1,73878628	12,3021108	0,96965699	1,49538259	
CA-038	0,52175066	0	0,82537577	0,58275862	0,59204244	1,74447392	0,36914235	0,47152962	
CA-039	0,28019656	0	0	1,13955774	0,74987715	1,42506143	0,88894349	0,63341523	
CA-040/230	0,69146455	0,31016791	0,73344216	0,76539179	3,07602612	1,26772388	0,28498134	0,24696828	
CA-041	2,08136578	0	0,00720668	0,00640029	0,00858518	0,85543044	0,00395568	0,00575554	
CA-042	2,90977444	0,42870813	0,50642515	0,56356801	0,09535202	5,5468216	0,1215311	0,31872864	
CA-044	0,33071446	0	0	0,11155168	0	0,29032654	0,23017432	0,11341763	
CA-046	0,21042305	0,11630901	0,07112201	0,70692826	0,09294911	0,59503372	0,23973023	0,19865113	
CA-047	0,45528455	0,13065041	0	0,54642276	0,16650407	1,06341463	0,26284553	0,27658537	
CA-048	0,7117927	0,80222105	0,23310418	0,77895293	0,54415653	2,64463247	0,20232681	0,60285563	
CA-054	0,61627369	1,48196949	1,02311604	0,94983819	1,24757282	1,05917707	0,41978733	0,46971798	
CA-055	0,40659387	0	0,48593028	0,69718606	4,59050819	0,26211676	0,42881142	1,07349853	
CA-056	1,15040184	4,98392652	1,2543054	1,7761194	1,54764638	18,3524684	0,78185993	2,06888634	
CA-057	2,7008676	2,13919276	1,63636364	1,60618634	2,88532629	18,5137684	1,17615994	1,06903055	
CA-060	0,71428571		0	1,11152199	3,67652783	1,61930712	0,46749708	0,78123784	
CA-072	1,0850968	0,25664115	16,4565511	4,03647006	9,38766321	6,71769473	0,35029266	2,16704187	
CA-079	1,01810691	0,14084354	0,29979399	0,66485959	0,49159709	0,83660414	0,4828147	4,96042502	
CA-080/239	0,23172757	0,08363787	0	0,28853821	0,2755814	0,96511628	0,17300664	0,13770764	
CA-081/240	7,59948652	4,62130937	0,90415062	7,41121095	3,27642276	8,31407788	0,70988447	9,93581515	
CA-084	0,51861987	1,81082689	0,82093992	1,07852469	0,06817371	3,84830458	0,26936347	0,42581797	
CA-087	1,05910165	0,478487	35,5319149	0,7321513	0,30449173	6,46453901	0,31903073	0,64574468	
CA-088	0,30544427	0,12054443	0	0,43949666	0,56086287	0,90960452	0,46836158	0,19044684	
CA-089	4,33596248	1,90854828	3,47473886	3,06118098	4,34448945	16,7128544	0,46216159	0,57535707	
CA-091/238	0,29683667	0,10282763	0,19444803	0,93957392	0,37688832	2,00258231	0,69180116	1,13892834	

ES 2 972 584 T3

	Cdk2								
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C	
Otras mutaciones	-	C177A							
Ligando									
CA-092	3,15222595	0,10581618	2,68908569	6,52824318	7,16251795	6,48276687	2,26902824	0,91455242	
CA-093	0,25731523	1,27149321	0,57526395	1,32730015	0,42066365	4,07164404	0,31101056	0,7760181	
CA-096/146	0,30231111	1,64088889	0,88888889	1,27644444	0,89066667	10,32	0,71422222	12,9688889	
CA-097	0,1544013	0,18865623	0,15663753	0,81408823	0,58975402	1,44744867	0,34986786	0	
CA-098	0,94457455	0,59289617	0,80015613	3,19594067	6,69789227	4,76580796	0,34808743	0,8871975	
CA-099/153	1,36552049	0,16514366	0,29072068	2,2656618	2,39331135	2,03768252	2,42345737	1,4790391	
CA-129/235	0,25077768	0,18188472	0,03270814	1,68161025	0,39359561	0,88261665	0,92497713	0,22268984	
CA-141	0,38473918	0,09517203	0	0	0,25066593	0,51248613	0,23862375	0,19350721	
CA-142	1,52169625	9,63510848	0,17968442	3,67998028	0,3071499	12,8648915	0,13185404	0,40285996	
CA-143	0,38028649	0,10136426	0,08025239	0,63437926	0,49420191	2,35914052	0,20494543	0,91780355	
CA-144	1,12466971	0,49555609	8,25606534	1,2615902	2,14004324	2,3269277	0,94907519	0,45159741	
CA-145	0,64828897	0	0	0	1,15525982	1,90430925	0,8460076	2,57192649	
CA-149	0	0,18350269	0,69590556	0	0,3303945	1,49731022	0,38837418	0,54512851	
CA-155	2,79743976	0	1,10165663	0,69239458	0,71498494	2,61483434	1,40662651	0,77146084	
CA-157	1,25679102	0,16503682	1,05770856	68,2240734	87,2147773	10,2245563	0,37595074	0,92369914	
CA-158	4,68990493		0	1,72476234	1,18741512	0	0,9370756	0,68990493	
CA-159	0,5436536	0	0,5333239	0,16343569	0,21579171	0,93816329	0,24876185	0	
CA-162	0,55660377	0,05133086	0,40919811	1,07008086	0,37247305	6,60714286	0,10227426	0,12727426	
CA-165-2	1,41032464	0,03190527	0,50119745	0	0	1,60989888			0,13074774
CA-167	0,47559395	0,28898488	0,15671706	0,35140389	0,27023758	2,01641469	0,1362851	0,34298056	
CA-170	4,13466889	13,6741792	0,92209238	0,72287145	0,4671675	5,26711185	0,34891486	0,49777407	
CA-171	1,5473251	0	0,47846365	0,52043896	1,02908093	13,5144033	0,21262003	0,85226337	
CA-173	0,48159744	0,3401278	0,17546326	1,18658147	0,65111821	2,77763578	0,33789137	1,34888179	
CA-179	1,11717142	0,39267862	1,06248162	1,16921494	0,4000294	7,04204646	0,6452514	2,60805645	
CA-178	0,95319418	1,58064516	5,54648956	2,95319418	3,35610373	2,90891841	1,61606578	0,8912081	
CA-182	1,26804124	0	0,67209844	0,61689391	1,5600266	6,86730961	1,36847356	3,01762554	

ES 2 972 584 T3

	Cdk2	Cdk2							
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C	
Otras mutaciones	-	C177A							
Ligando									
CA-183	0	1,946E-11	0	0	1,70910934	1,11554542	1,67996959	0,99569239	
CA-184	7,60721579	2,20830497	7,66167461	20,9428182	7,19196732	11,7290674	0,75833901	10,5718176	
CA-187	0,63813848	0,38047673	1,45607264	1,85153235	0,71259932	4,61975028	0,44653802	0,20363224	
CA-190	0,24796283	0,37834167	0	0,35268049	0,23338099	0,81343817	0,50100071	0,25482487	
CA-193	0,87755835	1,41903052	1,84236984	1,37917415	0,85278276	3,87791741	0,60933573	0,40825853	
CA-194	1,123498	0,99109924	0	0,76412995	0,21252781	10,7231865	0,72874944	0,69848687	
aprox.-196	1,03006067	0,47186983	0	0,41864313	0,82956426	2,73993381	0,73938224	0,75923883	
aprox.-197	2,75548422	0,01216426	0,79561263	0,06337614	0,10077582	0,33279829	0,1306046	0,00244783	
CA-202	1,21050609	0,26008969	0	0,35028828	0,64048687	2,30108905	0,22716208	1,09481102	
CA-203	3,33770015	4,30567686	3,67248908	3,93449782	2,75836972	13,922853	3,286754	8,87918486	
CA-207	0,36332547	0,13879717	0	0,1692217	0,33579009	0,92099057	0,36020047	0,20748821	
CA-211	0,39284952	0,24962647	0	0,46905016	2,44290288	2,18036286	0,38367129	2,49839915	
CA-218	2,5502728	11,9017927	0,80904131	2,16679657	0,35245518	9,96882307	0,68339829	1,11613406	
CA-219	3,47480504	17,8014397	0,55968806	1,2035093	0,83683263	9,83653269	0,17381524	0,5974805	
EL-1004	3,55825511	22,3191607	2,13086692	1,28050801	0,41165102	7,09000552	0,98453893	0,93705135	
EL-1007	1,41064175	1,21486596	0,29240455	1,31437855	0,34061738	2,49959383	0,68521527	0,48700244	
EL-1012	0,63620561	1,71095108	0,36615346	0,28408244	0	2,1355848	0,65954805	0,75838093	
EL-1050	0,57896576	0	0	0	0,17837177	0,53284416	0	0,51432565	
EL-1051	0,66207047	0,13779821	0	1,22630773	0,37010287	0,6690742	0,34143139	0,63733859	
EL-1059	0,32808642	0,13787037	0,36666667	0,73009259	0,325	1,00925926	0,35725309	0,95185185	
EL-1062	1,24451906	1,22279281	0	0,2765159	0,30732767	5,25380209	0,60596484	1,56389492	
EL-1063	0,80819093	2,75574543	1,09163229	0,56128462	1,17177372	9,0807307	0,73187979	1,56069534	
EL-1064	0,49288703	1,64518828	0,86527197	1,07447699	1,05606695	1,69958159	0,57857741	1,46945607	
EL-1071	8,5219445	60,4802204	7,21511513	1,08994292	0,60834481	7,76421964	0,28478646	0,50364102	
EL-1074	0,59336585	0,4555122	0,248	0,42741463	0,64731707	1,82926829	0,32195122	0,21404878	
EL-1083	0,08945055	0	0	0,5043956	0,15695971	0,91391941	0,05483516	0,15311355	

