

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 804**

51 Int. Cl.:

C07D 239/48 (2006.01)

C12N 11/06 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10715104 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2414337**

54 Título: **Métodos para la identificación de moléculas que interaccionan con cinasas y para la purificación de proteínas de cinasa**

30 Prioridad:

03.04.2009 EP 09004956

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

24.09.2013

73 Titular/es:

**CELLZOME GMBH (100.0%)
Meyerhofstrasse 1
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**RAMSDEN, NIGEL;
MAJOR, JEREMY;
HARRISON, JOHN;
LEGGATE, DANIEL y
GRANDI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 423 804 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la identificación de moléculas que interaccionan con cinasas y para la purificación de proteínas de cinasa

5 La presente invención se refiere a compuestos de inmovilización, a productos de inmovilización y a preparaciones de los mismos así como a métodos y usos para la identificación de compuestos que interaccionan con cinasas o para la purificación o identificación de proteínas de cinasa.

10 Las cinasas catalizan la fosforilación de proteínas, lípidos, azúcares, nucleósidos y otros metabolitos celulares y desempeñan papeles claves en todos los aspectos de la fisiología de células eucariotas. Especialmente, proteína cinasas y lípido cinasas participan en los acontecimientos de señalización que controlan la activación, el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de células en respuesta a mediadores o estímulos extracelulares tales como factores de crecimiento, citocinas o quimiocinas. En general, las proteína cinasas se clasifican en dos grupos, las que fosforilan preferentemente residuos de tirosina y las que fosforilan preferentemente residuos de serina y/o treonina.

20 Una actividad proteína cinasa inapropiadamente alta está implicada en muchas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades metabólicas y trastornos autoinmunitarios/inflamatorios. Esto puede estar provocado o bien directa o bien indirectamente por el fallo de mecanismos de control debido a mutación, sobreexpresión o activación inapropiada de la enzima. En todos estos casos, se espera que la inhibición selectiva de la cinasa tenga un efecto terapéutico beneficioso.

25 El complemento de proteína cinasas codificado en el genoma humano comprende 518 miembros de la familia (quinoma) que pueden agruparse en varias subfamilias según la similitud de secuencia (revisión: Manning *et al.*, 2002, The Protein Kinase Complement of the Human Genome, Science 298, 1912-1934). Se buscan inhibidores de cinasas de molécula pequeña como nuevos agentes terapéuticos anticancerígenos. La comprensión de la selectividad de un inhibidor de cinasa es crucial para el objetivo de desarrollar inhibidores selectivos para cinasas terapéuticamente relevantes (Zhang *et al.*, 2009. Nature Reviews Cancer 9, 28-39). El repertorio de cinasas seleccionadas como diana por un inhibidor dado puede determinarse obteniendo el perfil de su actividad en ensayos enzimáticos y de unión frente a paneles extensos de cinasas recombinantes, obteniendo el perfil de actividad en ensayos celulares y mediante enfoques de afinidad combinados con detección mediante espectrometría de masas.

35 Las cinasas también son dianas terapéuticas importantes para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios (Cohen, 2009. Current Opinion in Cell Biology 21, 1-8), por ejemplo las cinasas que están implicadas en la organización de las respuestas inmunitarias adaptativa e innata. Dianas de cinasas de particular interés son los miembros de la familia IRAK y NIK.

40 Las cinasas asociadas a receptores de interleucina-1 (IRAK) están implicadas de manera crítica en la regulación de redes de señalización intracelular que controlan la inflamación (Ringwood y Li, 2008. Cytokine 42, 1-7). Se expresan IRAK en muchos tipos de células y pueden mediar en señales de diversos receptores celulares incluyendo receptores tipo toll (TLR). Se cree que IRAK4 es la proteína cinasa inicial activada posteriormente al receptor de interleucina-1 (IL-1) y todos los receptores tipo toll (TLR) excepto TLR3, e inicia la señalización en el sistema inmunitario innato mediante la activación rápida de IRAK1 y la activación más lenta de IRAK2. Se identificó IRAK1 por primera vez a través de la purificación bioquímica de la actividad cinasa dependiente de IL-1 que se inmunoprecipita conjuntamente con el receptor tipo 1 de IL-1 (Cao *et al.*, 1996. Science 271(5252):1128-31). Se identificó IRAK2 mediante la búsqueda en la base de datos de etiquetas de secuencia expresada humana (EST) de secuencias homólogas a IRAK1 (Muzio *et al.*, 1997. Science 278(5343):1612-5). Se identificó IRAK3 (también denominada IRAKM) usando una secuencia de EST murina que codifica para un polipéptido con homología significativa a IRAK1 para explorar una biblioteca de ADNc de leucocitos de sangre periférica (PBL) activados por fitohemaglutinina humana (Wesche *et al.*, 1999. J. Biol. Chem. 274(27):19403-10). Se identificó IRAK4 mediante búsqueda en la base de datos de secuencias tipo IRAK y PCR de una biblioteca de ADNc universal (Li *et al.*, 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (8):5567-5572).

55 Ratones que expresan un mutante catalíticamente inactivo de IRAK4 en lugar de la cinasa de tipo natural son completamente resistentes al choque septicémico desencadenado por varios agonistas de TLR y su respuesta a IL-1 está alterada. Niños que carecen de actividad IRAK4 debido a un defecto genético padecen infecciones recurrentes por bacterias piógenas. Parece que TLR e IL-1R dependientes de IRAK son vitales para la inmunidad infantil contra algunas bacterias piógenas pero desempeñan un papel superfluo en la inmunidad protectora frente a la mayoría de las infecciones en adultos. Por tanto, los inhibidores de IRAK4 pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas en adultos sin hacerlos demasiado susceptibles a infecciones bacterianas y virales (Cohen, 2009. Current Opinion in Cell Biology 21, 1-8). Se han desarrollado potentes inhibidores de IRAK4 (Buckley *et al.*, 2008. Bioorg Med Chem Lett. 18 (12):3656-60). IRAK1 es esencial para la activación mediada por TLR7 y mediada por TLR9 de IRF7 y la producción de interferón-alfa (IFN- α) lo que sugiere que los inhibidores de IRAK1 pueden ser útiles para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES). IRAK2 se activa posteriormente a IRAK4 y desempeña un papel en la producción de citocinas proinflamatorias. Por tanto, los inhibidores de IRAK2

pueden ser útiles para enfermedades inflamatorias.

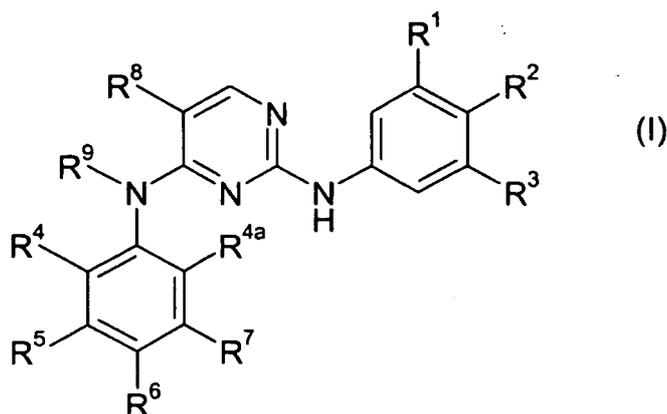
La cinasa inductora de NF-kappa-B (NIK) es una serina/treonina cinasa citoplasmática que activa NF-kappa-B principalmente a través de la ruta de NF-kappa-B no canónica (Malinin *et al.*, 1997. *Nature* 385(6616):540-544). La ruta de NF-kappa-B no canónica o alternativa se activa mediante varios ligandos de la familia de TNF que conducen a actividad y expresión elevada de NIK. Pruebas recientes sugieren que la activación constitutiva de la ruta de NF-kappa-B no canónica es una causa frecuente de mieloma múltiple (MM) y resulta de mutaciones inactivantes en TRAF3 y/o expresión elevada de NIK. La expresión potenciada de NIK puede estar provocada por la pérdida de TRAF3 o mutaciones en el propio gen de NIK (Annunziata *et al.*, 2007. *Cancer Cell* 12(2):115-130; Keats *et al.*, 2007. *Cancer Cell* 12(2):131-144). Por tanto, fármacos que inhiben NIK pueden ser útiles para el tratamiento de este cáncer del sistema inmunitario (Cohen, 2009. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 1-8).

Otro requisito previo, aunque no necesario en todos los casos, para la identificación de inhibidores de cinasas selectivos es un método que permite determinar la selectividad de diana de estas moléculas. Por ejemplo, puede pretenderse proporcionar moléculas que se unan a e inhiban una diana de fármaco particular pero que no interaccionen con una diana estrechamente relacionada, cuya inhibición podría llevar a efectos secundarios no deseados. Convencionalmente se usan grandes paneles de ensayos enzimáticos individuales para evaluar el efecto inhibitorio de un compuesto para cinasas (Davies *et al.*, 2000. *Biochemical Journal* 351(Pt 1):95-105; Bain *et al.*, 2007. *Biochemical Journal* 408(3):297-315). Más recientemente, se han empleado cinasas o dominios cinasa presentados en bacteriófagos para evaluar la capacidad de un compuesto dado para interaccionar con un conjunto grande de cinasas (Karaman *et al.*, 2008. *Nature Biotechnology* 26, 127-132). Además, se han descrito métodos proteómicos químicos que permiten la obtención del perfil de inhibidores de cinasas frente al proteoma (documento WO 2006/134056; Bantscheff *et al.*, 2007. *Nature Biotechnology* 25, 1035-1044; Patricelly *et al.*, 2007. *Biochemistry* 46, 350-358; Gharbi *et al.*, 2007. *Biochem. J.* 404, 15-21; documento WO2008/015013).

El documento WO 2007/053452 A1 da a conocer compuestos de biaril-meta-pirimidina que pueden inhibir cinasas, tales como miembros de la familia de Jak cinasa y diversas otras cinasas receptoras y no receptoras específicas. Sin embargo, este documento no está dirigido a productos de inmovilización que son útiles para la identificación de moléculas que interaccionan con cinasas incluyendo la purificación de proteínas de cinasa. Los compuestos de la presente invención difieren de los compuestos dados a conocer en el documento WO 2007/053452 A1 en que (i) contienen un grupo sulfonilamino en vez de un grupo aminosulfonilo y (ii) en que contienen un grupo amino primario en vez de un anillo de pirrolidina N-sustituída.

En vista de lo anterior, hay una necesidad de proporcionar herramientas y métodos eficaces para la identificación y la obtención del perfil de selectividad de compuestos que interaccionan con cinasas así como para la purificación de cinasas.

La presente invención se refiere entre otros a un compuesto de inmovilización de fórmula (I)



o una sal del mismo, en la que

uno de R^1 , R^2 , R^3 es $X-(CH_2)_n-NH_2$ y los otros dos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; halógeno; CN; $C(O)OR^{10}$; OR^{10} ; $C(O)R^{10}$; $C(O)N(R^{10}R^{10a})$; $S(O)_2N(R^{10}R^{10a})$; $S(O)N(R^{10}R^{10a})$; $S(O)_2R^{10}$; $S(O)R^{10}$; $N(R^{10})S(O)_2N(R^{10a}R^{10b})$; SR^{10} ; $N(R^{10}R^{10a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{10}$; $N(R^{10})C(O)R^{10a}$; $N(R^{10})S(O)_2R^{10a}$; $N(R^{10})S(O)R^{10a}$; $N(R^{10})C(O)N(R^{10a}R^{10b})$; $N(R^{10})C(O)OR^{10a}$; $OC(O)N(R^{10}R^{10a})$; alquilo C_{1-6} ; alquenilo C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenilo C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{11} , que son iguales o diferentes;

X es un enlace químico covalente sencillo; O; S; NH; $NHC(O)$ o $C(O)NH$;

n es 0; 1; 2; 3; 4; 5 ó 6, cuando X es un enlace químico covalente sencillo o NHC(O); y n es 2; 3; 4; 5 ó 6, cuando X es O; S; o C(O)NH;

5 R^{10} , R^{10a} , R^{10b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{12} , que son iguales o diferentes;

10 R^{11} , R^{12} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; C(O)OR¹³; OR¹³; C(O)R¹³; C(O)N(R^{13a}R^{13a}); S(O)₂N(R^{13a}R^{13a}); S(O)N(R^{13a}R^{13a}); S(O)₂R¹³; S(O)R¹³; N(R¹³)S(O)₂N(R^{13a}R^{13b}); N(R¹³)S(O)N(R^{13a}R^{13b}); SR¹³; N(R¹³R^{13a}); NO₂; OC(O)R¹³; N(R¹³)C(O)R^{13a}; N(R¹³)S(O)₂R^{13a}; N(R¹³)S(O)R^{13a}; N(R¹³)C(O)N(R^{13a}R^{13b}); N(R¹³)C(O)OR^{13a} y OC(O)N(R¹³R^{13a}).

15 R^{13} , R^{13a} , R^{13b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

20 R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^{4a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; X¹; halógeno; CN; C(O)OR¹⁴; OR¹⁴; C(O)R¹⁴; C(O)N(R^{14a}R^{14a}); S(O)₂N(R^{14a}R^{14a}); S(O)N(R^{14a}R^{14a}); S(O)₂R¹⁴; S(O)R¹⁴; SR¹⁴; N(R¹⁴R^{14a}); NO₂; OC(O)R¹⁴; N(R¹⁴)C(O)R^{14a}; N(R¹⁴)S(O)₂R^{14a}; N(R¹⁴)S(O)R^{14a}; N(R¹⁴)C(O)N(R^{14a}R^{14b}); N(R¹⁴)C(O)OR^{14a}; OC(O)N(R¹⁴R^{14a}); alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{15} , que son iguales o diferentes,

siempre que uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^{4a} sea X¹;

25 R^{14} , R^{14a} , R^{14b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{16} , que son iguales o diferentes;

30 R^{15} , R^{16} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; C(O)OR¹⁷; OR¹⁷; C(O)R¹⁷; C(O)N(R^{17a}R^{17a}); S(O)₂N(R^{17a}R^{17a}); S(O)N(R^{17a}R^{17a}); S(O)₂R¹⁷; S(O)R¹⁷; N(R¹⁷)S(O)₂N(R^{17a}R^{17b}); N(R¹⁷)S(O)N(R^{17a}R^{17b}); SR¹⁷; N(R¹⁷R^{17a}); NO₂; OC(O)R¹⁷; N(R¹⁷)C(O)R^{17a}; N(R¹⁷)S(O)₂R^{17a}; N(R¹⁷)S(O)R^{17a}; N(R¹⁷)C(O)N(R^{17a}R^{17b}); N(R¹⁷)C(O)OR^{17a}; OC(O)N(R¹⁷R^{17a}); alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

35 R^{17} , R^{17a} , R^{17b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

40 X¹ es N(R^{18a})S(O)₂R¹⁸ o N(R^{18a})S(O)₂N(R^{18b}R¹⁸);

45 R^9 , R^{18a} , R^{18b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; cicloalquilo C_{3-5} ; y (cicloalquil C_{3-5})-metilo, estando el alquilo C_{1-4} ; el cicloalquilo C_{3-5} y el (cicloalquil C_{3-5})-metilo opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R^{18} es T; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{19} , que son iguales o diferentes;

50 R^{19} es T; halógeno; CN; C(O)OR²⁰; OR²⁰; C(O)R²⁰; C(O)N(R^{20a}R^{20a}); S(O)₂N(R^{20a}R^{20a}); S(O)N(R^{20a}R^{20a}); S(O)₂R²⁰; S(O)R²⁰; N(R²⁰)S(O)₂N(R^{20a}R^{20b}); N(R²⁰)S(O)N(R^{20a}R^{20b}); SR²⁰; N(R²⁰R^{20a}); NO₂; OC(O)R²⁰; N(R²⁰)C(O)R^{20a}; N(R²⁰)S(O)₂R^{20a}; N(R²⁰)S(O)R^{20a}; N(R²⁰)C(O)N(R^{20a}R^{20b}); N(R²⁰)C(O)OR^{20a}; OC(O)N(R²⁰R^{20a}); alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

55 R^{20} , R^{20a} , R^{20b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

60 T es fenilo; cicloalquilo C_{3-7} ; o heterociclo de 4 a 7 miembros, estando T opcionalmente sustituido con uno o más de R^{21} , que son iguales o diferentes;

65 R^{21} es halógeno; CN; C(O)OR²²; OR²²; oxo (=O), estando el anillo al menos parcialmente saturado; C(O)R²²; C(O)N(R^{22a}R^{22a}); S(O)₂N(R^{22a}R^{22a}); S(O)N(R^{22a}R^{22a}); S(O)₂R²²; S(O)R²²; N(R²²)S(O)₂N(R^{22a}R^{22b}); N(R²²)S(O)N(R^{22a}R^{22b}); SR²²; N(R²²R^{22a}); NO₂; OC(O)R²²; N(R²²)C(O)R^{22a}; N(R²²)S(O)₂R^{22a}; N(R²²)S(O)R^{22a}; N(R²²)C(O)N(R^{22a}R^{22b}); N(R²²)C(O)OR^{22a}; OC(O)N(R²²R^{22a}); alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , estando el

alquilo C₁₋₆; el alqueno C₂₋₆ y el alquino C₂₋₆ opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R²², R^{22a}, R^{22b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C₁₋₆; alqueno C₂₋₆ y alquino C₂₋₆, estando el alquilo C₁₋₆; el alqueno C₂₋₆ y el alquino C₂₋₆ opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R⁸ es H; F; Cl; Br; CN; alquilo C₁₋₄; CH₂F; CHF₂; CF₃; OH; OCH₃; NO₂; NH₂; NHCH₃; N(CH₃)₂ o NO₂.