ES 2 972 584 T3

	Cdk2	Cdk2							
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C	
Otras mutaciones	-	C177A							
Ligando									
EL-1084	1,17294641	1,7587E-11	0	0,41165458	0,60800374	1,82822373	0,22904283	0,09077931	
EL-1098	0,92354474	0,72033015	0,25873154	1,01650738	0,84908775	2,52562989	0,55977411	0,43353606	
EL-1101	0,46061667	0,34172613	0,83842736	0,99811499	0,68008617	1,30483371	0,30779588	0,39598761	
EL-1109	0,97013532	1,94003733	0,56439571	0,91880541	0,38719085	5,28581428	0,72550163	1,58772748	
EL-1114	2,63669542	9,23689449	3,38752488	0,79727936	0,0459854	16,3536828	0,2589582	0,39416058	
EL-1121	0,51733541	0,48967667	1,51967277	0,7713284	0,55512271	1,41137515	0,26770549	1,05142189	
EL-1140	0,61407827	0,72040364	0	0,20243662	0,11209697	1,33768152	0,3699237	0,67130199	
EL-1134	1,60865624	3,94742805	4,62723771	1,41445729	1,11896669	14,3983685	1,14525266	1,60095173	
EL-1143	4,291049	1,05861718	0,27452755	3,4457395	1,49485119	17,1664592	0,31436008	2,37637207	
EL-1152	1,18581536	0,81603774	0,66425202	2,02661725	0,32597709	3,83423181	0,74764151	0,95653639	
EL-1153	0,36415161	0	0	2,7205E-11	4,53418349	0,47396387	0,97059865	0,74282678	
EL-1155	0,41441281	0,31423488	0,46530249	1,34608541	1,09875445	2,12900356	0,57339858	0,53763345	
EL-1156	1,06480955	1,01534963	0,3885162	1,35019898	0,33973849	4,09664582	0,68789085	1	
EL-1157	2,98230834	0,58471678	0,38921651	1,0463353	0,04254918	2,33708311	0,07164379	0,20531245	
EL-1160	0,4122164	0,47050611	0,97137871	0,76823735	0,56893543	1,99965096	0,27109948	0,46841187	
EL-1164	0,47570798	0,27942323	0	2,9904E-12	0,09395947	0,18290465	0	0,98194336	
EL-1168	0,72983508	0,31229385	0,85832084	0,60224888	0,65554723	2,92653673	0,30224888	1,74137931	
EL-1170	1,98640297	0,50515039	0	0,31260816	0,36407087	0,57313556	0,30403791	0,95302843	
EL-1178	3,34163037	1,93839452	0,56129434	0,93403858	0,18436009	5,0176312	0,49097698	0,53225472	
EL-1176	0,71875972	2,84662449	1,21746344	2,06367313	2,52099969	0	0	0,65664212	
EL-1183	0,57400061	2,85932255	1,82331401	0,80881904	0,41928593	2,25968874	0,5840708	0,85306683	
EL-1187	0,6935241	0,44239458	0,44646084	0,40067771	0,53012048	4,39683735	0,1435994	0,28870482	
EL-1174	0,34491788	3,24922637	0,85717686	0,71602	0	1,37657701	0,53201619	0,50583194	
CA-236	0,12580259	0,40744368	0,19033627	0,0707041	0,09858526	1,04211557	0,20089237	0,23005768	
BN-62	1,8602989	0,69005848	2,5393E-11	0,76933073	1,00649773	0,67901235	0,12495127	1,1306E-11	
BN-346	1,18529665	0,18899398	0,0955503	0,20040843	0,42863285	0,18529665	0	0,23301806	

ES 2 972 584 T3

	Cdk2	Cdk2							
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C	
Otras mutaciones	-	C177A							
Ligando									
BN-80	1,40462622	1,30807911	0,12474019	0,60241368	0,20720751	4,02614817	0,5527992	0,46262152	
GC248	0,91158741	0,12049565	0,63449431	0,18626926	1,05760214	34,9229739	0,83255191	1,03683858	
CA-53	0,22506394	2,21971635	1,16461288	1	1,41501976	13,6642641	1,01767031	14,8849105	
CA-106	0,58569262	0	0	0,75429727	3,03083923	3,97118301	0,28185035	1,690091	
CA-118	1,74883411	0,60026649	0,19720187	0,40872751	61,3257828	0	0,30712858	4,79180546	
CA-152	0,43708609	0,15869049	0	0	0	0	0	0,91178308	
CA-165-1	1,09195845	0,66102347	0	0	0	0	0	0	
CA-188	2,76799195	2,56970307	1,53749371	0,03818319	0,3172622	1,8827378	0,08933065	0,24816306	
CA-192	0,43517139	0,1157228	0,21803279	0,08092399	0,37160954	0,45707899	0,13599106	0,14754098	
CA216	3,77741484	18,6630891	1,03289781	1,64815679	2,92113859	59,659356	0,42557163	0,88544097	
CA-224	0,41115538	0,1622842	0,84169987	0,17171315	0,55962815	1,29243028	0	0	
BN-63	1,46101365	0,56920078	3,1842E-11	0,39298246	0,5	0,71929825	0	0,43859649	
BN-65	0,78655959	2,64370245	0,53803888	1,17878276	0,9112426	0,87109045	0	0,51817413	
BN-66	0,97526738	2,3355615	0,75534759	0	1,55280749	3,47860963	0	0,84759358	
BN-78	0,15905966	0,24374484	0	0,16222161	0,50494913	0,13164696	0,23920814	0,09001925	
BN122	0,36565421	0,38985314	0	0,16425234	0,7423231	2,50166889	0,43174232	0,97429907	
EN001	1,60784955	0,00066558	0,34848733	0,51447261	0,39771055	1,3939493	0,22109567	0,06554374	
EN002	1,27589299	49,307103	7,5652E-12	0	1,13329202	2,56721299	0,13710262	0,29568439	
EN003	0,77778373	3,18232992	0	0,88650619	0,47777837	0,84619096	0,124484	0,48271056	
EN004	4,36065574	0,01665574	0,35218579	4,6147541	0,24303279	0	0,1247541	0,08978142	
EN005	6,16660087	0,86932491	0,8519542	13,5530991	0	11,3264903	0,56810107	5,88630083	
EN006	1,31500676	7,7693E-12	12,9472735	74,7634069	5,7773772	34,3307796	0,41099594	4,70932853	
EN007	0	0,91441648	0	0	0	0,95148741			
EN008	0	4,63981119	0	1,5439E-13	0,20374046	0,13210946	0	0,02433889	
EN009	0	3,2463972	5,4624E-12	0,92100227	0	1,07044206	0,13196636	0,63019211	
EN010	2,83250415	0,00861028	0,10253731	0,95306799	0,19800995	4,21890547	0,37993367	0,31442786	

	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2	Cdk2
	WT	F80C	H71C	S276C	N272	T182C	R122C	S181C
Otras mutaciones	-	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A	C177A
Ligando								
EN011	0,60513208	0	0,08603774	1,07471698	0,14626415	0,45743396	0,02160755	0,09796226
EN012	1,0862963	0	0,03606667	0,59037037	0,10551852	0,31614815	0,02811111	0,067

Ejemplo 4: Utilización de la media de varios tioles como tiol modelo

En el ejemplo 1 se calcularon los aumentos de velocidad en relación con el tiol de control, el glutatión. Los datos del ejemplo 3 demuestran que puede utilizarse como control una media de varios tioles diferentes.