En el caso de que una variable o sustituyente pueda seleccionarse de un grupo de diferentes variantes y tal variable o sustituyente aparezca más de una vez, las respectivas variantes pueden ser iguales o diferentes.

Dentro del significado de la presente invención los términos se usan tal como sigue:

“Alquilo” significa una cadena hidrocarbonada saturada de cadena lineal o ramificada. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo puede reemplazarse por un sustituyente.

“Alqueno” significa una cadena hidrocarbonada de cadena lineal o ramificada, que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Cada hidrógeno de un carbono de alqueno puede reemplazarse por un sustituyente.

“Alquino” significa una cadena hidrocarbonada de cadena lineal o ramificada, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Cada hidrógeno de un carbono de alquino puede reemplazarse por un sustituyente.

“Alquilo C₁₋₄” significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 4 átomos de carbono, por ejemplo si está presente en el extremo de una molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, o por ejemplo -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -C(CH₂)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₄ puede reemplazarse por un sustituyente.

“Alquilo C₁₋₆” significa una cadena de alquilo que tiene 1 - 6 átomos de carbono, por ejemplo si está presente en el extremo de una molécula: alquilo C₁₋₄, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, o por ejemplo -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C₁₋₆ puede reemplazarse por un sustituyente.

“Alqueno C₂₋₆” significa una cadena de alqueno que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, por ejemplo si está presente en el extremo de una molécula: -CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, o por ejemplo -CH=CH-, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alqueno. Cada hidrógeno de un carbono de alqueno C₂₋₆ puede reemplazarse por un sustituyente.

“Alquino C₂₋₆” significa una cadena de alquino que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, por ejemplo si está presente en el extremo de una molécula: -C≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃, o por ejemplo -C≡C- cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquino. Cada hidrógeno de un carbono de alquino C₂₋₆ puede reemplazarse por un sustituyente.

“Cicloalquilo C₃₋₇” o “anillo de cicloalquilo C₃₋₇” significa una cadena de alquilo cíclica que tiene 3 - 7 átomos de carbono, por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo. Cada hidrógeno de un carbono de cicloalquilo puede reemplazarse por un sustituyente. Por consiguiente, “cicloalquilo C₃₋₅” significa un cicloalquilo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

“Halógeno” significa flúor, cloro, bromo o yodo. Generalmente se prefiere que el halógeno sea flúor o cloro.

“Heterociclilo de 4 a 7 miembros” o “heterociclo de 4 a 7 miembros” significa un anillo con 4, 5, 6 ó 7 átomos de anillo que puede contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está completa, parcialmente saturado o insaturado) en el que al menos un átomo de anillo hasta 4 átomos de anillo se reemplazan por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluyendo =N(O)-) y en el que el anillo se une al resto de la molécula mediante un átomo de carbono o de nitrógeno. Ejemplos de heterociclos de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tetano, furano, tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahydrofurano, tetrahydrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahydropirano, imidazolidina, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepano, azepina u homopiperazina.

Los compuestos de inmovilización reivindicados en la presente invención se han denominado “compuestos de inmovilización” debido a su uso preferido en la preparación de productos de inmovilización tal como se describe a

continuación. Sin embargo, otros posibles usos, por ejemplo como competidor soluble en ensayos o como sonda marcada, se incluyen también de manera explícita dentro de la presente invención.

5 En el caso de que los compuestos de inmovilización según la fórmula (I) contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también comprende sus sales correspondientes. Por tanto, los compuestos de inmovilización de fórmula (I) que contienen grupos ácidos pueden usarse según la invención, por ejemplo, como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o como sales de amonio. Los ejemplos más precisos de tales sales incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoníaco o aminas orgánicas tales como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los compuestos de inmovilización de fórmula (I) que contienen uno o más grupos básicos, es decir, grupos que pueden protonarse, pueden estar presentes y pueden usarse según la invención en forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido pivalico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico y otros ácidos conocidos por el experto en la técnica. Si los compuestos de inmovilización de fórmula (I) contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas de sal mencionadas, sales internas o betaínas (zwitteriones). Las respectivas sales según la fórmula (I) pueden obtenerse mediante métodos habituales que conoce el experto en la técnica como, por ejemplo, poniendo en contacto éstas con una base o un ácido orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante o mediante intercambio iónico o intercambio catiónico con otras sales.

25 La presente invención incluye además todos los solvatos de los compuestos de inmovilización según la invención.

Tal y como puede observarse a partir de los ejemplos, se ha mostrado que los compuestos de inmovilización que se encuentran dentro de la fórmula (I) se unen a cinasas, lo que los convierte en herramientas útiles en el contexto de ensayos para la identificación de compuestos que interactúan con cinasas.

30 Los compuestos de inmovilización de fórmula (I) preferidos son los compuestos de inmovilización en los que uno o más de los residuos contenidos en los mismos tienen los significados indicados a continuación, siendo un objeto de la presente invención todas las combinaciones de definiciones de sustituyentes preferidos. Con respecto a todos los compuestos de inmovilización preferidos de las fórmulas (I), la presente invención también incluye todas las formas tautoméricas y estereoisoméricas y mezclas de las mismas en todas las razones.

35 En realizaciones preferidas de la presente invención, los sustituyentes mencionados a continuación tienen independientemente el siguiente significado. Por tanto, uno o más de estos sustituyentes pueden tener los significados preferidos o más preferidos indicados a continuación.

40 Preferiblemente, uno de R^1 , R^2 , R^3 es $X-(CH_2)_n-NH_2$ y los otros dos son H.

Preferiblemente, X es O.

Preferiblemente, n es 2.

45 Preferiblemente, uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^{4a} es X^1 y los otros son H.

Preferiblemente, R^{4a} es X^1 .

50 Preferiblemente, X^1 es $N(R^{18a})S(O)_2R^{18}$.

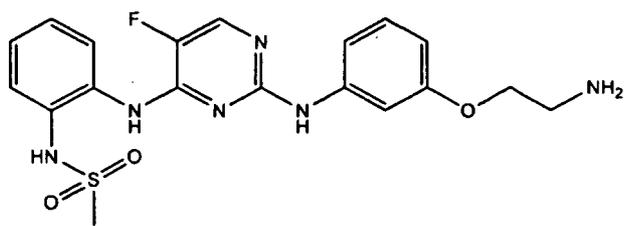
Preferiblemente, R^{18a} , R^{18b} , R^9 son H.

Preferiblemente, R^{18} es alquilo C_{1-6} ; más preferiblemente, metilo.

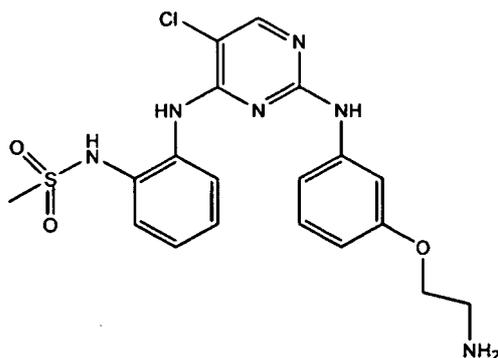
55 Preferiblemente, R^8 es H; o halógeno; más preferiblemente, H; F o Cl; incluso más preferiblemente F o Cl.

Se seleccionan compuestos de inmovilización preferidos de fórmula (I) de la presente invención del grupo que consiste en

60



y



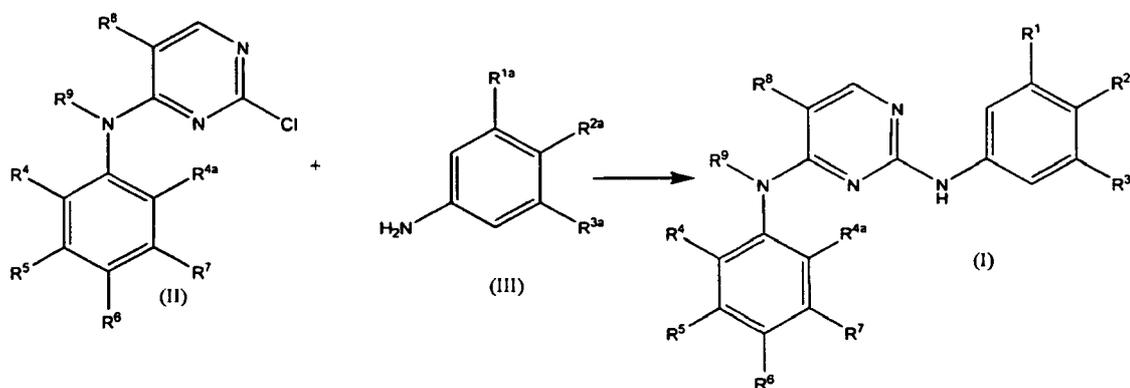
5

o una mezcla de ambos.

Los compuestos de inmovilización de la presente invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Se describen rutas análogas a modo de ejemplo para la síntesis en, por ejemplo, el documento WO-A 2005/016894.

Se muestra una ruta general para la síntesis de compuestos de inmovilización de la presente invención en el esquema 1.

15

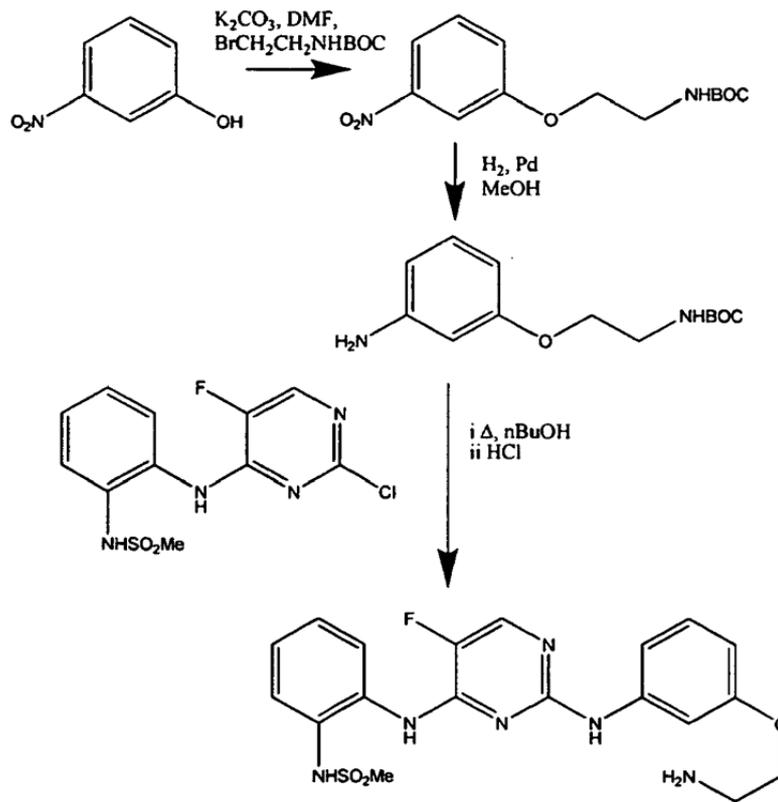


Esquema 1

Por consiguiente, pueden hacerse reaccionar compuestos de fórmula (II) y (III) a temperatura elevada y después de eso tratarse con un ácido apropiado para desproteger la función amino primaria del residuo $X(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ para proporcionar compuestos de fórmula (I), en los que $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{R}^{4a}, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9$ tienen el significado tal como de indicó anteriormente y uno de $\text{R}^{1a}, \text{R}^{2a}, \text{R}^{3a}$ es $X(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(\text{O})\text{O}^t\text{Bu}$ y los otros se definen como residuos correspondientes de $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3$.

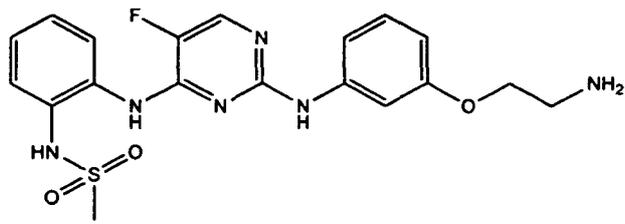
25

A modo de ejemplo, se muestra en el esquema 2 un compuesto de fórmula (I), en la que $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^4, \text{R}^5, \text{R}^6, \text{R}^7, \text{R}^8, \text{R}^9$ son H; R^8 es F; R^{3a} es $X(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(\text{O})\text{O}^t\text{Bu}$, en el que n es 2 y X es O; y R^{4a} es $\text{NHS}(\text{O})_2\text{CH}_3$ (DMF = N,N-dimetilformamida, Me = metilo, Bu = butilo, BOC = terc-butiloxicarbonilo).



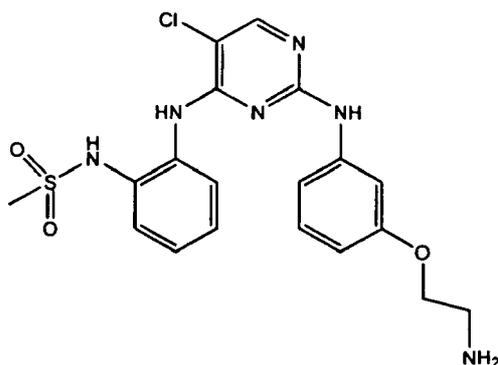
Esquema 2

- 5 La invención se refiere además a un método para la preparación de un producto de inmovilización, en el que al menos un compuesto de inmovilización según la invención se inmoviliza sobre un soporte sólido. Tales productos de inmovilización que pueden obtenerse según el método de la invención son, por ejemplo, útiles en los métodos de la invención para la identificación de compuestos que interaccionan con cinasas o en métodos de diagnóstico para el diagnóstico de enfermedades mieloproliferativas.
- 10 Según el método de la invención, al menos un compuesto de inmovilización de la invención se inmoviliza sobre un soporte sólido. A lo largo de la invención, el término “soporte sólido” se refiere a todo soporte no disuelto que puede inmovilizar un ligando de molécula pequeña sobre su superficie.
- 15 Según la invención, el término “al menos un compuesto de inmovilización” significa o bien que al menos un compuesto de inmovilización del mismo tipo se inmoviliza sobre el soporte sólido o bien que uno o más compuestos de inmovilización diferentes (cada uno de ellos o bien en singular o bien en plural) pueden inmovilizarse sobre el soporte sólido. Preferiblemente, se inmovilizan uno o dos compuestos de inmovilización diferentes sobre el soporte sólido, más preferiblemente se inmovilizan los compuestos de inmovilización preferidos de fórmula (I) de la presente invención seleccionados del grupo que consiste en
- 20



;

25 y



El soporte sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de Sepharose (por ejemplo Sepharose activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas.

5

En el caso de que el soporte sólido sea un material que comprende diversas entidades, por ejemplo en el caso de que el soporte sólido comprenda varias perlas o partículas, se prevé dentro de la presente invención que, si se inmovilizan diferentes compuestos de inmovilización sobre cada entidad individual, por ejemplo cada perla o partícula, se inmovilicen uno o más compuestos de inmovilización diferentes. Por tanto, en el caso de que se usen dos compuestos de inmovilización, se prevé dentro de la presente invención que sobre cada entidad individual se inmovilicen uno o dos compuestos de inmovilización diferentes. Si no se toman medidas para que sobre una entidad sólo se inmovilice un compuesto de inmovilización diferente, es muy probable que sobre cada entidad estén presentes todos los compuestos de inmovilización diferentes.

10

15

El compuesto o compuestos de inmovilización de la invención pueden acoplarse al soporte sólido o bien covalentemente o bien no covalentemente. La unión no covalente incluye unión mediante ligandos de afinidad por biotina que se unen a matrices de estreptavidina.

20

Preferiblemente, el compuesto o compuestos de inmovilización se acoplan covalentemente al soporte sólido.

20

En la técnica se conocen métodos para inmovilizar compuestos sobre soportes sólidos y se muestran a modo de ejemplo adicionalmente en el ejemplo 1.

25

En general, antes del acoplamiento, las matrices pueden contener grupos activos tales como NHS, carbodiimida etc. para permitir la reacción de acoplamiento con el compuesto de inmovilización. El compuesto de inmovilización puede acoplarse al soporte sólido mediante acoplamiento directo (por ejemplo usando grupos funcionales tales como grupos amino, sulfhidrilo, carboxilo, hidroxilo, aldehído y cetona) y mediante acoplamiento indirecto (por ejemplo mediante biotina, estando la biotina unida covalentemente al producto de inmovilización de la invención y unión no covalente de biotina a estreptavidina que se une directamente al soporte sólido).

30

La unión al material de soporte sólido puede implicar ligadores escindibles y no escindibles. La escisión puede lograrse mediante escisión enzimática o tratamiento con métodos químicos adecuados.

35

Por tanto, según una realización preferida de la invención, el producto de inmovilización resulta de una unión covalente directa o mediada por ligador del al menos un compuesto de inmovilización de la invención al soporte sólido.

40

El ligador puede ser un grupo alquileo C_{1-10} , que está interrumpido o terminado opcionalmente por uno o más átomos o grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en S, O, NH, C(O)O, C(O) y C(O)NH y estando el ligador opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, OH, NH_2 , C(O)H, C(O)NH $_2$, SO_3H , NO_2 y CN.

45

El término "alquileo C_{1-10} " significa una cadena de alquileo que tiene 1 - 10 átomos de carbono, por ejemplo metileno, etileno, $-CH=CH-$, $-C\equiv C-$, n-propileno y similares, en el que cada hidrógeno de un átomo de carbono puede reemplazarse por un sustituyente.

50

El término "interrumpido" significa que el uno o más átomos o grupos funcionales se insertan entre dos átomos de carbono de la cadena de alquileo o, cuando aparece "terminado", en el extremo de dicha cadena.

Preferiblemente, dicha inmovilización se produce mediante el grupo amino primario en el residuo $X-(CH_2)_nNH_2$ para uno de R^1 , R^2 , R^3 en la fórmula (I) anterior. Más preferiblemente, dicho grupo amino es parte de un grupo funcional amida, de modo que la inmovilización se produce mediante la formación de un enlace amida de un compuesto de inmovilización de la presente invención o una mezcla de los mismos y opcionalmente grupos funcionales ácido carboxílico activados del soporte sólido. Tal vez se requieran técnicas de grupos protectores bien conocidas durante

la etapa de inmovilización.

La invención se refiere además a un producto de inmovilización, que puede obtenerse mediante el método de la invención.

5 Además, la presente invención se refiere a un producto de inmovilización, que comprende el compuesto de inmovilización de la invención inmovilizado sobre un soporte sólido, en particular seleccionándose el soporte sólido del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de Sepharose (por ejemplo Sepharose activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas.

10 Por tanto, un producto de inmovilización que puede obtenerse mediante el método de la invención es o comprende un compuesto de inmovilización inmovilizado sobre un soporte sólido. Este producto de inmovilización se denominará a continuación producto de inmovilización de la invención y se usa en los métodos de la presente invención.

15 En una realización preferida, el compuesto de inmovilización o producto de inmovilización de la invención puede marcarse adicionalmente.

20 Por "marcado" quiere decirse que la respectiva sustancia está o bien directa o bien indirectamente marcada con una molécula que proporciona una señal de detección, por ejemplo radioisótopo, etiqueta fluorescente, etiqueta quimioluminiscente, un péptido o moléculas de unión específicas. Las moléculas de unión específicas incluyen pares, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina. El marcador puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable. La etiqueta también puede ser un péptido que puede usarse, por ejemplo, en un ensayo de complementación de fragmento enzimático (por ejemplo complementación de fragmento enzimático de beta-galactosidasa; Zaman *et al.*, 2006. *Assay Drug Dev. Technol.* 4(4):411-420). Los compuestos marcados podrían ser útiles no sólo en técnicas de obtención de imágenes si no también en ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para identificar compuestos que interaccionan con cinasas mediante la inhibición de la unión del compuesto marcado, por ejemplo en ensayos de cinasas que contienen tales compuestos marcados.

30 Se usan comúnmente radioisótopos en aplicaciones biológicas para la detección de una variedad de biomoléculas y han demostrado ser útiles en ensayos de unión. Se han diseñado varios ejemplos de sondas para incorporar ^3H (también escrito como T de tritio) ya que puede reemplazar al hidrógeno en una sonda sin alterar su estructura (Fenteany *et al.*, 1995. *Science* 268:726-731). Un compuesto "marcado isotópicamente" o "radiomarcado" es un compuesto de la invención en el que uno o más átomos se reemplazan o se sustituyen por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o el número másico encontrado normalmente en la naturaleza (es decir, que se produce de manera natural). Los radionúclidos adecuados que pueden incorporarse en compuestos de la presente invención incluyen pero no se limitan a ^2H (también escrito como D de deuterio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I y ^{131}I .

40 En la técnica se conocen generalmente recomendaciones para la selección y métodos para la unión de etiquetas fluorescentes (por ejemplo tintes de fluoresceína, rodamina, dansilo, NBD (nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol), BODIPY (difluoruro de dipirrometeno boro) y cianina (Cy)) a ligandos de molécula pequeña (Vedvik *et al.*, 2004. *Assay Drug Dev. Technol.* 2(2): 193-203; Zhang *et al.*, 2005. *Analytical Biochemistry* 343(1):76-83). Se describió la aplicación de sondas fluorescentes (fluoróforos) en ensayos para selección de alto rendimiento (HTS) de proteína cinasas (Zaman *et al.*, 2003. *Comb. Chem. High Throughput Screen* 6(4): 313-320). El cambio de las propiedades fluorescentes tras la unión de la sonda fluorescente a la cinasa diana puede determinarse midiendo por ejemplo la polarización de fluorescencia (Kashem *et al.*, 2007. *J. Biomol. Screening* 12(1):70-83), la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET; Zhang *et al.*, 2005. *Analytical Biochemistry* 343(1):76-83) o el tiempo de vida de la fluorescencia (Moger *et al.*, 2006. *J. Biomol. Screening* 11(7): 765-772). Además, puede usarse la tecnología ALPHAScreen en la que la excitación de una perla donante a 680 nm produce oxígeno singlete que puede difundir hasta una perla aceptora que experimenta una reacción quimioluminiscente (Glickman *et al.*, 2002. *J. Biomol. Screen.* 7(1):3-10).

55 Un posible uso de los productos de inmovilización de la invención es en el contexto de la identificación de compuestos que interaccionan con una variedad de cinasas, por ejemplo con cinasas de la familia IRAK o con NIK. Por tanto, la presente invención también se refiere a tales métodos y usos.

60 Por tanto, en un primer aspecto de los métodos de la invención, la invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de

a) proporcionar una preparación proteica que contiene una variedad de cinasas,

b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización,

65

- c) incubar el uno o más complejos diferentes con un compuesto dado, y
- d) determinar si el compuesto puede separar la cinasa del producto de inmovilización.

5 En una realización preferida, la variedad de cinasas incluye uno o más miembros de la familia IRAK.

En consecuencia, en el contexto de este primer aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con uno o más miembros de la familia IRAK, que comprende las etapas de

- 10 a) proporcionar una preparación proteica que contiene uno o más miembros de la familia IRAK,
- b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre uno de los miembros de la familia IRAK y el producto de inmovilización,
- 15 c) incubar el uno o más complejos diferentes con un compuesto dado, y
- d) determinar si el compuesto puede separar el miembro de la familia IRAK del producto de inmovilización.

20 En una realización adicional preferida, la variedad de cinasas incluye NIK.

En consecuencia, en el contexto de este primer aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con NIK, que comprende las etapas de

- 25 a) proporcionar una preparación proteica que contiene NIK,
- b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre NIK y el producto de inmovilización,
- 30 c) incubar el complejo con un compuesto dado, y
- d) determinar si el compuesto puede separar NIK del producto de inmovilización.

35 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de

- a) proporcionar una preparación proteica que contiene una variedad de cinasas,
- 40 b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y
- c) detectar el complejo o los complejos formados en la etapa b).

45 En una realización preferida, la variedad de cinasas incluye uno o más miembros de la familia IRAK.

En consecuencia, en el contexto de este segundo aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con uno o más miembros de la familia IRAK, que comprende las etapas de

- a) proporcionar una preparación proteica que contiene uno o más miembros de la familia IRAK,
- 55 b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre uno de los miembros de la familia IRAK y el producto de inmovilización, y
- c) detectar el complejo o los complejos formados en la etapa b).

60 En una realización adicional preferida, la variedad de cinasas incluye NIK.

En consecuencia, en el contexto de este segundo aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con NIK, que comprende las etapas de

- 65 a) proporcionar una preparación proteica que contiene NIK,

b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de un complejo entre NIK y el producto de inmovilización, y

5 c) detectar el complejo formado en la etapa b).

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de:

10 a) proporcionar dos alícuotas de una preparación proteica que contiene una variedad de cinasas,

b) poner en contacto una alícuota con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización,

15 c) poner en contacto la otra alícuota con el producto de inmovilización de la invención y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y

20 d) determinar la cantidad del complejo o de los complejos formados en las etapas b) y c).

En una realización preferida, la variedad de cinasas incluye uno o más miembros de la familia IRAK.

25 En consecuencia, en el contexto de este tercer aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con uno o más miembros de la familia IRAK, que comprende las etapas de:

30 a) proporcionar dos alícuotas de una preparación proteica que contiene uno o más miembros de la familia IRAK,

b) poner en contacto una alícuota con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre un miembro de la familia IRAK y el producto de inmovilización,

35 c) poner en contacto la otra alícuota con el producto de inmovilización de la invención y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre un miembro de la familia IRAK y el producto de inmovilización, y

40 d) determinar la cantidad del complejo o de los complejos formados en las etapas b) y c).

En una realización adicional preferida, la variedad de cinasas incluye NIK.

45 En consecuencia, en el contexto de este tercer aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con NIK, que comprende las etapas de:

a) proporcionar dos alícuotas de una preparación proteica que contiene NIK,

50 b) poner en contacto una alícuota con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre NIK y el producto de inmovilización,

c) poner en contacto la otra alícuota con el producto de inmovilización de la invención y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de un complejo entre NIK y el producto de inmovilización, y

55 d) determinar la cantidad del complejo formado en las etapas b) y c).

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de:

60 a) proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene una variedad de cinasas,

b) incubar una alícuota con un compuesto dado,

65 c) recoger las células de cada alícuota,

d) lisar las células con el fin de obtener preparaciones proteicas,

e) poner en contacto las preparaciones proteicas con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y

5

f) determinar la cantidad del complejo o de los complejos formados en cada alícuota en la etapa e).

En una realización preferida, la variedad de cinasas incluye uno o más miembros de la familia IRAK.

10 En consecuencia, en el contexto de este cuarto aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con uno o más miembros de la familia IRAK, que comprende las etapas de:

15 a) proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene uno o más miembros de la familia IRAK,

b) incubar una alícuota con un compuesto dado,

20

c) recoger las células de cada alícuota,

d) lisar las células con el fin de obtener preparaciones proteicas,

25 e) poner en contacto las preparaciones proteicas con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre un miembro de la familia IRAK y el producto de inmovilización, y

determinar la cantidad del complejo o de los complejos formados en cada alícuota en la etapa e).

30 En una realización adicional preferida, la variedad de cinasas incluye NIK.

En consecuencia, en el contexto de este cuarto aspecto de la invención, la invención también se refiere a un método para la identificación de un compuesto que interacciona con NIK, que comprende las etapas de:

35 a) proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene NIK,

b) incubar una alícuota con un compuesto dado,

40

c) recoger las células de cada alícuota,

d) lisar las células con el fin de obtener preparaciones proteicas,

e) poner en contacto las preparaciones proteicas con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre NIK y el producto de inmovilización, y

45 f) determinar la cantidad del complejo formado en cada alícuota en la etapa e).

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que los productos de inmovilización de la presente invención son adecuados para la identificación de compuestos que interaccionan con cinasas de varias maneras:

50 a) Los productos de inmovilización de la presente invención se unen a una variedad de cinasas. Especialmente, se unen a las cinasas enumeradas en las tablas 4, 5, 6 y 7 mostradas en los ejemplos.