- 5 Como ejemplo, se promedió la constante de velocidad para el candidato a ligando EL1157 en reacción con todas las construcciones de Cdk2 (excepto Cdk(WT)) y, a continuación, se comparó con la constante de velocidad con Cdk2(WT).

Tabla 6: Constantes de velocidad para el candidato a ligando EL1157 en reacción con diversas construcciones de Cdk2 comparadas con la constante de velocidad en reacción con Cdk2(WT)

Mutante	Constante de velocidad
k(Cdk2(F80C))	0,0393 h ⁻¹
k(Cdk2(H71C))	0,0261 h ⁻¹
k(Cdk2(S276C))	0,0704 h ⁻¹
k(Cdk2(N272C))	0,0029 h ⁻¹
k(Cdk2(T182C))	0,1572 h ⁻¹
k(Cdk2(R122C))	0,0048 h ⁻¹
k(Cdk2(S181C))	0,0138 h ⁻¹
k(media)	0,0449 h ⁻¹
k(Cdk2(WT))	0,2006 h ⁻¹
k(Cdk2(WT))/k(media)	4,46

10

Este valor de aumento de la velocidad utilizando un promedio de múltiples proteínas como tiol de control da una medida de la selectividad de los ligandos de acierto para la proteína diana.

Ejemplo 5

Como ejemplo de la determinación de k_2 y K_d para uno de los ligandos de acierto (CA37) identificados contra Cdk2(C177A, F80C), se calculó la constante de velocidad observada en concentraciones de candidato a ligando de 2, 1, 0,5, 0,35, 0,2, 0,1, 0,05 y 0,02 mM (véase la siguiente tabla 7). Las constantes de velocidad se calcularon como se describe en la sección de metodología de los ejemplos 1 y 2.

5 Tabla 7: Constantes de velocidad para diversas concentraciones de CA37 que se une a Cdk2(C177A, F80C)

[CA37] (mM)	k_{obs} (min ⁻¹)
2	0,005626
1	0,004177
0,5	0,002372
0,35	0,002029
0,2	0,001313
0,1	0,0006704
0,05	0,000271
0,02	0,00007107

Ajustando la ecuación hiperbólica a estos datos (figura 9) se obtiene $K_d = 1,2$ mM, $k_2 = 0,009427$ min⁻¹.

Ejemplo 6: Validación de un ligando de acierto

La espectrometría de masas y la cristalografía de rayos X se utilizaron para validar la unión de un ligando de acierto identificado por el presente procedimiento.

A partir del cribado de Cdk2(F80C, C177A), los inventores identificaron EL1071 como una molécula de acierto (aumento de la velocidad con respecto a GSH = 60,5). El marcaje se validó de forma cruzada mediante espectrometría de masas de la proteína intacta (que demostró que, tras 2 horas de incubación, Cdk2(F80C, C177A) estaba completamente monomodificada por EL1071) (en esta figura, Cdk2(AS) = Cdk2(F80C, C177A), 1 = EL1071), véase la figura 10(a)).

A continuación, el complejo resultante se digirió con tripsina y los péptidos resultantes se secuenciaron por espectrometría de masas en tandem, que confirmó que el sitio de modificación era F80C (figura 10(b)).

También se realizó un ensayo de cinasa que demostró que Cdk2(F80C, C177A) tiene una actividad comparable a Cdk2(WT) y que EL1071 inhibía completamente a Cdk2(F80C, C177A). De nuevo, 1-Cdk2 se refiere a Cdk2(F80C, C177A) marcado con EL1071 (figura 10(c)).

Por último, se cristalizó el complejo de EL1071-Cdk2(F80C, C177A) y se determinó la estructura mediante cristalografía de rayos X (figura 11). Esto confirma que el ligando se une al residuo de cisteína en F80C y bloquea el sitio activo de la proteína provocando la inhibición observada.

Referencias bibliográficas

- 25 1. Erlanson, D.A, Wells, J.A. y Braisted, A.C. 2004, Tethering: Fragment-Based Drug Discovery, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 33, 199-223.
2. Documento WO 2005/034840
3. Documento US 2002/0022233
4. Kathman, S.G., Xu, Z, y Statsyuk, A.V. 2014, A Fragment-Based Method to Discover Irreversible Covalent Inhibitors of Cysteine Proteases, J. Med. Chem., 57, 4969-4974.
- 30 5. Nonoo, R.H, Armstrong, A. y Mann, D.J. 2012, Kinetic Template-Guided Tethering of Fragments, Chem. Med. Chem., 7, 2082-2086.

6. Allen, C. E.; Curran, P. R.; Brearley, A. S.; Boissel, V.; Sviridenko, L.; Press, N. J.; Stonehouse, J. P.; Armstrong, A., 2015, Efficient and Facile Synthesis of Acrylamide Libraries for Protein-Guided Tethering, *Org. Lett.*, 17, 458-460.
- 5 7. Hong, V.; Kislyukhin, A. A.; Finn, M. G., 2009, Thiol-Selective Fluorogenic Probes for Labeling and Release, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131 (29), 9986-9994.
8. Yi L., Li H., Sun L., Liu L., Zhang C., Xi Z., 2009, A highly sensitive fluorescence probe for fast thiol-quantification assay of glutathione reductase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48(22):4034-4037.
9. Chen, X.; Zhou, Y.; Peng, X. y Juyoung, Y., 2010, Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols, *Chem. Soc. Rev.*, 39, 2120-2135.
- 10 10. Alzahrani, E.; Welham, K., 2014, Fabrication of a TCEP-immobilised monolithic silica microchip for reduction of disulphide bonds in proteins, *Anal. Methods*, 6, 558-568.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre una molécula diana y un candidato a ligando que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés, en el que el grupo tiol está cerca del sitio de unión de interés cuando está lo suficientemente cerca del sitio de unión de interés para permitir la formación de un enlace covalente entre el grupo tiol y un grupo funcional en el candidato a ligando, cuando el candidato a ligando se une al sitio de unión de interés;
- b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
- c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;
- d) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- e) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma; y
- f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa d):
- i) comprende poner en contacto una parte alícuota de la mezcla de reacción con el reactivo de cuantificación de tiol, en el que las etapas d) y e) se repiten una o más veces, y en el que, durante cada repetición, la etapa d) se lleva a cabo en uno o más puntos temporales diferentes durante la reacción; o
- ii) comprende poner en contacto toda la mezcla de reacción o una proporción sustancial de la misma con el reactivo de cuantificación de tiol, en el que las etapas a) a e) se repiten una o más veces, y en el que, durante cada repetición, la etapa d) se realiza en uno o más momentos diferentes de la reacción; o
- iii) se lleva a cabo en un único punto temporal durante la reacción y en el que la etapa f) comprende el cálculo de la conversión de la molécula diana en el conjugado de molécula diana-candidato a ligando en ese punto temporal, comprendiendo preferentemente además el cálculo de una aproximación de una constante de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la etapa f) comprende calcular una constante de velocidad para la formación del conjugado de molécula diana-ligando.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que:
- a) la molécula diana se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido, una nucleoproteína, un glucopéptido y una fosfoproteína; y/o
- b) el grupo tiol es suministrado por un residuo de cisteína; y/o
- c) el candidato a ligando es un fragmento, en el que el candidato a ligando es preferentemente un fragmento similar a un fármaco; y/o
- d) el grupo funcional es un electrófilo, en el que el electrófilo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en acrilamida, acrilato, α,β -cetona insaturada, vinilsulfonamidas, vinilsulfona, vinilsulfonato, α -derivados de carbonilo halogenados, tales como α -clorocetonas y α -cloroacetamidas, epóxidos, derivados de nitrilo, sustratos de S_NAr y derivados sustituidos de los mismos, o en el que el electrófilo es preferentemente un aceptor de Michael; y/o
- e) en el que el reactivo de cuantificación de tiol es un tinte reactivo a tiol.
- 45 5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula diana y el candidato a ligando se ponen en contacto en presencia de un agente reductor, en el que el agente reductor está preferentemente inmovilizado.
6. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior, que comprende además las etapas de:

- g) repetir las etapas a) a f) utilizando un tiol modelo en lugar de la molécula diana, para calcular la velocidad de reacción entre el tiol modelo y el candidato a ligando, utilizando el mismo candidato a ligando; y
- 5 h) calcular el aumento de velocidad para el candidato a ligando comparando la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando con la velocidad de reacción entre el tiol modelo y el candidato a ligando, en el que el tiol modelo es preferentemente glutatión.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, que comprende además las etapas de:
- i) determinar si el aumento de la velocidad para el candidato a ligando está por encima de un nivel umbral elegido, en el que un candidato a ligando con un aumento de la velocidad por encima de este nivel umbral se clasifica como ligando de acierto;
- 10 en el que el procedimiento preferentemente comprende además las etapas de:
- j) repetir las etapas a) a i) con uno o más candidatos a ligando adicionales;
 - o en el que los candidatos a ligando comprenden preferentemente un banco de candidatos a ligando.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además la etapa de: k) desarrollar un ligando de acierto para obtener un fármaco u otro inhibidor, en el que el grupo tiol es preferentemente endógeno a la molécula diana y, o bien:
- 15 a) el ligando de acierto se convierte en un inhibidor covalente irreversible; o
- b) el ligando de acierto se modifica para obtener un análogo no covalente y se convierte en un inhibidor reversible.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la molécula diana se ha modificado para comprender el grupo tiol, y el ligando de acierto se modifica para obtener un análogo no covalente y se desarrolla para obtener un inhibidor reversible.
- 20 10. Un procedimiento de medición de la velocidad de reacción entre un tiol y una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol que comprende las etapas de:
- 25 a) poner en contacto un tiol con una molécula capaz de reaccionar con dicho tiol para formar un producto de reacción en una mezcla de reacción;
- b) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- 30 c) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma; y
- d) calcular la velocidad de reacción entre el tiol y la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la etapa b):
- i) comprende poner en contacto una parte alícuota de la mezcla de reacción con el reactivo de cuantificación de tiol, en el que las etapas b) y c) se repiten una o más veces, y en el que, durante cada repetición, la etapa b) se lleva a cabo en uno o más puntos temporales diferentes durante la reacción; o
 - ii) comprende poner en contacto toda la mezcla de reacción o una proporción sustancial de la misma con el reactivo de cuantificación de tiol, en el que las etapas a) a c) se repiten una o más veces, y en el que, durante cada repetición, la etapa b) se realiza en uno o más momentos diferentes de la reacción; o
 - iii) se lleva a cabo en un único punto temporal durante la reacción y en el que la etapa d) comprende el cálculo de la conversión del tiol en el producto de reacción en dicho punto temporal, comprendiendo preferentemente además el cálculo de una aproximación de una constante de velocidad para la formación del producto de reacción.
- 35 40 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la etapa d) comprende calcular una constante de velocidad para la formación del producto de reacción.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que, en la etapa a), el tiol se pone en contacto con un agente reductor en paralelo con la molécula capaz de reaccionar con dicho tiol, eliminándose dicho agente reductor en la etapa b) antes de que la mezcla de reacción, o una parte alícuota de la misma, se ponga en contacto con un reactivo de cuantificación de tiol.

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el reactivo de cuantificación de tiol se une de forma irreversible al tiol.
15. Un procedimiento de medición de la constante de disociación entre una molécula diana y un candidato a ligando que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar una molécula diana que comprende un sitio de unión de interés y un grupo tiol dentro o cerca del sitio de unión de interés;
- b) poner en contacto la molécula diana con un candidato a ligando en una mezcla de reacción, en el que el candidato a ligando comprende un grupo funcional capaz de formar un enlace covalente irreversible con dicho grupo tiol;
- 10 c) formar un enlace covalente irreversible entre el grupo tiol de la molécula diana y el grupo funcional del candidato a ligando, formando así un conjugado de molécula diana-ligando;
- d) poner en contacto la mezcla de reacción o una parte alícuota de la misma con un reactivo de cuantificación de tiol en un momento definido durante la reacción, en el que el reactivo de cuantificación de tiol es capaz de unirse a grupos tiol libres para formar un conjugado de cuantificación que proporciona a la mezcla de reacción o a una parte alícuota de la misma una propiedad biofísica evaluable mediante un procedimiento biofísico;
- 15 e) medir la propiedad biofísica de la mezcla de reacción o de una parte alícuota de la misma;
- f) calcular la velocidad de reacción entre la molécula diana y el candidato a ligando;
- g) repetir las etapas a) a f) con múltiples concentraciones diferentes del candidato a ligando; y
- h) calcular la constante de disociación entre la molécula diana y el candidato a ligando.