Por ejemplo, se identificaron las siguientes cinasas en el ejemplo 2 (tabla 4):

55 AAK1, ACK, ALK4, AMPKa1, AurA, AurB, BIKE, BTK, CaMK2d, CaMK2g, CaMKK2, CDC2, CDK10, CDK2, CDK5, CDK9, CHK1, CK2a1, CK2a2, CLK1, CRK7, CSK, DNAPK, DYRK1A, EphB6, Erk1, Erk2, FER, FES, GAK, GCK, GSK3A, GSK3B, HIP1, HIPK2, HPK1, IKKe, IRAK1, IRAK3, IRAK4, IRE1, JAK1, JAK2, JNK1, JNK2, KHS1, LCK, LOK, LRRK2, MAP2K1, MAP2K3, MAP2K5, MAP3K1, MAP3K2, MAP3K3, MAP3K4, MAP3K5, MARK2, MARK3, MLK3, MLK4, MPSK1, MSK1, MSK2, MST1, MST4, MYT1, NEK3, NEK9, PAK4, PHKg2, PIP5K2A, PIP5K2C, PITSLRE, PKCa, PKCb, PKD2, PKD3, PKN1, PKN2, PLK1, PLK4, PYK2, QIK, RET, RSK2, RSK3, SLK, STK33, SYK, TAO3, TBK1, TEC, TGFbR1, TYK2, ULK3, Weel, YES.

60 Además, por ejemplo, se identificaron las siguientes cinasas en el ejemplo 3 (tabla 5): ADCK1, ALK2, ARG, BCR, DRAK2, HRI, INSR, JAK3, LYN, MAP2K6, MST2, NEK6, NEK7, NIK, PIK4Ca, RIPK2, RSK4, ULK1.

65 Además, por ejemplo, se identificaron las siguientes cinasas en el ejemplo 4 (tabla 6): AMPKa2, CaMKK1, FAK,

FLT4, KDR, MRCKa, MRCKb, PKG1, SRC, TIE2, TNK1.

Además, por ejemplo, se identificaron las siguientes cinasas en el ejemplo 5 (tabla 7): BMPR1A, DDR1, FYN, HIPK3, MAP3K7, MER, MET, PIP5K2B, RON, ULK4.

5 En consecuencia, en los métodos de la presente invención, estos productos de inmovilización pueden usarse para identificar compuestos que se unen a al menos una cinasa de dicha variedad de cinasas.

10 b) Los productos de inmovilización de la presente invención se unen a la familia IRAK y por tanto son adecuados para la identificación de compuestos que interactúan con dicha familia de cinasas.

c) Los compuestos de inmovilización de la presente invención se unen a NIK y por tanto son adecuados para la identificación de compuestos que interactúan con NIK.

15 Según la presente invención, un miembro de la familia IRAK puede ser cualquiera de IRAK 1, IRAK 2, IRAK 3 e IRAK 4.

Según una realización preferida de la invención, el miembro de la familia IRAK es IRAK 1 o IRAK 4.

20 Según la invención, el término IRAK se refiere a "cinasa asociada a receptores de interleucina-1", que comprende IRAK1, IRAK2, IRAK3 e IRAK4 (véase anteriormente).

Según la presente invención, el término NIK se refiere a "cinasa inductora de NF-kappa-B" (véase anteriormente).

25 Según la presente invención, la expresión "NIK" o "IRAK" se refiere tanto a proteínas humanas como a otras proteínas de esta familia. La expresión incluye especialmente derivados funcionalmente activos de las mismas o fragmentos funcionalmente activos de las mismas u homólogos de las mismas o variantes codificadas por un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico que codifica para dicha proteína en condiciones de baja rigurosidad. Preferiblemente, estas condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación en un tampón que comprende formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, BSA al 0,02%, ADN de espera de salmón desnaturalizado 100 ug/ml y sulfato de dextrano al 10% (p/v) durante 18-20 horas a 40°C, lavado en un tampón que consiste en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM y SDS al 0,1% durante 1-5 horas a 55°C y lavado en un tampón que consiste en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) EDTA 5 mM y SDS al 0,1% durante 1,5 horas a 60°C.

35 Además, según la presente invención, la expresión "NIK" o "IRAK" incluye formas mutantes de dichas cinasas.

40 En algunos aspectos de la invención, en primer lugar se proporciona una preparación proteica que contiene dichas cinasas o cinasa. Los métodos de la presente invención pueden realizarse con cualquier preparación proteica como material de partida, siempre que la respectiva cinasa se solubilice en la preparación. Los ejemplos incluyen una mezcla líquida de varias proteínas, un lisado de células, un lisado de células parcial que no contiene todas las proteínas presentes en la célula original o una combinación de varios lisados de células. El término "preparación proteica" también incluye proteína purificada disuelta.

45 La presencia de las cinasas en una preparación proteica de interés puede detectarse en inmunotransferencias de tipo Western estudiadas con sonda con anticuerpos que se dirigen específicamente contra dicha cinasa. Alternativamente, también podría usarse espectrometría de masas (EM) para detectar las cinasas (véase a continuación).

50 Pueden obtenerse lisados de células o lisados de células parciales aislando orgánulos celulares (por ejemplo núcleo, mitocondrias, ribosomas, aparato de golgi etc.) en primer lugar y luego preparando preparaciones proteicas derivadas de estos orgánulos. En la técnica se conocen métodos para el aislamiento de orgánulos celulares (capítulo 4.2 Purification of Organelles from Mammalian Cells en "Current Protocols in Protein Science", Editores: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8).

55 Además, pueden prepararse preparaciones proteicas mediante fraccionamiento de extractos celulares enriqueciendo de ese modo tipos específicos de proteínas tales como proteínas citoplasmáticas o de membrana (capítulo 4.3 Subcellular Fractionation of Tissue Culture Cells en "Current Protocols in Protein Science", Editores: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8).

Además pueden usarse preparaciones proteicas de líquidos corporales (por ejemplo sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y orina).

65 Por ejemplo pueden usarse lisados de embriones completos derivados de estadios adultos o estadios de desarrollo definidos de organismos modelo tales como *C. elegans*. Además, órganos completos tales como corazón

diseccionado de ratones pueden ser la fuente de preparaciones proteicas. Estos órganos también pueden perfundirse *in vitro* con el fin de obtener una preparación proteica.

5 Además, la preparación proteica puede ser una preparación que contiene la cinasa o las cinasas que se han producido de manera recombinante. Métodos para la producción de proteínas recombinantes en células procariotas y eucariotas están ampliamente establecidos (capítulo 5 Production of Recombinant Proteins en "Current Protocols in Protein Science", Editores: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, 1995, ISBN: 0-471-14098-8).

10 En una realización preferida de los métodos de la invención, el suministro de una preparación proteica incluye las etapas de recoger al menos una célula que contiene la cinasa o las cinasas y lisar la célula.

15 Células adecuadas para este fin son por ejemplo las células o los tejidos en los que se expresan las cinasas. En cualquier célula o tejido dado sólo puede expresarse un subconjunto del quinoma. Por tanto, puede ser necesario generar múltiples preparaciones proteicas a partir de una variedad de tipos de células y tejidos para cubrir el quinoma, especialmente para obtener el perfil de selectividad de inhibidores de cinasas. Ya que las líneas celulares establecidas pueden no reflejar el patrón de expresión fisiológico de cinasas, pueden usarse células humanas o animales primarias, por ejemplo células aisladas a partir de muestras de sangre.

20 Por tanto, en una realización preferida, las células aisladas de sangre periférica representan un material biológico adecuado. Se conocen ampliamente procedimientos para la preparación y el cultivo de linfocitos y subpoblaciones de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica (PBL) (W.E Biddison, capítulo 2.2 "Preparation and culture of human lymphocytes" en Current Protocols in Cell Biology, 1998, John Wiley & Sons, Inc.). Por ejemplo, la centrifugación en gradiente de densidad es un método para la separación de linfocitos de otras poblaciones de células sanguíneas (por ejemplo eritrocitos y granulocitos). Pueden aislarse subpoblaciones de linfocitos humanos mediante sus receptores de superficie celular específicos que pueden reconocerse por anticuerpos monoclonales. El método de separación física implica el acoplamiento de estos reactivos de anticuerpo a perlas magnéticas, lo que permite el enriquecimiento de células a las que se han unido estos anticuerpos (selección positiva).

30 Como alternativa a células humanas primarias, pueden usarse líneas celulares en cultivo (por ejemplo células MOLT-4, Jurkat, Ramos o células HeLa).

35 En una realización preferida, la célula es parte de un sistema de cultivo celular y en la técnica se conocen métodos para la recogida de una célula de un sistema de cultivo celular (bibliografía citada anteriormente).

40 La elección de la célula dependerá principalmente de la expresión de las cinasas, puesto que ha de garantizarse que la proteína esté presente principalmente en la célula de elección. Con el fin de determinar si una célula dada es un sistema de partida adecuado para los métodos de la invención, métodos como inmunotransferencia de tipo Western, métodos de detección de ácidos nucleicos basados en PCR, transferencias de tipo Northern y métodos de microalineamientos de ADN ("chips de ADN") pueden ser adecuados con el fin de determinar si una proteína dada de interés está presente en la célula.

45 La elección de la célula también puede verse influida por el fin del estudio. Si es necesario analizar la eficacia *in vivo* para un fármaco dado, entonces pueden seleccionarse células o tejidos en los que se produce el efecto terapéutico deseado (por ejemplo células B). Por el contrario, para la elucidación de dianas proteicas que median en efectos secundarios no deseados, puede analizarse la célula o el tejido en el que se observa el efecto secundario (por ejemplo cardiomiocitos, músculo liso vascular o células epiteliales).

50 Además, se prevé dentro de la presente invención que la célula que contiene las cinasas o la cinasa pueda obtenerse a partir de un organismo, por ejemplo mediante biopsia. En la técnica se conocen métodos correspondientes. Por ejemplo, una biopsia es un procedimiento de diagnóstico usado para obtener una pequeña cantidad de tejido, que entonces puede examinarse microscópicamente o con métodos bioquímicos. Las biopsias son importantes para diagnosticar, clasificar y determinar el estadio de una enfermedad, pero también para evaluar y monitorizar el tratamiento farmacológico.

55 Se abarca dentro de la presente invención que al recogerse al menos una célula, se realice la lisis simultáneamente. Sin embargo, se prefiere igualmente que la célula se recoja en primer lugar y luego se lise por separado.

60 En la técnica se conocen métodos para la lisis de células (Karwa y Mitra: Sample preparation for the extraction, isolation, and purification of Nuclei Acids; capítulo 8 en "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", Wiley 2003, Editor: Somenath Mitra, ISBN impreso: 0471328456; ISBN en línea: 0471457817). La lisis de diferentes tipos de células y tejidos puede lograrse mediante homogeneizadores (por ejemplo homogeneizador Potter), desintegradores ultrasónicos, lisis enzimática, detergentes (por ejemplo NP-40, Triton X-100, CHAPS, SDS), choque osmótico, congelación y descongelación repetida o una combinación de estos métodos.

65 Según los métodos de la invención, la preparación proteica que contiene una o más cinasas se pone en contacto

con el producto de inmovilización en condiciones que permiten la formación de un complejo entre dicha cinasa y el producto de inmovilización de la invención.

5 En la presente invención, el término “un complejo entre una cinasa y el producto de inmovilización” indica un complejo en el que el producto de inmovilización interacciona con una cinasa, por ejemplo mediante unión covalente o, lo más preferido, mediante unión no covalente. En el contexto de la presente invención, se identifican compuestos que interfieren con la formación de un complejo entre el producto de inmovilización y una cinasa presente en una célula o preparación proteica. En el caso de que sólo vaya a detectarse o esté presente una cinasa, se observa y se somete a prueba la formación de un complejo. En el caso de que vayan a detectarse o estén presentes varias cinasas, se observa y se somete a prueba la formación de varios complejos diferentes.

10 El experto en la técnica conocerá qué condiciones pueden aplicarse con el fin de permitir la formación de dicho complejo.

15 En el contexto de la presente invención, el término “en condiciones que permiten la formación del complejo” incluye todas las condiciones en las que tal formación, preferiblemente tal unión, es posible. Esto incluye la posibilidad de tener el soporte sólido sobre una fase inmovilizada y verter el lisado sobre el mismo. En otra realización preferida, también se incluye que el soporte sólido esté en una forma particulada y mezclado con el lisado de células. El experto en la técnica conoce tales condiciones.

20 En el contexto de unión no covalente, la unión entre el producto de inmovilización y la cinasa se da, por ejemplo, mediante puentes salinos, puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas o una combinación de los mismos.

25 En una realización preferida, las etapas de la formación de dicho complejo se realizan en condiciones esencialmente fisiológicas. El estado físico de proteínas dentro de células se describe en Petty, 1998 (Howard R. Petty¹, capítulo 1, unidad 1.5 en: Juan S. Bonifacino, Mary Dasso, Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-Schwartz, y Kenneth M. Yamada (eds.) Current Protocols in Cell Biology Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Inc. Todos los derechos reservados. DOI: 10.1002/0471143030.cb0101s00Online, fecha de remisión: mayo de 2001, fecha de publicación impresa: octubre de 1998).

30 La puesta en contacto en condiciones esencialmente fisiológicas tiene la ventaja de que las interacciones entre el ligando, la preparación celular (es decir, la cinasa que va a caracterizarse) y opcionalmente el compuesto reflejan al máximo posible las condiciones naturales. “Condiciones esencialmente fisiológicas” son entre otras las condiciones que están presentes en el material de muestra original, sin procesar. Incluyen la concentración de proteína, el pH, la concentración de sales, la capacidad de tampón y las modificaciones postraduccionales fisiológicas de las proteínas implicadas. El término “condiciones esencialmente fisiológicas” no requiere condiciones idénticas a las del organismo vivo original, del que se deriva la muestra, sino condiciones esencialmente similares a la célula o condiciones próximas a las condiciones celulares. El experto en la técnica se dará cuenta, por supuesto, de que pueden surgir determinadas restricciones debido a la configuración experimental que finalmente conducirán a condiciones menos similares a la célula. Por ejemplo, la rotura finalmente necesaria de paredes celulares o membranas celulares cuando se toma y se procesa una muestra a partir de un organismo vivo puede requerir condiciones que no son idénticas a las condiciones fisiológicas encontradas en el organismo. Las variaciones adecuadas de las condiciones fisiológicas para poner en práctica los métodos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se abarcan por el término “condiciones esencialmente fisiológicas” tal como se usa en el presente documento. En resumen, ha de entenderse que el término “condiciones esencialmente fisiológicas” se refiere a condiciones próximas a las condiciones fisiológicas, tales como por ejemplo las que se encuentran en células naturales, pero no requiere necesariamente que estas condiciones sean idénticas.

35 Por ejemplo, “condiciones esencialmente fisiológicas” pueden comprender NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-37°C y catión divalente 0,001-10 mM (por ejemplo Mg⁺⁺, Ca⁺⁺); de manera más preferible aproximadamente NaCl o KCl 150 mM, pH de 7,2 a 7,6, catión divalente 5 mM y a menudo incluyen proteína no específica al 0,01-1,0 por ciento (por ejemplo BSA). A menudo puede estar presente un detergente no iónico (Tween, NP 40, Triton-X100), habitualmente a de aproximadamente el 0,001 al 2%, normalmente al 0,05-0,2% (volumen/volumen). Como recomendación general, pueden aplicarse las siguientes condiciones acuosas tamponadas: NaCl 10-250 mM, Tris HCl 5-50 mM, pH 5-8, con adición opcional de catión/cationes divalente(s) y/o quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos.