20

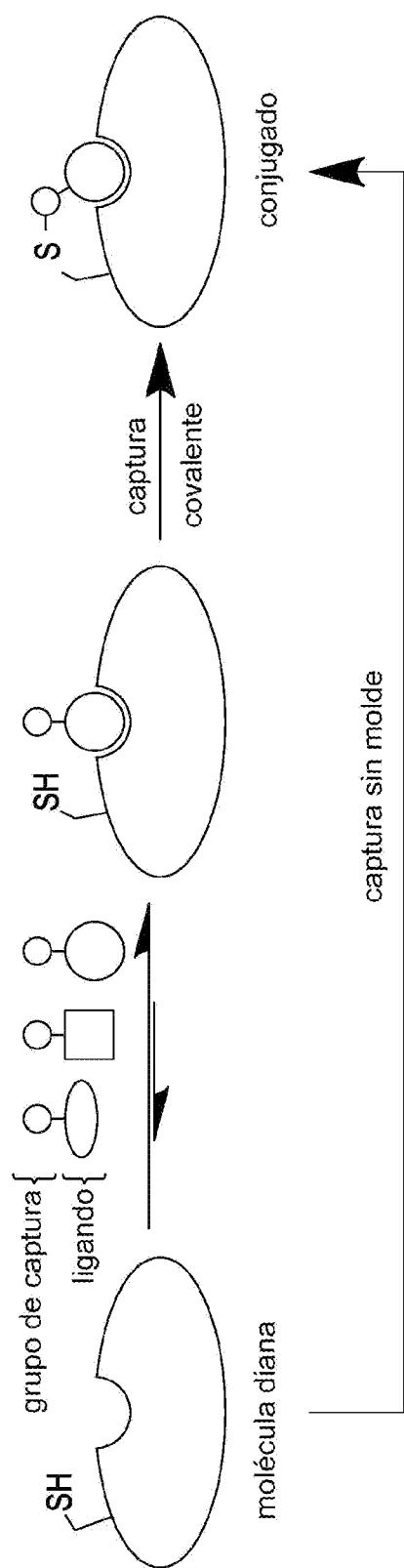


Fig. 1

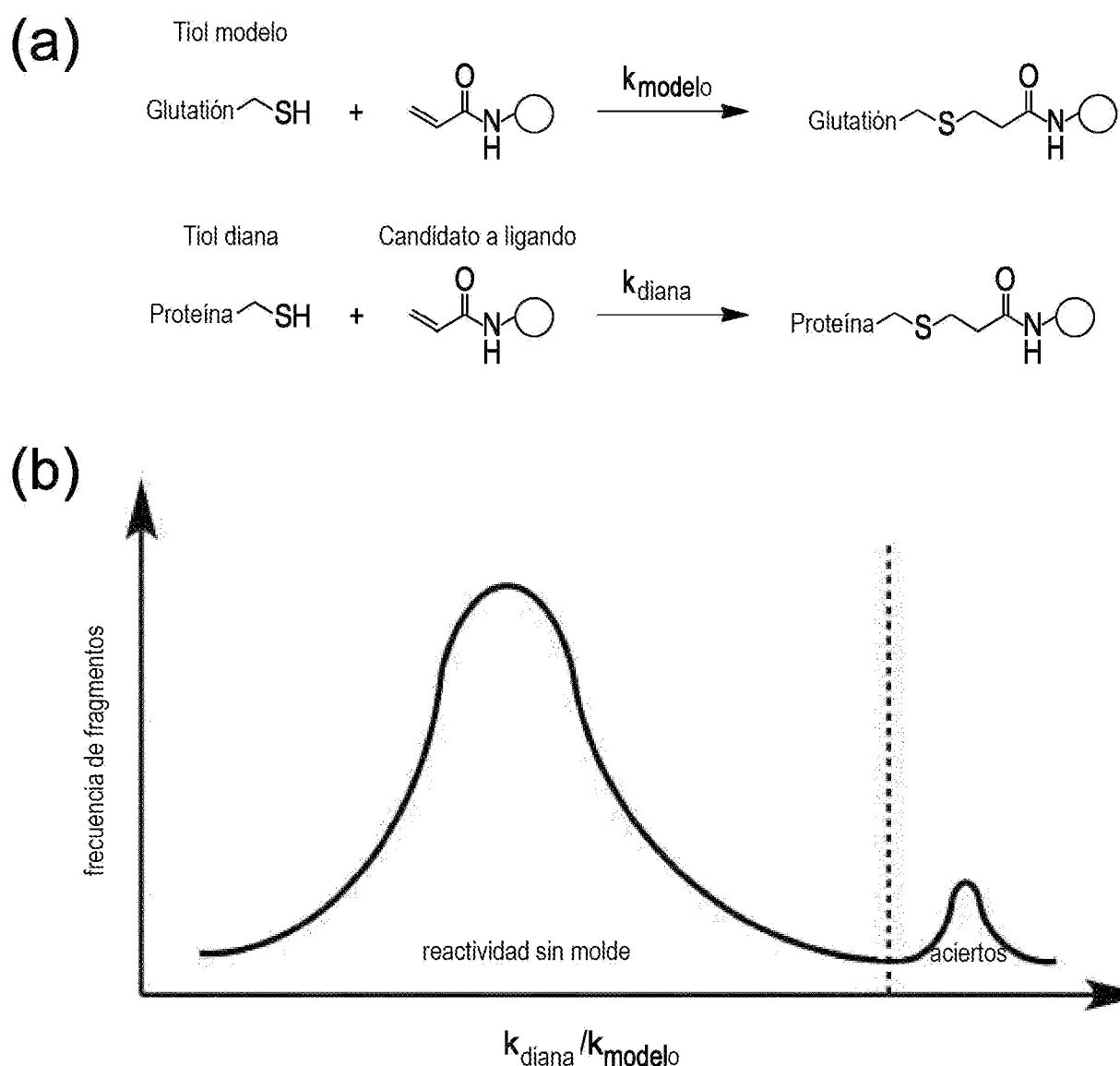
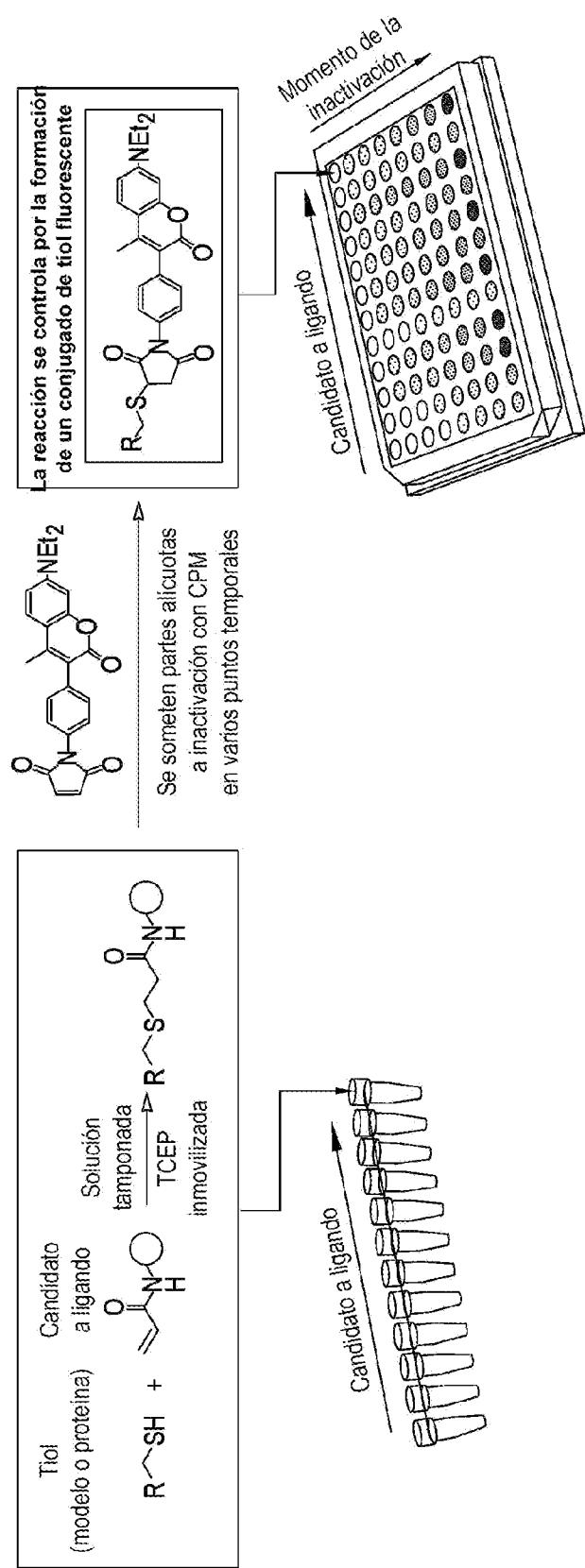


Fig. 2

**Fig. 3**

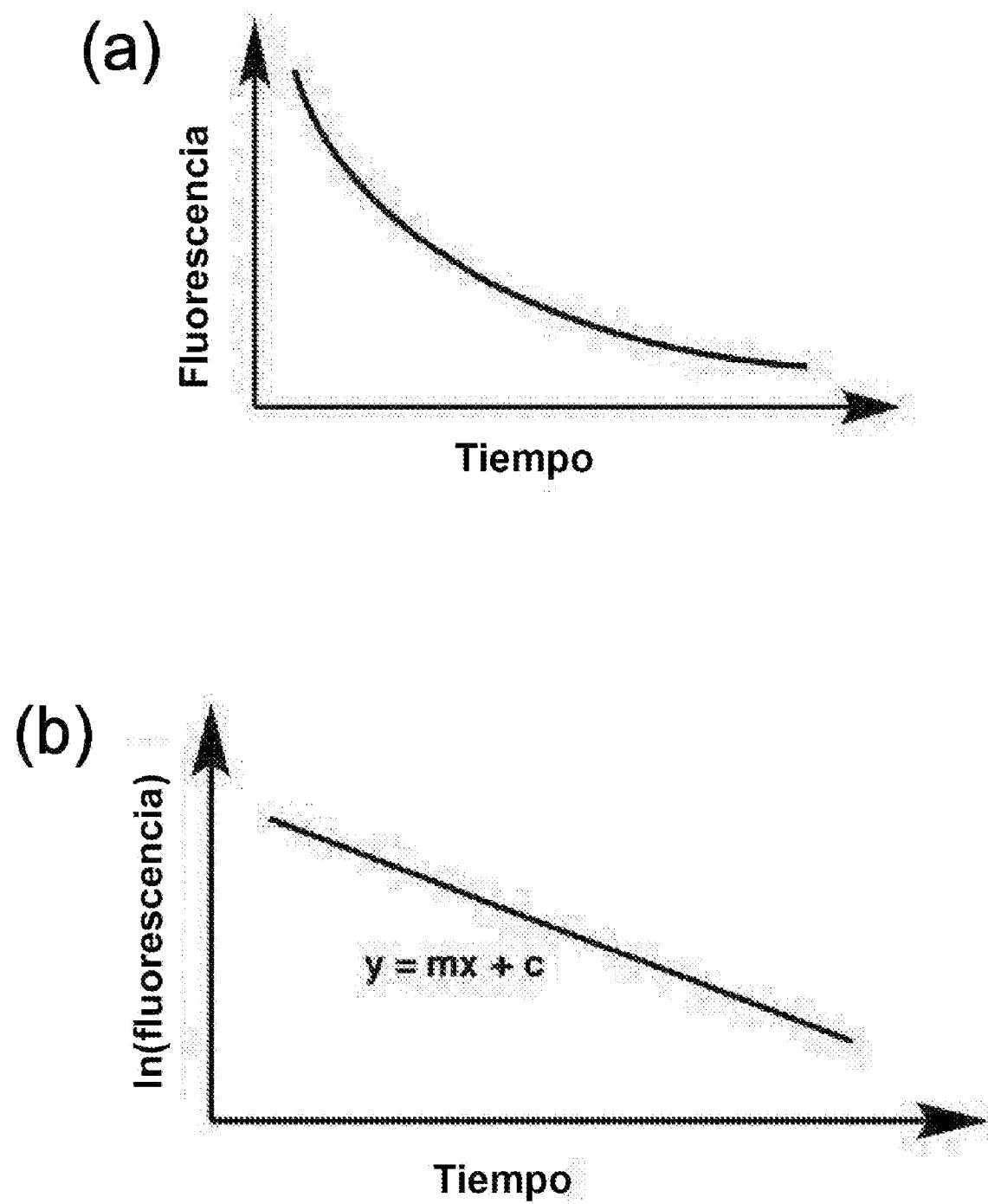


Fig. 4

Distibución de la velocidad normalizada

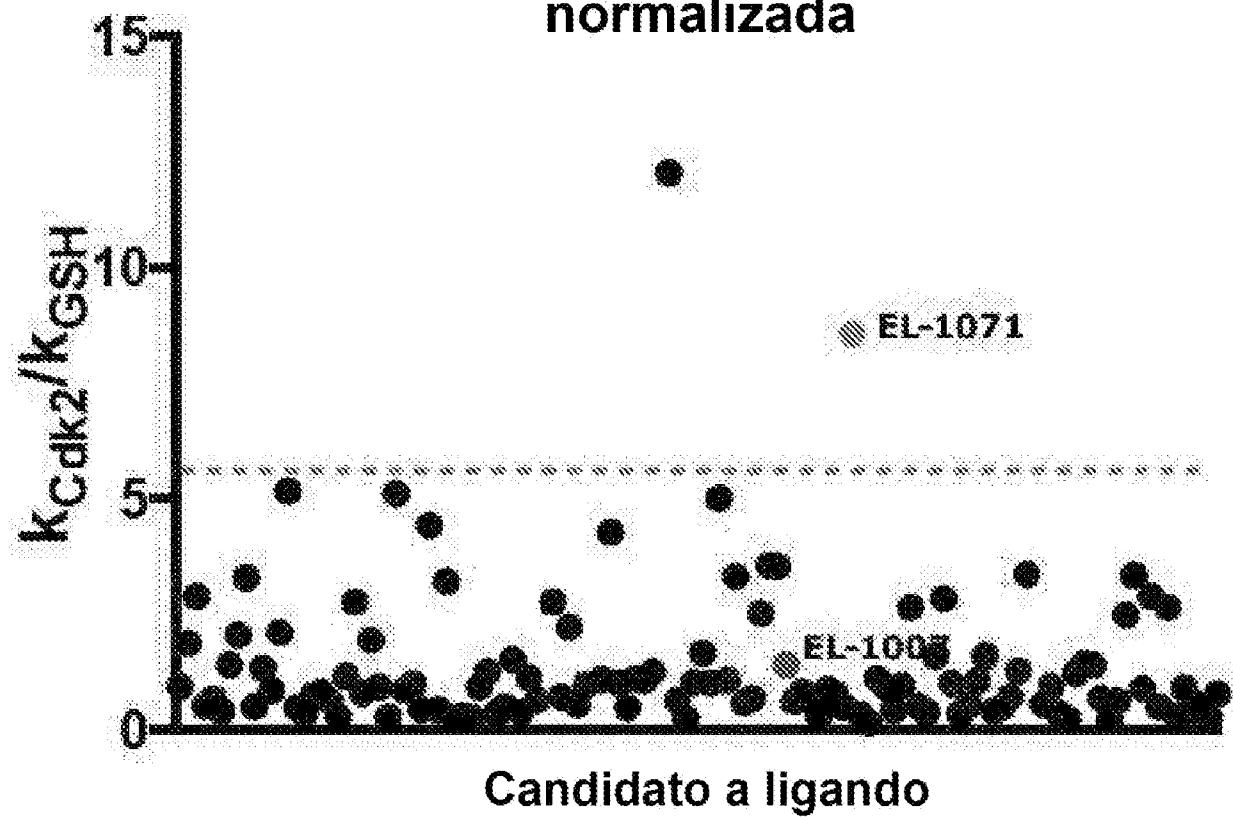
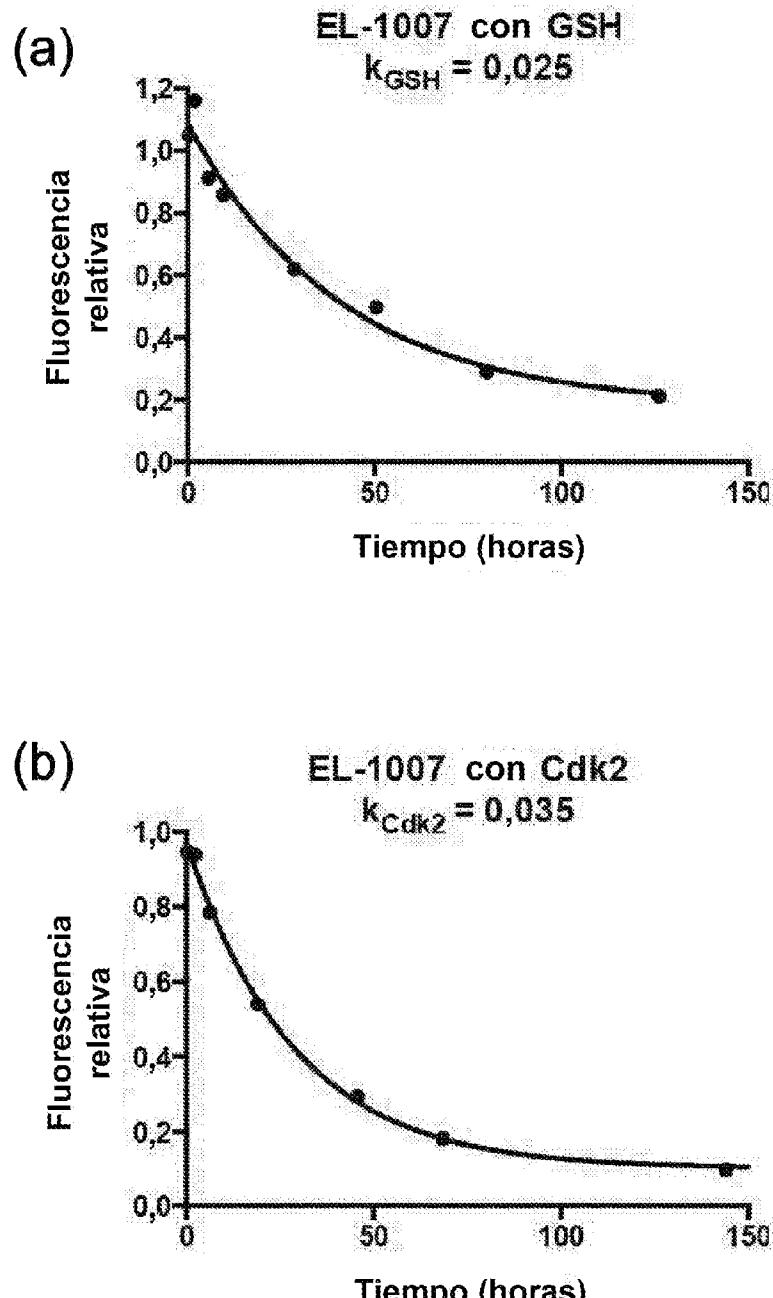