40 Preferiblemente, “condiciones esencialmente fisiológicas” significa un pH de desde 6,5 hasta 7,5, preferiblemente desde 7,0 hasta 7,5 y/o una concentración de tampón de desde 10 hasta 50 mM, preferiblemente desde 25 hasta 50 mM y/o una concentración de sales monovalentes (por ejemplo Na o K) de desde 120 hasta 170 mM, preferiblemente de 150 mM. Pueden estar presentes adicionalmente sales divalentes (por ejemplo Mg o Ca) a una concentración de desde 1 hasta 5 mM, preferiblemente de 1 a 2 mM, seleccionándose más preferiblemente el tampón del grupo que consiste en Tris-HCl o HEPES.

65 El experto en la técnica apreciará que entre las etapas individuales de los métodos de la invención, pueden ser necesarias etapas de lavado. Tal lavado es parte del conocimiento del experto en la técnica. El lavado sirve para

eliminar componentes no unidos del lisado de células del soporte sólido. Las interacciones de unión no específicas (por ejemplo iónicas simples) pueden minimizarse añadiendo niveles bajos de detergente o mediante ajustes moderados en las concentraciones de sal en el tampón de lavado.

5 Según los métodos de identificación de la invención, el sistema de lectura es o bien la detección o determinación de una cinasa (primer aspecto de la invención) o bien la detección del complejo entre una cinasa y el producto de inmovilización (segundo aspecto de la invención) o bien la determinación de la cantidad del complejo entre una cinasa y el producto de inmovilización (segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención).

10 En el método según el primer aspecto de la invención, la detección o determinación de la cantidad de cinasa separada es indicativa preferiblemente del hecho de que el compuesto puede separar la cinasa del producto de inmovilización. Esta capacidad indica que el respectivo compuesto interacciona, preferiblemente se une a la cinasa, lo que es indicativo de su potencial terapéutico.

15 En una realización del método según el segundo aspecto de la invención, se detecta el complejo formado durante el método de la invención. El hecho de que se forme tal complejo indica preferiblemente que el compuesto no inhibe completamente la formación del complejo. Por otro lado, si no se forma complejo, el compuesto es presumiblemente un agente de interacción fuerte con la cinasa, lo que es indicativo de su potencial terapéutico.

20 Según los métodos del segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención, se determina la cantidad del complejo formado durante el método. En general, cuanto menos complejo se forme en presencia del respectivo compuesto, más fuertemente interacciona el compuesto con la cinasa, lo que es indicativo de su potencial terapéutico.

25 La detección del complejo formado según el segundo aspecto de la invención puede realizarse usando anticuerpos marcados dirigidos contra la cinasa y un sistema de lectura adecuado.

Según una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el complejo entre una cinasa y el producto de inmovilización se detecta determinando su cantidad.

30 En el transcurso del segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención, se prefiere que se separe la cinasa del producto de inmovilización con el fin de determinar la cantidad de dicho complejo.

35 Según la invención, separar significa toda acción que destruya las interacciones entre el compuesto de inmovilización y la cinasa. Esto incluye en una realización preferida la elución de la cinasa del compuesto de inmovilización.

40 La elución puede lograrse usando reactivos no específicos tal como se describe en detalle a continuación (fuerza iónica, valor de pH, detergentes). Además, puede someterse a prueba si un compuesto de interés puede eluir específicamente la cinasa del compuesto de inmovilización. Tales compuestos que interaccionan con cinasas se describen adicionalmente en las siguientes secciones.

45 Tales métodos no específicos para destruir la interacción se conocen principalmente en la técnica y dependen de la naturaleza de la interacción ligando-enzima. Principalmente, el cambio de fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura o la incubación con detergentes son métodos adecuados para disociar las enzimas diana del compuesto inmovilizado. La aplicación de un tampón de elución puede disociar parejas de unión mediante valores de pH extremos (pH alto o bajo; por ejemplo disminuir el pH usando citrato 0,1 M, pH 2-3), cambio de fuerza iónica (por ejemplo alta concentración de sal usando NaI, KI, MgCl₂ o KCl), agentes que reducen de la polaridad que rompen las interacciones hidrófobas (por ejemplo dioxano o etilenglicol) o agentes de desnaturalización (sales caotrópicas o detergentes tales como dodecilsulfato de sodio, SDS; revisión: Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography).

50 En algunos casos, el soporte sólido tiene que separarse preferiblemente del material liberado. Los métodos individuales para esto dependen de la naturaleza del soporte sólido y se conocen en la técnica. Si el material de soporte está contenido dentro de una columna, el material liberado puede recogerse como fracción no retenida de la columna. En el caso de que el material de soporte este mezclado con los componentes del lisado (el denominado procedimiento discontinuo) puede ser necesaria una etapa de separación adicional tal como centrifugación suave y el material liberado se recoge como sobrenadante. Alternativamente, pueden usarse perlas magnéticas como soporte sólido de manera que las perlas pueden eliminarse de la muestra usando un dispositivo magnético.

60 En la etapa d) del método según el primer aspecto de la invención, se determina si la cinasa se ha separado del producto de inmovilización de la invención. Esto puede incluir la detección de la cinasa o la determinación de la cantidad de la cinasa.

65 En consecuencia, al menos en realizaciones preferidas de todos los métodos identificación de la invención, se usan métodos para la detección de una cinasa separada o para la determinación de su cantidad. Tales métodos se conocen en la técnica e incluyen métodos fisicoquímicos tales como secuenciación de proteínas (por ejemplo

degradación de Edmann), análisis mediante métodos de espectrometría de masas o métodos de inmunodetección empleando anticuerpos dirigidos contra la cinasa.

5 A lo largo de toda la invención, si se usa un anticuerpo con el fin de detectar una cinasa o con el fin de determinar su cantidad (por ejemplo mediante ELISA), el experto en la técnica entenderá que, si hay que detectar una isoforma específica de una cinasa o si hay que determinar la cantidad de una isoforma específica de una cinasa, puede usarse un anticuerpo específico de isoforma. Tal como se indicó anteriormente, tales anticuerpos se conocen en la técnica. Además, el experto en la técnica es consciente de métodos para producir los mismos.

10 Preferiblemente, se detecta una cinasa o se determina la cantidad de una cinasa mediante métodos de espectrometría de masas o de inmunodetección.

15 En la técnica se conoce la identificación de proteínas con análisis espectrométrico de masas (espectrometría de masas) (Shevchenko *et al.*, 1996, Analytical Chemistry 68: 850-858; Mann *et al.*, 2001, Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, Annual Review of Biochemistry 70, 437-473) y se ilustra adicionalmente en la sección de ejemplos.

20 Preferiblemente, el análisis de espectrometría de masas se realiza de una manera cuantitativa, por ejemplo usando la tecnología iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta) o cICAT (etiquetas de afinidad codificadas por isótopos escindibles) (Wu *et al.*, 2006. J. Proteome Res. 5,651-658).

25 Según una realización preferida adicional de la presente invención, la caracterización mediante espectrometría de masas (EM) se realiza mediante la identificación de péptidos proteotípicos de la cinasa. La idea es que la cinasa se digiere con proteasas y los péptidos resultantes se determinan mediante EM. Como resultado, las frecuencias de péptidos para péptidos a partir de la misma proteína fuente difieren en un gran grado, denominándose los péptidos observados más frecuentemente que "normalmente" contribuyen a la identificación de esta proteína "péptido proteotípico". Por tanto, un péptido proteotípico tal como se usa en la presente invención es un péptido que puede observarse bien experimentalmente que únicamente identifica una isoforma proteica o proteína específica.

30 Según una realización preferida, la caracterización se realiza comparando los péptidos proteotípicos obtenidos en el transcurso de la puesta en práctica de los métodos de la invención con péptidos proteotípicos conocidos. Puesto que, cuando se usan fragmentos preparados mediante digestión con proteasas para la identificación de una proteína en EM se observan habitualmente los mismos péptidos proteotípicos para una enzima dada, es posible comparar los péptidos proteotípicos obtenidos para una muestra dada con los péptidos proteotípicos ya conocidos para enzimas de una clase de enzimas dada y de ese modo identificar la enzima presente en la muestra.

35 Como alternativa al análisis de espectrometría de masas, puede detectarse la cinasa eluida (incluyendo proteínas de andamiaje o parejas de unión eluidas conjuntamente) o puede determinarse su cantidad usando un anticuerpo específico dirigido contra la cinasa (o contra una isoforma de una cinasa, véase anteriormente).

40 Además, en otra realización preferida, una vez se ha establecido la identidad de la pareja de unión eluida conjuntamente mediante análisis de espectrometría de masas, puede detectarse cada pareja de unión con anticuerpos específicos dirigidos contra esta proteína.

45 Los ensayos basados en anticuerpos adecuados incluyen pero no se limitan a inmunotransferencias de tipo Western, ensayos ELISA, ensayos ELISA de tipo "sandwich" y alineamientos de anticuerpos o una combinación de los mismos. En la técnica se conoce el establecimiento de tales ensayos (capítulo 11, Immunology, páginas 11-1 a 11-30 en: Short Protocols in Molecular Biology. Cuarta edición, editado por F.M. Ausubel *et al.*, Wiley, Nueva York, 1999).

50 Estos ensayos no sólo pueden configurarse de manera que detecten y cuantifiquen una proteína que interacciona con cinasa de interés (por ejemplo una subunidad catalítica o reguladora de un complejo de cinasa), sino también para analizar patrones de modificación postraduccional tales como fosforilación o modificación con ubiquitina.

55 Además, los métodos de identificación de la invención implican el uso de compuestos que se someten a prueba para determinar su capacidad para ser un compuesto que interacciona con cinasa.

60 Principalmente, según la presente invención, un compuesto de este tipo puede ser toda molécula que pueda interaccionar con la cinasa, por ejemplo inhibiendo su unión al producto de inmovilización de la invención. Preferiblemente, el compuesto tiene un efecto sobre la cinasa, por ejemplo un efecto inhibitorio o estimulador.

65 Preferiblemente, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en compuestos químicos sintéticos o que se producen de manera natural o fármacos sintéticos orgánicos, más preferiblemente fármacos orgánicos de molécula pequeña o compuestos de molécula pequeña naturales. Preferiblemente, dicho compuesto se identifica partiendo de una biblioteca que contiene tales compuestos. Entonces, en el transcurso de la presente invención, se explora una biblioteca de este tipo.

Tales moléculas pequeñas no son preferiblemente ni proteínas ni ácidos nucleicos. Preferiblemente, las moléculas pequeñas presentan un peso molecular inferior a 1000 Da, más preferido inferior a 750 Da, lo más preferido inferior a 500 Da.

Una "biblioteca" según la presente invención se refiere a una colección (principalmente grande) de (numerosas) entidades químicas diferentes que se proporcionan de una manera clasificada que permite tanto un análisis funcional rápido (exploración) de las entidades individuales diferentes como al mismo tiempo proporciona una identificación rápida de las entidades individuales que forman la biblioteca. Ejemplos son colecciones de tubos o pocillos o puntos sobre superficies que contienen compuestos químicos que pueden añadirse a reacciones con una o más parejas de interacción potencial definidas en un modo de alto rendimiento. Tras la identificación de una interacción "positiva" deseada de ambas parejas, puede identificarse rápidamente el compuesto respectivo debido a la construcción de la biblioteca. Bibliotecas de orígenes sintético y natural pueden o bien adquirirse o bien diseñarse por el experto en la técnica.

Se proporcionan ejemplos de la construcción de bibliotecas en, por ejemplo, Breinbauer R, Manger M, Scheck M, Waldmann H. Natural product guided compound library development. *Curr. Med. Chem.* Diciembre de 2002; 9(23):2129-45, donde se describen productos naturales que son puntos de partida validados biológicamente para el diseño de bibliotecas combinatorias, ya que tienen un registro demostrado de relevancia biológica. Este papel especial de productos naturales en la química médica y biología química puede interpretarse a la luz de las nuevas percepciones sobre la arquitectura de dominios de las proteínas logrado mediante la biología estructural y bioinformática. Con el fin de cumplir los requisitos específicos del bolsillo de unión individual dentro de una familia de dominios, puede ser necesario optimizar la estructura del producto natural mediante variación química. Se dice que la química en fase sólida va a convertirse en una herramienta eficaz para este procedimiento de optimización, y se destacan avances recientes en este campo en este artículo de revisión. Otras referencias relacionadas incluyen Edwards PJ, Morrell AI. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. *Curr Opin Drug Discov Devel.* Julio de 2002; 5(4):594-605.; Merlot C, Domine D, Church DJ. Fragment analysis in small molecule discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* Mayo de 2002; 5(3):391-9. Revisión; Goodnow RA Jr. Current practices in generation of small molecule new leads. *J Cell Biochem Suppl.* 2001; supl. 37:13-21; que describen que los procedimientos de descubrimiento de fármacos actuales en muchas compañías farmacéuticas requieren colecciones grandes y crecientes de estructuras de moléculas de partida de alta calidad para su uso en ensayos de selección de alto rendimiento. Se han adquirido, en el pasado, colecciones de moléculas pequeñas con diversas estructuras y propiedades "de tipo fármaco" por varios medios: mediante archivo de esfuerzos de optimización de moléculas de partida internos previos, mediante adquisición a partir de proveedores de compuestos y mediante unión de colecciones separadas tras fusiones de compañías. Aunque la química de alto rendimiento/combinatoria se describe como un componente importante en el procedimiento de generación de nuevas moléculas de partida, la selección de diseños de biblioteca para la síntesis y el posterior diseño de miembros de la biblioteca ha evolucionado a un nuevo nivel de desafío e importancia. Los beneficios potenciales de la exploración de diseños de bibliotecas de compuestos de molécula pequeña múltiples frente a múltiples dianas biológicas ofrecen una oportunidad sustancial de descubrir nuevas estructuras de partida.

En una realización preferida del segundo y tercer aspecto de la invención, la preparación proteica que contiene cinasa se incuba en primer lugar con el compuesto y luego con el producto de inmovilización. Sin embargo, la incubación simultánea del compuesto y el producto de inmovilización de la invención (incubación conjunta) con la preparación proteica que contiene cinasa se prefiere igualmente (ensayo de unión competitiva).

En el caso de que la incubación con el compuesto sea en primer lugar, la cinasa se incuba en primer lugar preferiblemente con el compuesto durante de 10 a 60 minutos, más preferido de 30 a 45 minutos a una temperatura de 4°C a 37°C, más preferido de 4°C a 25°C, lo más preferido 4°C. Preferiblemente se usan compuestos a concentraciones que oscilan entre 1 nM y 100 µM, preferiblemente entre 10 nM y 10 µM. La segunda etapa, la puesta en contacto con el ligando inmovilizado, se realiza preferiblemente durante de 10 a 60 minutos a 4°C.

En el caso de incubación simultánea, preferiblemente la cinasa se incuba simultáneamente con el compuesto y el producto de inmovilización de la invención durante de 30 a 120 minutos, más preferido de 60 a 120 minutos a una temperatura de 4°C a 37°C, más preferido de 4°C a 25°C, los más preferido 4°C. Preferiblemente se usan compuestos a concentraciones que oscilan entre 1 nM y 100 µM, preferiblemente entre 10 nM y 10 µM.

Además, las etapas a) a c) del segundo aspecto de la invención pueden realizarse con varias preparaciones proteicas con el fin de someter a prueba diferentes compuestos. Esta realización es especialmente interesante en el contexto de selecciones de medio o alto rendimiento (véase a continuación).

En una realización preferida del método de la invención según el tercer o cuarto aspecto, la cantidad del complejo formado en la etapa c) se compara con la cantidad formada en la etapa b).

En una realización preferida del método de la invención según el tercer o cuarto aspecto, una cantidad reducida del complejo formado en la etapa c) en comparación con la etapa b) indica que una cinasa es una diana del compuesto.

Esto resulta del hecho de que en la etapa c) de este método de la invención, el compuesto compite con el compuesto inmovilizado por la unión de la cinasa. Si está presente menos cinasa en la alícuota incubada con el compuesto, esto significa preferiblemente que el compuesto ha competido con el inhibidor por la interacción con la enzima y, por tanto, es una diana directa de la proteína y viceversa.

5 Preferiblemente, los métodos de identificación de la invención se realizan como una selección de medio o alto rendimiento.

10 El compuesto de interacción identificado según la presente invención puede caracterizarse adicionalmente determinando si tiene un efecto sobre la cinasa, por ejemplo sobre su actividad cinasa (Davies *et al.*, 2000. Biochemical Journal 351(Pt 1):95-105; Bain *et al.*, 2007. Biochemical Journal 408(3):297-315).

15 Los compuestos identificados según la presente invención pueden optimizarse adicionalmente (optimización de moléculas de partida). Esta optimización posterior de tales compuestos a menudo se acelera debido a la información de relación de estructura-actividad (SAR) codificada en estas bibliotecas de generación de moléculas de partida. A menudo se facilita la optimización de moléculas de partida debido a la fácil aplicabilidad de métodos de química de alto rendimiento (HTC) para la síntesis posterior.

20 Se notificó un ejemplo de optimización de moléculas de partida de inhibidores de cinasas IRAK (Buckley *et al.*, 2008. Bioorg Med Chem Lett. 18(12):3656-60).

La invención se refiere además a un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende las etapas de

25 a) identificar un compuesto que interacciona con cinasa tal como se describió anteriormente, y

b) formular el compuesto que interacciona para dar una composición farmacéutica.

30 En la técnica se conocen métodos para la formulación de compuestos identificados. Además, en la técnica se conoce cómo administrar tales composiciones farmacéuticas.

35 La composición farmacéutica obtenida puede usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades en las que la respectiva cinasa desempeña un papel, por ejemplo para la prevención o el tratamiento de cáncer (Zhang *et al.*, 2009. Nature Reviews Cancer 9, 28-39) o enfermedades inflamatorias (Cohen, 2009. Current Opinion in Cell Biology 21, 1-8). Por ejemplo, los inhibidores de IRAK4 pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas en adultos sin hacerlos demasiado susceptibles a infecciones bacterianas y virales. IRAK1 es esencial para la activación mediada por TLR7 y mediada por TLR9 de IRF7 y la producción de interferón-alfa (IFN- α), lo que sugiere que los inhibidores de IRAK1 pueden ser útiles para el tratamiento de lupus eritematoso sistémico (LES). IRAK2 se activa posteriormente a IRAK4 y desempeña un papel en la producción de citocinas proinflamatorias. Por tanto, los inhibidores de IRAK2 pueden ser útiles para enfermedades inflamatorias. Los fármacos que inhiben NIK pueden ser útiles para el tratamiento de mieloma múltiple, un cáncer del sistema inmunitario (Annunziata *et al.*, 2007. Cancer Cell 12(2):115-130; Keats *et al.*, 2007. Cancer Cell 12(2):131-144).

45 La invención se refiere además a un método para la purificación de una cinasa, que comprende las etapas de

a) proporcionar una preparación proteica que contiene dicha cinasa,

b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la cinasa y el producto de inmovilización, y

50 c) separar la cinasa del producto de inmovilización.

55 Tal como se mencionó anteriormente, se ha encontrado sorprendentemente que el compuesto de la invención y por tanto también el producto de inmovilización de la invención es un ligando que reconoce las cinasas mencionadas anteriormente. Esto permite métodos de purificación eficaces para dichas cinasas.

Las cinasas preferidas que van a purificarse incluyen IRAK1, IRAK4 o NIK.

60 Con respecto a las cinasas, la preparación proteica que contiene las cinasas, las condiciones para ponerlas en contacto con el producto de inmovilización de la invención, el producto de inmovilización de la invención, el complejo entre las cinasas y el producto de inmovilización de la invención, la separación de las cinasas del producto de inmovilización de la invención y la detección de las cinasas o la determinación de su cantidad, las realizaciones tal como se definieron anteriormente para los métodos de identificación de la invención también se aplican al método de purificación de la invención.

65 En una realización preferida, el método de purificación comprende además la etapa de purificar una isoforma

específica o isoformas específicas de dichas cinasas, preferiblemente la etapa de purificar IRAK1 o IRAK4.

Preferiblemente, dicha purificación se realiza usando un anticuerpo específico de isoforma tal como se explicó anteriormente, más preferiblemente un anticuerpo específico de IRAK1 o IRAK4.

5 En una realización preferida, el método de purificación de la invención comprende además tras la etapa c) la identificación de proteínas que pueden unirse a dichas cinasas. Esto es especialmente interesante cuando la formación del complejo se realiza en condiciones esencialmente fisiológicas, debido a que entonces es posible conservar el estado natural de la enzima, lo que incluye la existencia de parejas de unión, subunidades enzimáticas o modificaciones postraduccionales, que entonces pueden identificarse con la ayuda de espectrometría de masas (EM).

10 En consecuencia, en una realización preferida, el método de purificación de la invención comprende adicionalmente tras la etapa c) la determinación de si la cinasa se modifica además postraduccionalmente, por ejemplo mediante modificación con ubiquitina.

15 Las proteínas de unión o las modificaciones postraduccionales pueden determinarse tal como se explicó anteriormente para la detección de cinasas o la determinación de la cantidad de cinasas. Preferiblemente, dichos métodos incluyen métodos de espectrometría de masas o de inmunodetección tal como se describió anteriormente.

20 La invención se refiere además a un método para determinar la presencia de una o más cinasas en una muestra, que comprende las etapas de:

- 25 a) proporcionar una preparación proteica de la que se espera que contenga dicha una o más cinasas,
- b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y
- 30 c) detectar si una o más cinasas han formado un complejo con el producto de inmovilización.

En una realización preferida de la invención, dicha detección en la etapa c) se realiza mediante la separación de dicha una o más cinasas del producto de inmovilización y la identificación adicional de dicha una o más cinasas.

35 Dicha identificación puede realizarse mediante métodos de espectrometría de masas o de inmunodetección tal como se describió anteriormente.

Preferiblemente, también en el contexto de este método de la invención la cinasa es IRAK1, IRAK4 o NIK.

40 Según una realización especialmente preferida de este método de la invención, la cinasa contiene al menos una mutación.

45 Con respecto a dicha una o más cinasas, la preparación proteica que contiene dichas cinasas, las condiciones para ponerlas en contacto con el producto de inmovilización de la invención, el producto de inmovilización de la invención, el complejo entre dicha cinasa y el producto de inmovilización de la invención, la separación de cinasas del producto de inmovilización de la invención y la detección de cinasas o la determinación de su cantidad, las realizaciones tal como se definieron anteriormente para los métodos de identificación de la invención también se aplican al método de purificación de la invención.

50 La invención se refiere además al uso del compuesto o del producto de inmovilización de la invención para la identificación de compuestos que interactúan con cinasas y para la purificación de una cinasa. Las realizaciones tal como se definieron anteriormente también se aplican a los usos de la invención.

55 La invención se refiere además a un kit que comprende el compuesto o el producto de inmovilización de la invención. Un kit de este tipo es especialmente útil para realizar los métodos de la invención. Componentes adicionales del kit pueden ser anticuerpos para la detección de proteínas de cinasa, por ejemplo anticuerpos específicos para IRAK1 y/o IRAK4 o NIK. Tales anticuerpos y sus usos se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente (Davidson *et al.*, 2006. *J. Immunology* 177, 8202-8211; Saitoh *et al.*, 2008. *Blood* 111, 5118-5129). Además, el kit puede contener componentes auxiliares adicionales como tampones, medios para la detección de anticuerpos y controles positivos. Tales componentes se conocen en la técnica.

60 La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, que no se considera que limitan el alcance de protección conferido por las reivindicaciones de la presente solicitud. En el caso en el que en los siguientes ejemplos se use el término "matriz de afinidad", este término se refiere a un producto de inmovilización tal como se define en la presente solicitud.

65

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1: Síntesis de N-(2-(2-(3-(2-aminoetoxi)fenilamino)-5-fluoropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida. Se sintetizó el compuesto tal como se describe en el ejemplo 1.
- 10 Figura 2: Estructura de N-(2-(2-(3-(2-aminoetoxi)fenilamino)-5-fluoropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida (CZC25342).
- 15 Figura 3: Estructura de N-(2-(2-(3-(2-aminoetoxi)fenilamino)-5-cloropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida (CZC31326).
- 20 Figura 4: Experimento de Kinobeads con el compuesto inmovilizado (figura 3, CZC31326) para análisis de espectrometría de masas de proteínas capturadas. Se muestra un gel de proteína tras teñir con azul brillante de Coomassie. El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 2 con lisado de células HL60. Las proteínas unidas a la matriz de afinidad se eluyeron con tampón de muestras SDS y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Las áreas del gel indicadas se cortaron como rodajas de gel, las proteínas se trataron con tripsina y los péptidos marcados con ITRAQ se analizaron mediante espectrometría de masas. Carril izquierdo (P29577B): lisado de células tratado con compuesto libre CZC31326 10 µM; carril central: marcador de peso molecular de proteínas; carril derecho (P29578B): control de DMSO.
- 25 Figura 5: Secuencia de aminoácidos de IRAK1 humana (IPI00293652.1). Los péptidos identificados mediante espectrometría de masas están subrayados.
- 30 Figura 6: Secuencia de aminoácidos de IRAK3 humana (IPI00026984.1). Los péptidos identificados mediante espectrometría de masas están subrayados.
- 35 Figura 7: Secuencia de aminoácidos de IRAK4 humana (IPI00007641.2). Los péptidos identificados mediante espectrometría de masas están subrayados.
- 40 Figura 8: Experimento de Kinobeads con el compuesto inmovilizado (figura 3, CZC31326) para análisis de espectrometría de masas de proteínas capturadas a partir del lisado de células L-363. Se muestra un gel de proteína tras teñir con azul brillante de Coomassie. El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 3 con lisado de células L-363. Las proteínas unidas a la matriz de afinidad se eluyeron con tampón de muestras SDS y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Las áreas del gel indicadas se cortaron como rodajas de gel, las proteínas se trataron con tripsina y los péptidos marcados con ITRAQ se analizaron mediante espectrometría de masas. Carril izquierdo (P30161B): lisado de células tratado con compuesto libre CZC31326 10 µM; carril central: marcador de peso molecular de proteínas; carril derecho (P30162B): lisado de células tratado con DMSO al 0,4%.
- 45 Figura 9: Secuencia de aminoácidos de NIK humana (IPI00016099.1). Los péptidos identificados mediante espectrometría de masas están subrayados.
- 50 Figura 10: Experimento de Kinobeads con el compuesto inmovilizado (figura 2, CZC31326) y mezcla de lisado de placenta y HeLa. Se muestra un gel de proteína tras teñir con azul brillante de Coomassie. El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 4 con una mezcla de lisados de células de placenta y HeLa. Carril izquierdo (P29112B): lisado de células tratado con compuesto libre CZC31326 10 µM; carril central: marcador de peso molecular de proteínas; carril derecho (P29113B): lisado de células tratado con DMSO al 0,4%.
- 55 Figura 11: Experimento de Kinobeads con el compuesto inmovilizado (figura 2, CZC25342) y mezcla de lisado de HeLa y placenta. Se muestra un gel de proteína tras teñir con azul brillante de Coomassie. El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 5 con una mezcla de lisados de células de placenta y HeLa. Carril izquierdo (P28213B): lisado de células tratado con compuesto libre CZC25342 10 µM; carril central: marcador de peso molecular de proteínas; carril derecho (P28214B): lisado de células tratado con DMSO al 0,4%.
- 60 Figura 12: Experimento de obtención del perfil de selectividad para el compuesto de prueba CZC00019943 usando N-(2-(2-(3-(2-aminoetoxi)fenilamino)-5-cloropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida como compuesto de captura. El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 6.
- 65 Figura 13: Ensayo de unión de competición con referencia al compuesto 1 (CZC31326) en lisado de células HL60 y detección de IRAK1 e IRAK4 con anticuerpos específicos.
- El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 7. El compuesto de prueba (o DMSO como control de disolvente) y el lisado de células diluido se añadieron a la matriz de afinidad y se incubaron durante dos horas a 4°C. Tras lavar, las proteínas capturadas se eluyeron con tampón de muestras que contenía SDS. Tras aplicar muestras de eluato sobre membranas de nitrocelulosa, se detectó IRAK1 con un anticuerpo anti-IRAK1 e IRAK4 con anticuerpo anti-IRAK4 seguido por incubación con un anticuerpo de detección secundario marcado

fluorescentemente.

A: Curva de respuesta a la dosis para IRAK1 y CZC31326; $Cl_{50} = 0,15 \mu M$

5 B: Curva de respuesta a la dosis para IRAK4 y CZC31326; $Cl_{50} = 0,04 \mu M$

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la matriz de afinidad

10

Métodos analíticos

15 Se obtuvieron espectros de RMN en un instrumento Bruker dpx400. Se llevó a cabo CLEM en un instrumento Agilent 1100 usando una columna ZORBAX® SB-C18, 4,6 x 150 mm, 5 micrómetros o ZORBAX® SB-C18, 4,6 x 75 mm, 3,5 micrómetros. El flujo de la columna fue de 1 ml/min. y los disolventes usados fueron agua y acetonitrilo (ácido fórmico al 0,1%) con un volumen de inyección de 10 ul. Las longitudes de onda fueron de 254 y 210 nm. Los métodos se describen a continuación.

20 Método A

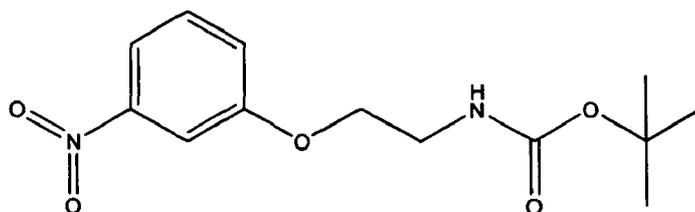
Columna: Gemini C18, 3 x 30 mm, 3 micrómetros. Flujo: 1,2 ml/min. Gradiente: Tabla 1

Tiempo (min.)	Agua	Acetonitrilo
0	95	5
3	5	95
4,5	5	95
4,6	95	5
5,00	PARADA	

25 Este ejemplo describe la síntesis de compuestos y métodos para su inmovilización sobre un soporte sólido proporcionando la matriz de afinidad usada en los siguientes ejemplos para la captura de cinasas a partir de lisados de células.

Síntesis de compuestos

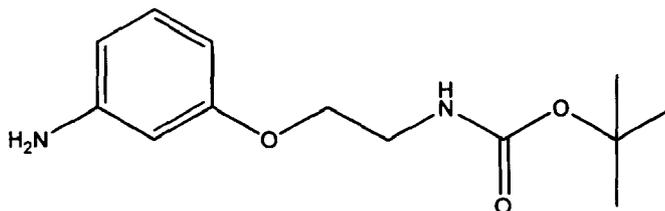
30



2-(3-Nitrofenoxi)etilcarbamato de terc-butilo

35 Se agitó una mezcla de 3-nitrofenol (272 mg), 2-bromoetilcarbamato de terc-butilo (439 mg) y carbonato de potasio (405 mg) durante la noche a 50°C en DMF (5 ml). Se enfrió la reacción, se diluyó con acetato de etilo (10 ml) y se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml). Se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se filtró y se eliminaron los disolventes a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna ultrarrápida (del 10% de éter en hexano al 60% de éter en hexano) 1H -RMN ($CDCl_3$) δ 7,08 (t, 1H), 6,34 (m, 2H), 6,25 (m, 1H), 5,02 (a, 1H), 3,99 (m, 2H), 3,54 (m, 2H), 1,47 (s, 9H); método de CLEM A, RT = 2,84 min.