Fig. 5



$$k_{Cdk2}/k_{GSH} (\text{EL-1007}) = 1,4$$

Fig. 6

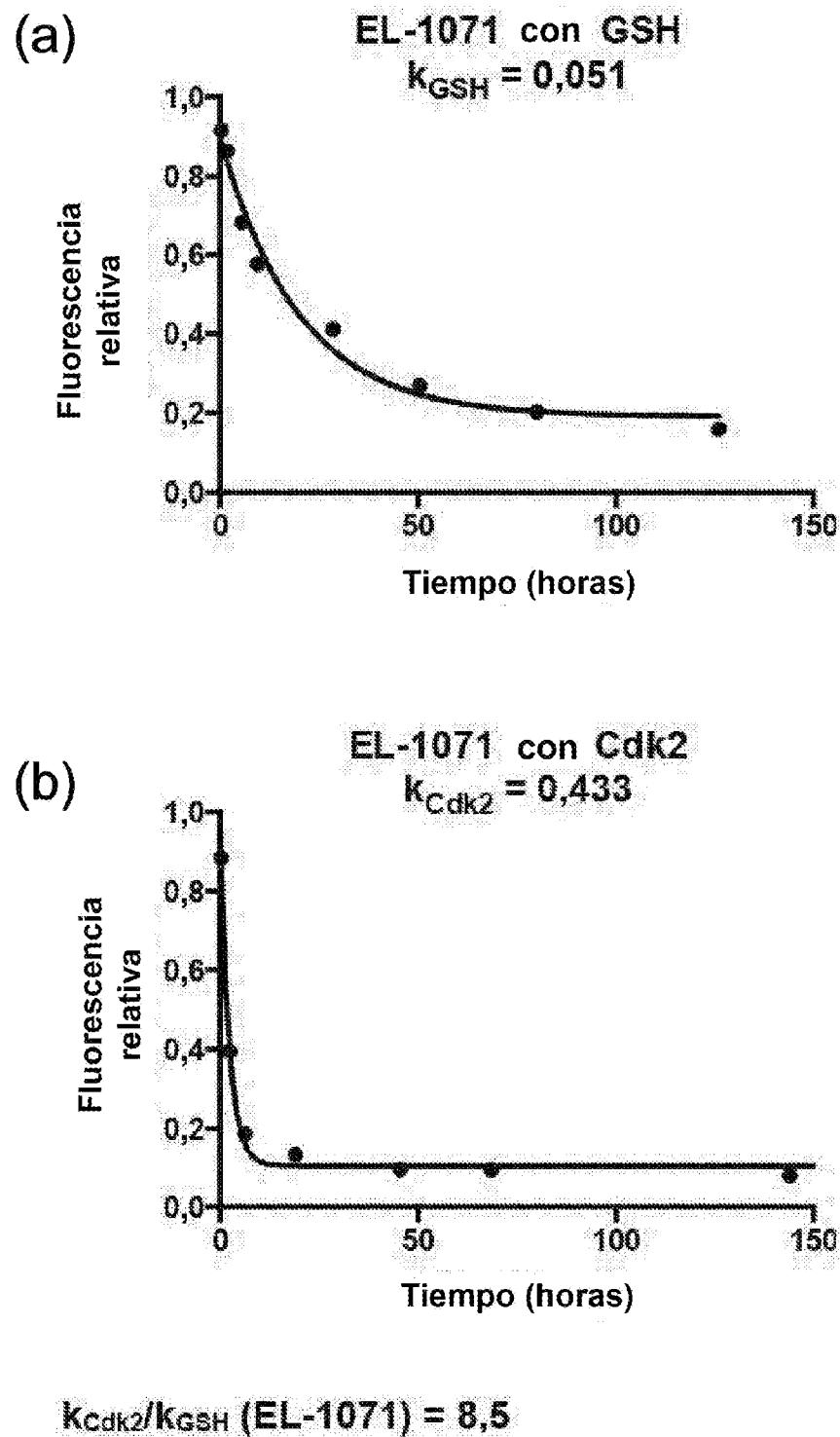


Fig. 7

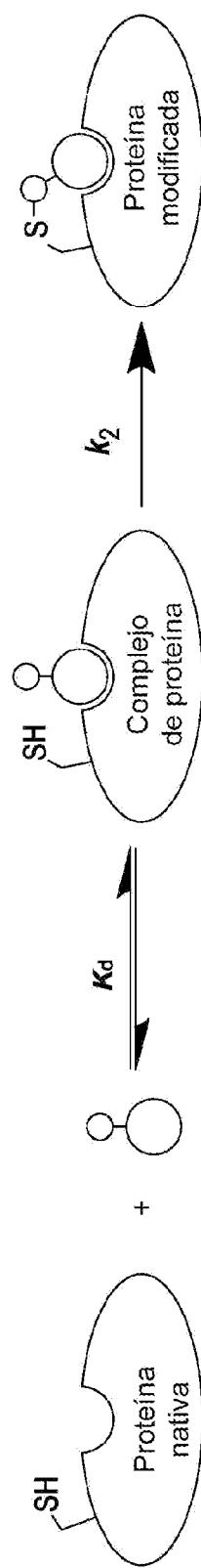


Fig. 8

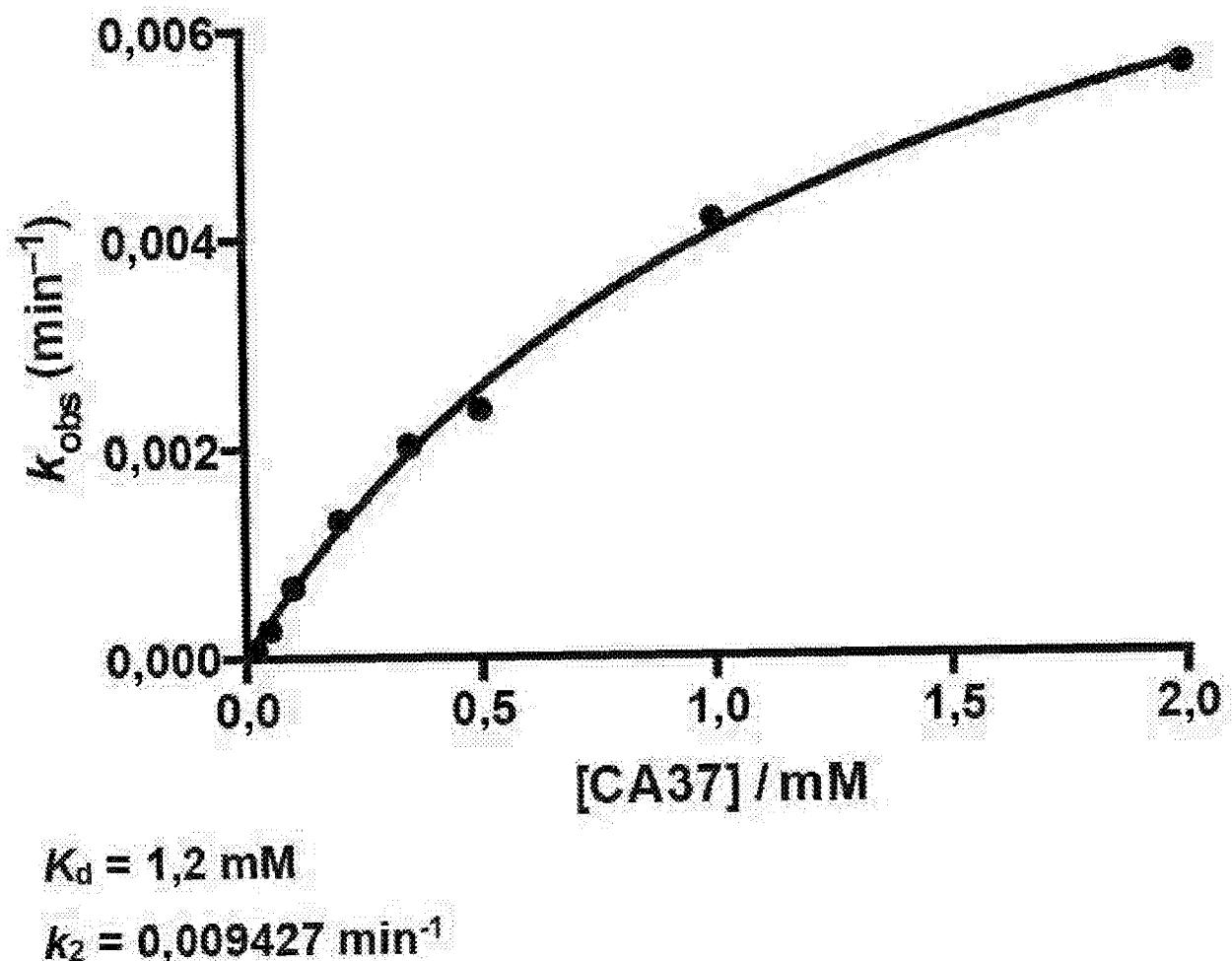