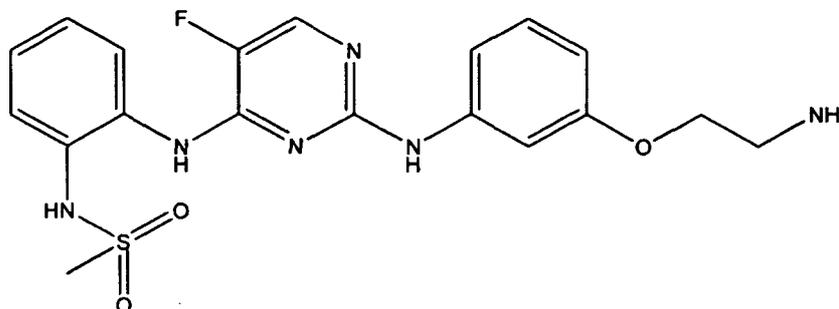
40



2-(3-Aminofenoxi)etilcarbamato de terc-butilo

45 Se agitaron 2-(3-nitrofenoxi)etilcarbamato de terc-butilo (225 mg) y paladio (al 10% sobre C, 10 mg) en metanol

(5 ml) bajo una atmósfera de hidrógeno durante 2 horas. Se filtró la reacción a través de Celite y se eliminaron los disolventes a presión reducida. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 6,76 (m, 4H), 4,90 (sa, 1H), 3,99 (m, 2H), 3,50 (m, 2H), 1,38 (s, 9H); método de CLEM A, RT = 1,84 min. M+H+ = 253

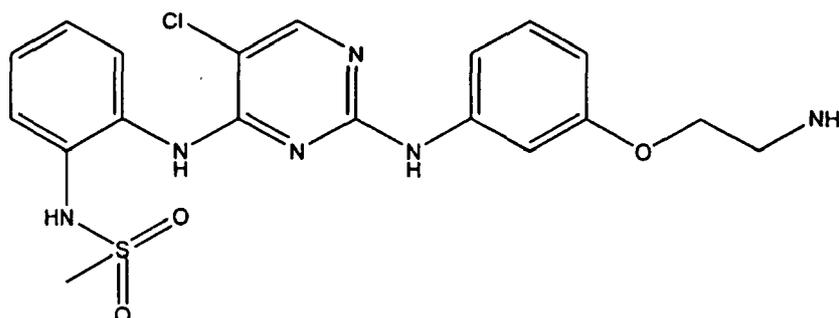


5

N-(2-(2-(3-(2-Aminoetoxi)fenilamino)-5-fluoropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida

Se calentaron *N*-(2-(2-cloro-5-fluoropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida (73 mg) y 2-(3-aminofenoxi)etilcarbamato de terc-butilo (58 mg) en *n*-butanol (1 ml) a 120°C en un microondas durante 3 h. Se eliminaron los disolventes a presión reducida y volvió a disolverse el residuo en metanol (1 ml) y HCl 4 M en dioxano (1 ml). Se dejó reposar la reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se eliminaron los disolventes a presión reducida y se purificó el residuo mediante HPLC prep. $^1\text{H-RMN}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ 9,22 (s, 1H), 8,84 (sa, 1H), 8,23 (s, 2H), 8,13 (d, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,38 (m, 2H), 7,22 (dd, 1H), 7,17 (m, 1H), 7,08 (t, 1H), 6,50 (m, 1H) 3,99 (t, 2H), 3,15 (t, 2H), 2,87 (s, 3H); método de CLEM A, RT = 1,54 min. M+H+ = 532

15



N-(2-(2-(3-(2-Aminoetoxi)fenilamino)-5-cloropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida

20

Se combinaron *N*-(2-(2,5-dicloropirimidin-4-ilamino)fenil)metanosulfonamida (106 mg, 1 eq., 0,32 mmol) y 2-(3-aminofenoxi)etilcarbamato de terc-butilo (80 mg, 0,32 mmol, 1 eq.) con alcohol isopropílico (2,0 ml) y ácido clorhídrico d.r. 1,18 (0,008 ml, 0,25 mmol, 0,8 eq.). Se calentó la mezcla de reacción y se agitó hasta 120°C durante 1 hora mediante microondas. Tras este tiempo, se eliminó el disolvente a vacío dando un sólido que se llevó a una disolución de ácido clorhídrico en etanol (2,0 M, 3,0 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18 horas. Se concentró la mezcla proporcionando un sólido de color beis que se purificó mediante cromatografía prep. $^1\text{H-RMN}$: ($\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ = 9,37 (s, 1H); 9,13 (s a, 1H); 8,25 (d, 1H); 8,15 (s, 1H); 7,39 (s, 1H); 7,24-7,28 (t m, 2H); 7,13 (t, 1H); 6,98 (t m, 1H); 6,88 (t, 1H); 6,54 (dd, 1H); 3,97 (t, 1H); 3,17 (s, 2H); 3,08 (t, 1H); 2,77 (s, 3H) método de CLEM A (MH+) = 449/451, RT = 1,66 min.

30

Tabla 2: Abreviaturas usadas

a	ancho
CDCl_3	deuterocloroformo
d	doblete
dd	doblete de dobletes
DMSO	dimetilsulfóxido
MH4OH	hidróxido de amonio
g	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HOBT	N-Hidroxibenzotriazol
m	multiplete
mg	miligramo
ml	mililitro

mmol	milimol
M	molar
MHz	megahercio
DMF	Dimetilformamida
Hz	Hercio
eq.	equivalente
DCM	Diclorometano
THF	Tetrahidrofurano
RMN	resonancia magnética nuclear
q	cuartete
s	singlete
t	triplete

Inmovilización de compuestos sobre perlas (matriz de afinidad)

5 Se equilibró Sepharose 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences, 17-0906-01) con DMSO anhidro (dimetilsulfóxido, Fluka, 41648, H₂O <= 0,005%). Se colocó 1 ml de perlas sedimentadas en un tubo Falcon de 15 ml, se añadió disolución madre de compuesto (habitualmente 100 mM en DMF o DMSO) (concentración final de perlas 0,2-2 µmol/ml) así como 15 µl de trietilamina (Sigma, T-0886, pura al 99%). Se incubaron las perlas a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador vertical (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 16 - 20 horas. Se determina la eficacia de acoplamiento mediante HPLC. Se bloquearon grupos NHS que no reaccionaron mediante incubación con aminoetanol a temperatura ambiente en el agitador vertical durante la noche. Se lavaron las perlas con 10 ml de DMSO y se almacenaron en isopropanol a -20°C. Se usaron estas perlas como matriz de afinidad en los siguientes ejemplos. Se generaron perlas control (sin compuesto inmovilizado) bloqueando los grupos NHS mediante incubación con aminoetanol tal como se describió anteriormente.

15 **Ejemplo 2: Experimento de Kinobeads usando compuesto inmovilizado y lisado de células HL60**

Este ejemplo demuestra el uso de un compuesto inmovilizado (estructura mostrada en la figura 3, CZC31326) para la captura e identificación de cinasas a partir de lisado de células en un ensayo de unión de competición. A una alícuota de lisado de células se le añadió 10 µM del compuesto libre (figura 3, CZC31326) y se dejó que se uniera a proteínas en el lisado. Entonces se añadió la matriz de afinidad con el compuesto inmovilizado (ejemplo 1) para capturar proteínas que no estaban interaccionando con el compuesto libre previamente añadido. Se separaron las perlas del lisado y se eluyeron las proteínas unidas a las perlas en tampón de muestras de SDS y posteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (figura 4). Se cortaron bandas de gel adecuadas y se sometieron a digestión proteolítica en el gel con tripsina. Se procesó la segunda alícuota de lisado de manera idéntica, sin embargo no se añadió compuesto libre (control de disolvente de DMSO). Se marcaron los péptidos que se originaban a partir de las muestras 1 y 2 con reactivos iTRAQ (iTRAQ 114 e iTRAQ 117) y se analizaron las muestras combinadas con un sistema de cromatografía de líquidos Nanoflow acoplado en línea a un experimento de espectrómetro de masas en tándem (CL-EM/EM) seguido por cuantificación del ión indicador iTRAQ en los espectros de EM/EM (Ross *et al.*, 2004. Mol. Cell. Proteomics 3(12):1154-1169). Pueden encontrarse protocolos experimentales adicionales en el documento WO2006/134056 y una publicación previa (Bantscheff *et al.*, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044).

Se muestran las cinasas identificadas en la tabla 4, que incluye los valores de competición en porcentaje para la muestra a la que se le había añadido compuesto libre 10 µM. En total, se identificaron 98 cinasas diferentes y competían en diferentes grados. Para ilustración, se muestran los péptidos identificados para IRAK1, IRAK3 e IRAK4 en las figuras 5, 6 y 7.

1. Cultivo celular

40 O bien se obtuvieron células HL60 (DSMZ n.º ACC3) de un proveedor externo (CIL SA, Mons, Bélgica) o bien se hicieron crecer en frascos Spinner de un litro (Integra Biosciences, n.º 182101) en suspensión en medio RPMI 1640 (Invitrogen, n.º 21875-034) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen, n.º 10270-106). Se recogieron las células mediante centrifugación, se lavaron una vez con tampón 1 x PBS (Invitrogen, n.º 14190-094) y se congelaron los sedimentos de células en nitrógeno líquido y se almacenaron posteriormente a -80°C.

2. Preparación de lisados de células

50 Se homogeneizaron las células en un homogeneizador Potter S en tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM, NP40 0,8%, glicerol al 5%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaF 25 mM, vanadato de sodio 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,5. Se añadió un comprimido libre de EDTA completo (cóctel inhibidor de proteasas, Roche Diagnostics, 1 873 580) por 25 ml de tampón. Se homogeneizó mecánicamente el material 20 veces usando un instrumento POTTER S mecanizado, se transfirió a tubos Falcon de 50 ml, se incubó durante 30 minutos rotando a 4°C y se centrifugó durante 10 minutos a 20.000 x g a 4°C (10.000 rpm en Sorvall SLA600, preenfriado). Se transfirió el sobrenadante a un tubo de (UZ)-

policarbonato de ultracentrífuga (Beckmann, 355654) y se centrifugó durante 1 hora a 145.000 x g a 4°C (40.000 rpm en Ti50.2, preenfriado). Se transfirió el sobrenadante de nuevo a un tubo Falcon de 50 ml nuevo, se determinó la concentración de proteína mediante un ensayo Bradford (BioRad) y se prepararon muestras que contenían 50 mg de proteína por alícuota. Se usaron inmediatamente las muestras para los experimentos o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron congeladas a -80°C.

3. Captura de cinasas de lisado de células

Se equilibraron perlas de Sepharose con el compuesto inmovilizado (100 µl de perlas por experimento de extracción) en tampón de lisis y se incubaron con una muestra de lisado de células que contenía 50 mg de proteína en un agitador vertical (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 2 horas a 4°C. Se recogieron las perlas, se transfirieron a columnas Mobicol (Mo-BiTech 10055) y se lavaron con 10 ml de tampón de lisis que contenía detergente NP40 al 0,4%, seguido por 5 ml de tampón de lisis que contenía detergente al 0,2%. Para eluir las proteínas unidas, se añadieron 60 µl de tampón de muestras 2x SDS a la columna. Se incubó la columna durante 30 minutos a 50°C y se transfirió el eluato a un tubo de microcentrífuga siliconizado mediante centrifugación. Se alquilaron las proteínas con yodoacetamida 108 mM. Se separaron entonces las proteínas mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

4. Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas

4.1 Digestión de las proteínas antes del análisis espectrométrico de masas

Se digirieron en el gel las proteínas separadas en el gel siguiendo esencialmente un procedimiento descrito anteriormente (Shevchenko *et al.*, 1996, Anal. Chem. 68:850-858). En resumen, se cortaron del gel las proteínas separadas en el gel usando un bisturí limpio, se eliminó la tinción dos veces usando 100 µl de tampón bicarbonato de trietilamonio 5 mM (TEAB; Sigma T7408) y etanol al 40% en agua y se deshidrataron en etanol absoluto. Se digirieron posteriormente las proteínas en el gel con tripsina porcina (Promega) a una concentración de proteasa de 10 ng/µl en TEAB 5 mM. Se dejó que la digestión prosiguiera durante 4 horas a 37°C y se detuvo posteriormente la reacción usando 5 µl de ácido fórmico al 5%.

4.2 Preparación de las muestras antes del análisis mediante espectrometría de masas

Se extrajeron tapones de gel dos veces con 20 µl de ácido fórmico al 1% y tres veces con concentraciones crecientes de acetonitrilo. Se agruparon posteriormente los extractos con sobrenadantes de digestión acidificados y se secaron en una centrifuga de vacío.

4.3 Marcaje con iTRAQ de extractos de péptidos

Se trataron los extractos de péptidos de muestras tratadas con 10 µM de compuesto libre (CZC31326) y el control de disolvente (DMSO al 0,5%) con diferentes variantes del reactivo de marcaje isobárico (kit multiplex de reactivos iTRAQ, número de parte 4352135, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los reactivos iTRAQ son un conjunto de reactivos de isótopo estable, específicos de amino, multiplexados que pueden marcar péptidos en grupos amino en hasta cuatro muestras biológicas diferentes permitiendo la identificación y cuantificación simultáneas de péptidos. Se usaron los reactivos iTRAQ según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se resuspendieron las muestras en 10 µl de disolución de TEAB 50 mM, pH 8,5 y se añadieron 10 µl de etanol. Se disolvió el reactivo iTRAQ en 120 µl de etanol y se añadieron 10 µl de disolución de reactivo a la muestra. Se realizó la reacción de marcaje a temperatura ambiente durante una hora en un agitador horizontal y se detuvo añadiendo 5 µl de TEAB 100 mM y glicina 100 mM en agua. Se combinaron entonces las dos muestras marcadas, se secaron en una centrifuga de vacío y se resuspendieron en 10 µl de ácido fórmico al 0,1% en agua.

4.4 Adquisición de datos espectrométricos de masas

Se inyectaron muestras de péptidos en un sistema de nano CL (CapLC, Waters o nano-LC 1D+, Eksigent) que se acopló directamente o bien a un espectrómetro de masas de cuadrupolo TOF (QTOF Ultima, QTOF Micro, Waters), o bien a una trampa iónica (LTQ) o bien a un instrumento Orbitrap. Se separaron los péptidos en el sistema de CL usando un gradiente de disolventes acuosos y orgánicos (véase a continuación). El disolvente A era ácido fórmico al 0,1% y el disolvente B era acetonitrilo al 70% en ácido fórmico al 0,1%.