Fig. 9

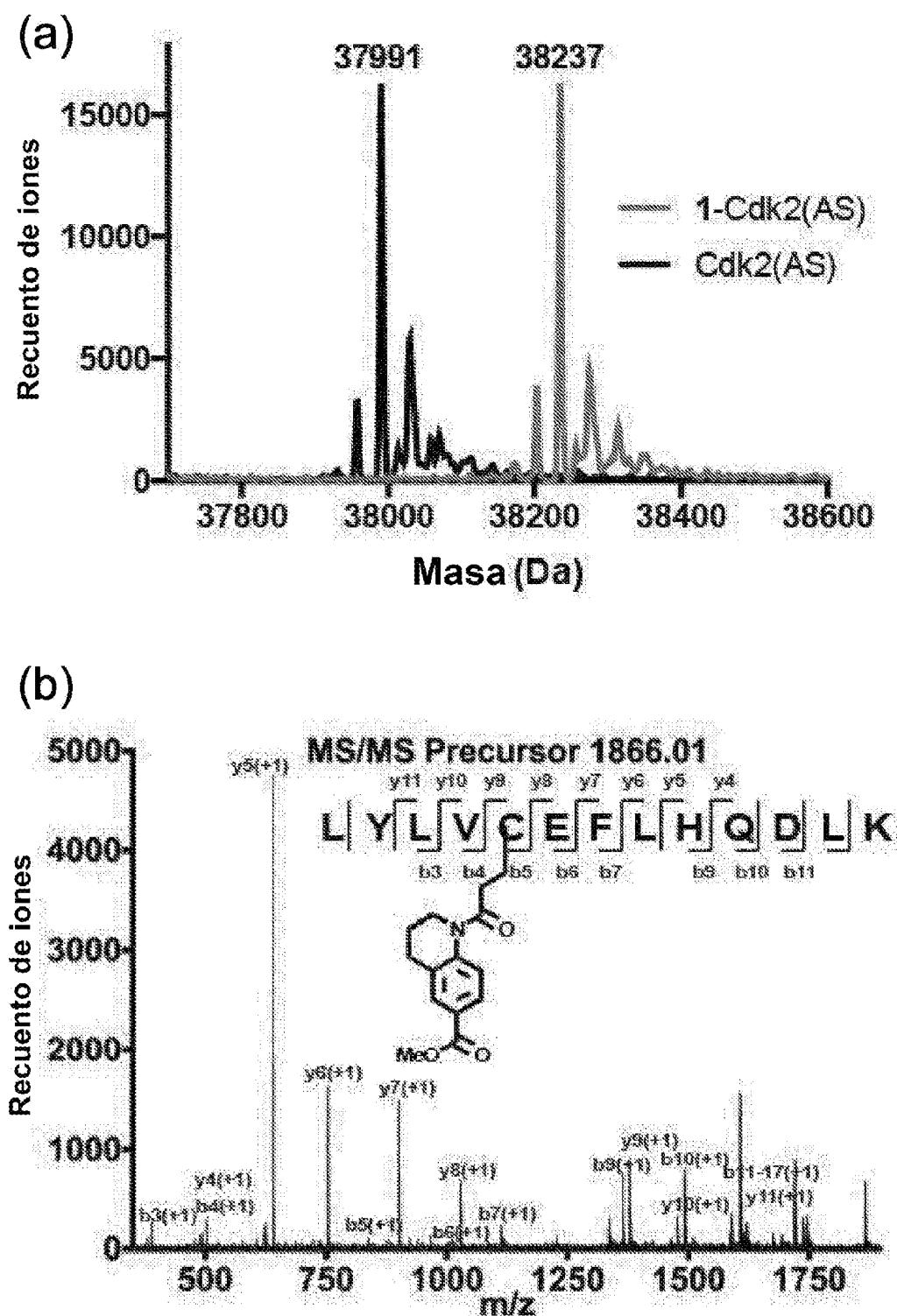


Fig. 10

(c)

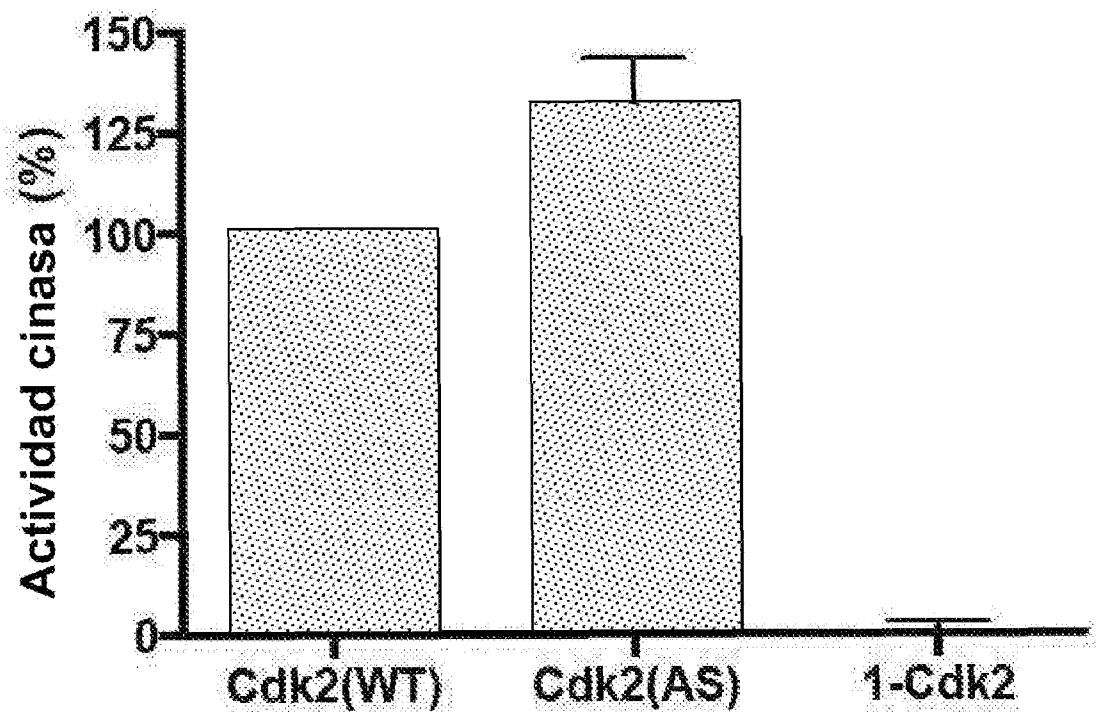


Fig. 10

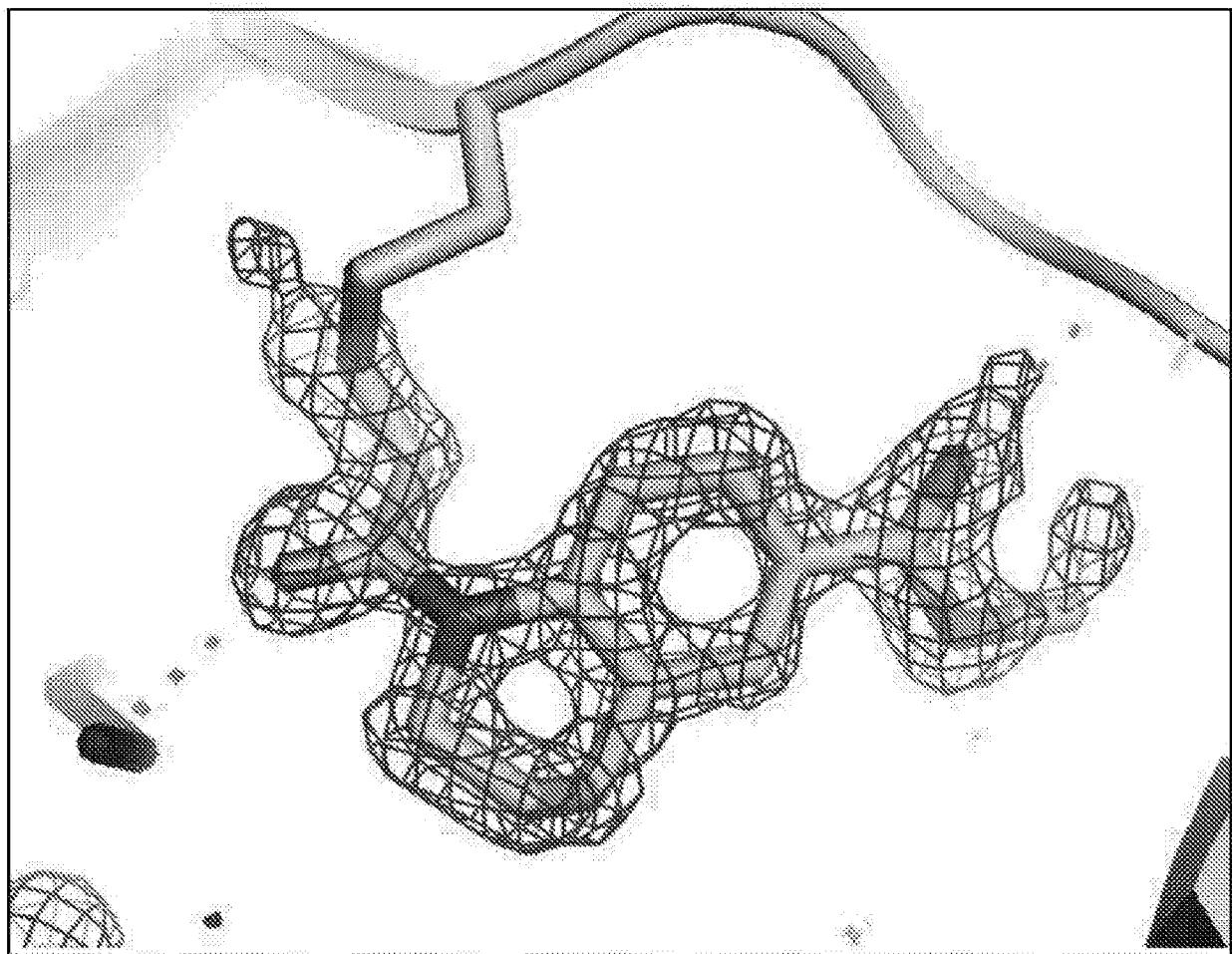


Fig. 11