Tabla 3: Elución de péptidos del sistema de CL

Tiempo (min.)	% de disolvente A	% de disolvente B
0	95	5
8,0	95	5
15	85	15

64,5	60	40
84,5	38	62
87	5	95
91	250	95
91,5	2095	5

4.5 Identificación de proteínas

- 5 Se usaron los datos de fragmentación y masa de los péptidos generados en los experimentos de CL-EM/EM para consultar una base de datos de proteínas que consiste en una versión exclusiva interna de la base de datos de secuencias de proteínas International Protein Index (IPI) combinada con una versión simulada de esta base de datos (Elias y Gygi, 2007, Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods* 4, 207-214). Se identificaron las proteínas correlacionando los datos de fragmentación y masa de péptidos medidos con los datos computados a partir de las entradas en la base de datos usando la herramienta de software Mascot (Matrix Science; Perkins *et al.*, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567). Los criterios de búsqueda variaban dependiendo de qué espectrómetro de masas se usó para el análisis. Se ajustaron los umbrales de aceptación de proteínas para lograr una tasa de falsos descubrimientos inferior al 1% tal como se sugiere por las tasas de acierto en la base de datos simulada (Elias y Gygi, 2007, Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods* 4, 207-214).

4.6 Cuantificación de proteínas

- 20 Se realizó la cuantificación de proteínas relativa usando las áreas de picos de señales iónicas de indicador iTRAQ esencialmente tal como se describió en una publicación anterior (Bantscheff *et al.*, 2007. *Nature Biotechnology* 25, 1035-1044).

Tabla 4: Cinasas identificadas con CZC31326 a partir del lisado de HL60

Secuencia representativa	Nombre de la cinasa	Grupo de la cinasa	Espectros cuantificados	Péptidos redundantes	% de competición
IPI00479760.6	AAK1	Otro	200	839	97,8
IPI00552750.2	ACK	TK	12	14	93,6
IPI00005732.1	ALK4	TKL	4	7	94,5
IPI00410287.3	AMPKa1	CAMK	146	230	97,7
IPI00298940.3	AurA	Otro	142	173	96,6
IPI00796914.1	AurB	Otro	21	27	95
IPI00337426.1	BIKE	Otro	110	338	97,6
IPI00029132.3	BTK	TK	167	199	97,1
IPI00828081.1	CaMK2d	CAMK	15	38	90,4
IPI00169392.5	CaMK2g	CAMK	117	413	90,4
IPI00290239.2	CaMKK2	Otro	72	410	98,1
IPI00026689.4	CDC2	CMGC	60	86	93,1
IPI00014873.2	CDK10	CMGC	9	33	96,7
IPI00031681.1	CDK2	CMGC	76	114	95,1
IPI00023530.6	CDK5	CMGC	143	214	95,2
IPI00552413.2	CDK9	CMGC	51	144	98,2
IPI00023664.3	CHK1	CAMK	14	18	95,7
IPI00016613.2	CK2a1	Otro	141	408	97,9
IPI00020602.1	CK2a2	Otro	79	138	97,7
IPI00848015.1	CLK1	CMGC	6	18	97,4
IPI00021175.1	CRK7	CMGC	37	49	92,1
IPI00013212.1	CSK	TK	8	18	80,3
IPI00296337.2	DNAPK	Atípico	42	200	75,5
IPI00014344.1	DYRK1A	CMGC	45	168	96,1
IPI00005222.2	EphB6	TK	18	18	93,6
IPI00018195.3	Erk1	CMGC	12	24	84,8
IPI00003479.3	Erk2	CMGC	197	260	75,8
IPI00029263.2	FER	TK	151	378	97,7
IPI00294344.2	FES	TK	218	390	96,3
IPI00787531.1	GAK	Otro	169	209	97,9
IPI00149094.4	GCK	STE	21	52	96,5
IPI00292228.1	GSK3A	CMGC	101	204	96,2

ES 2 423 804 T3

IPI00216190.1	GSK3B	CMGC	80	185	96,1
IPI00747261.1	HIPK1	CMGC	10	65	97,1
IPI00289892.1	HIPK2	CMGC	4	24	94,4
IPI00020258.3	HPK1	STE	88	127	97,7
IPI00029045.1	IKKe	Otro	17	25	91,4
IPI00293652.1	IRAK1	TKL	25	131	94,9
IPI00026984.1	IRAK3	TKL	109	131	97,2
IPI00007641.2	IRAK4	TKL	79	85	97,5
IPI00015974.1	IRE1	Otro	10	10	95,1
IPI00011633.3	JAK1	TK	159	208	97,8
IPI00031016.1	JAK2	TK	53	60	96,8
IPI00024672.1	JNK1	CMGC	80	335	88,8
IPI00303550.2	JNK2	CMGC	85	522	87,8
IPI00294842.3	KHS1	STE	6	7	93,2
IPI00515097.3	LCK	TK	4	12	86,8
IPI00304742.4	LOK	STE	9	26	95,3
IPI00794835.1	LRRK2	TKL	10	56	71,7
IPI00219604.3	MAP2K1	STE	6	9	85,2
IPI00218858.1	MAP2K3	STE	20	53	90,9
IPI00185860.4	MAP2K5	STE	32	38	93,1
IPI00787127.1	MAP3K1	STE	52	183	87
IPI00513803.3	MAP3K2	STE	34	50	96,3
IPI00181703.1	MAP3K3	STE	14	58	97,6
IPI00386260.3	MAP3K4	STE	63	222	97,2
IPI00412433.1	MAP3K5	STE	92	160	88,4
IPI00555838.1	MARK2	CAMK	64	513	97,1
IPI00183118.4	MARK3	CAMK	32	242	97,2
IPI00000977.1	MLK3	TKL	44	51	96,5
IPI00142487.2	MLK4	TKL	25	50	95
IPI00306833.3	MPSK1	Otro	9	10	93,4
IPI00335101.1	MSK1	AGC	11	15	94,7
IPI00022536.1	MSK2	AGC	30	72	96,8
IPI00011488.4	MST1	STE	11	13	97,7
IPI00292827.3	MST4	STE	6	12	96,1
IPI00384765.2	MYT1	Otro	25	55	90,5
IPI00465101.5	NEK3	Otro	37	96	97
IPI00301609.8	NEK9	Otro	133	302	93
IPI00014068.1	PAK4	STE	88	168	97,5
IPI00012891.1	PHKg2	CAMK	26	31	96,6
IPI00009688.1	PIP5K2A	Lípido cinasa	17	26	97,6
IPI00152303.7	PIP5K2C	Lípido cinasa	35	62	98,3
IPI00843864.1	PITSLRE	CMGC	8	140	94,8
IPI00385449.4	PKCa	AGC	6	16	96,2
IPI00219628.3	PKCb	AGC	15	50	97,3
IPI00009334.4	PKD2	CAMK	87	138	97,9
IPI00015538.1	PKD3	CAMK	23	53	96,9
IPI00412672.1	PKN1	AGC	35	47	97
IPI00844111.1	PKN2	AGC	5	28	93,9
IPI00021248.1	PLK1	Otro	25	31	97,8
IPI00410344.2	PLK4	Otro	6	9	91,7
IPI00029702.1	PYK2	TK	199	394	95,7
IPI00465291.3	QIK	CAMK	6	8	94,2
IPI00013983.1	RET	TK	71	96	97,1
IPI00020898.1	RSK2	AGC	80	171	96,7
IPI00477982.1	RSK3	AGC	160	268	96,9
IPI00022827.1	SLK	STE	72	184	97,5
IPI00302351.2	STK33	CAMK	34	48	96,9
IPI00018597.1	SYK	TK	302	372	95,6
IPI00410485.2	TAO3	STE	53	68	98
IPI00293613.2	TBK1	Otro	192	243	94,8
IPI00000878.3	TEC	TK	34	80	97
IPI00005733.1	TGFbR1	TKL	8	22	95,6
IPI00022353.4	TYK2	TK	53	61	97,1

IPI00411818.4	ULK3	Otro	40	47	97,7
IPI00025830.1	Wee1	Otro	75	85	98,2
IPI00013981.4	YES	TK	18	20	91,1

Ejemplo 3: Experimento de Kinobeads usando compuesto inmovilizado y lisado de células L-363

5 Este ejemplo demuestra el uso de un compuesto inmovilizado (estructura mostrada en la figura 3, CZC31326) para la captura e identificación de cinasas a partir del lisado de células L-363 en un ensayo de unión de competición. A una alícuota de lisado de células se le añadió 10 μ M del compuesto libre (figura 3, CZC31326) y se dejó que se uniera a proteínas en el lisado. Entonces se añadió la matriz de afinidad con el compuesto inmovilizado para capturar proteínas que no estaban interaccionando con el compuesto libre previamente añadido. Se separaron las perlas del lisado y se eluyeron las proteínas unidas a perlas en tampón de muestras SDS y se separaron posteriormente mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (figura 8). Se cortaron bandas de gel adecuadas y se sometieron a digestión proteolítica en el gel con tripsina. Se procesó la segunda alícuota de lisado de manera idéntica, sin embargo no se añadió compuesto libre (control de disolvente de DMSO). Se marcaron los péptidos que se originaban a partir de las muestras 1 y 2 con reactivos iTRAQ (iTRAQ 114 e iTRAQ 117) y se analizaron las muestras combinadas con un sistema de cromatografía de líquidos Nanoflow acoplado en línea a un experimento de espectrómetro de masas en tándem (CL-EM/EM) seguido por cuantificación del ión indicador iTRAQ en los espectros de EM/EM tal como se describió en el ejemplo 2.

20 Para este experimento, se usó la línea de leucemia de células plasmáticas humanas L-363 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ número ACC49, Braunschweig, Alemania). Se trataron las células durante tres horas con 20 μ M del inhibidor del proteosoma MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, Sigma C2211) antes de la recogida de células.

25 Se muestran las cinasas identificadas en la tabla 5 que incluye los valores de competición en tanto por ciento para la muestra a la que se había añadido compuesto libre 10 μ M. En total se identificaron 93 cinasas diferentes y competían en diferentes grados. Para ilustración, se muestran los péptidos identificados para NIK en la figura 9.

Tabla 5: Cinasas identificadas con CZC31326 a partir de lisados de células L-363

Secuencia representativa	Nombre de la cinasa	Grupo de la cinasa	Espectros identificados	Péptidos redundantes	% de competición
IPI00479760.6	AAK1	Otro	144	435	97,4
IPI00787836.1	ADCK1	Atípico	10	25	93,8
IPI00029219.1	ALK2	TKL	10	11	95,7
IPI00410287.3	AMPKa1	CAMK	93	172	97,7
IPI00329488.4	ARG	TK	7	48	95,8
IPI00298940.3	AurA	Otro	39	47	97
IPI00004497.2	BCR	Atípico	10	13	93,6
IPI00337426.1	BIKE	Otro	54	162	97
IPI00029132.3	BTK	TK	32	35	95,7
IPI00828081.1	CaMK2d	CAMK	98	775	78
IPI00169392.5	CaMK2q	CAMK	77	386	75,9
IPI00290239.2	CaMKK2	Otro	38	218	97
IPI00026689.4	CDC2	CMGC	44	54	95,1
IPI00031681.1	CDK2	CMGC	58	76	95,2
IPI00023530.6	CDK5	CMGC	128	190	96,4
IPI00552413.2	CDK9	CMGC	16	44	97,7
IPI00023664.3	CHK1	CAMK	6	8	94,8
IPI00016613.2	CK2a1	Otro	61	199	97,9
IPI00020602.1	CK2a2	Otro	64	87	97,5
IPI00296337.2	DNAPK	Atípico	137	296	84
IPI00014934.1	DRAK2	CAMK	4	5	93,3
IPI00014344.1	DYRK1A	CMGC	14	90	96,5
IPI00018195.3	Erk1	CMGC	8	37	83,2
IPI00003479.3	Erk2	CMGC	52	90	74,4
IPI00029263.2	FER	TK	125	290	97,8
IPI00787531.1	GAK	Otro	109	143	98,2
IPI00149094.4	GCK	STE	4	8	95,1
IPI00292228.1	GSK3A	CMGC	23	46	96,9
IPI00216190.1	GSK3B	CMGC	35	112	94,6
IPI00289892.1	HIPK2	CMGC	12	45	95,6
IPI00020258.3	HPK1	STE	75	100	98

ES 2 423 804 T3

IPI00328149.3	HRI	Otro	5	12	95,8
IPI00029045.1	IKKe	Otro	44	54	89,4
IPI00025803.3	INSR	TK	6	36	90,1
IPI00293652.1	IRAK1	TKL	28	107	95,1
IPI00007641.2	IRAK4	TKL	32	39	97,4
IPI00015974.1	IRE1	Otro	25	30	97,9
IPI00011633.3	JAK1	TK	340	400	97,2
IPI00031016.1	JAK2	TK	44	51	96,1
IPI00219418.2	JAK3	TK	84	109	98,1
IPI00024672.1	JNK1	CMGC	31	85	87
IPI00303550.2	JNK2	CMGC	29	174	88
IPI00304742.4	LOK	STE	4	8	86,9
IPI00298625.2	LYN	TK	26	35	94,5
IPI00218858.1	MAP2K3	STE	5	15	93,9
IPI00185860.4	MAP2K5	STE	12	13	97,5
IPI00003814.1	MAP2K6	STE	32	36	94,2
IPI00787127.1	MAP3K1	STE	50	60	96,2
IPI00513803.3	MAP3K2	STE	30	50	96
IPI00181703.1	MAP3K3	STE	5	30	97,4
IPI00386260.3	MAP3K4	STE	12	39	95,8
IPI00412433.1	MAP3K5	STE	9	40	91,3
IPI00555838.1	MARK2	CAMK	32	392	97
IPI00183118.4	MARK3	CAMK	19	108	97
IPI00000977.1	MLK3	TKL	8	8	97,5
IPI00306833.3	MPSK1	Otro	7	8	93,3
IPI00022536.1	MSK2	AGC	18	42	94,2
IPI00011488.4	MST1	STE	73	125	98,3
IPI00411984.4	MST2	STE	35	68	98,2
IPI00384765.2	MYT1	Otro	20	46	93,1
IPI00747017.1	NEK1	Otro	30	99	95,7
IPI00465101.5	NEK3	Otro	31	41	96,8
IPI00396662.2	NEK6	Otro	8	29	83,7
IPI00152658.1	NEK7	Otro	8	16	93,9
IPI00301609.8	NEK9	Otro	139	312	92,4
IPI00016099.1	NIK	STE	17	20	98
IPI00008883.3	NuaK2	CAMK	6	9	96,7
IPI00014068.1	PAK4	STE	60	89	97,3
IPI00012891.1	PHKg2	CAMK	9	10	94,1
IPI00070943.3	PIK4Ca	Lípido cinasa	5	6	86
IPI00009688.1	PIP5K2A	Lípido cinasa	4	5	96,4
IPI00152303.7	PIP5K2C	Lípido cinasa	11	13	92
IPI00009334.4	PKD2	CAMK	49	101	98
IPI00015538.1	PKD3	CAMK	80	131	98,1
IPI00412672.1	PKN1	AGC	12	14	95,9
IPI00021248.1	PLK1	Otro	27	33	96,8
IPI00410344.2	PLK4	Otro	7	9	91,2
IPI00029702.1	PYK2	TK	315	866	96,1
IPI00465291.3	QIK	CAMK	11	12	96,5
IPI00021917.1	RIPK2	TKL	24	24	95,5
IPI00020898.1	RSK2	AGC	40	86	97,7
IPI00477982.1	RSK3	AGC	86	165	96,9
IPI00007123.1	RSK4	AGC	24	48	96,7
IP100022827.1	SLK	STE	17	50	95
IPI00302351.2	STK33	CAMK	51	67	95,7
IPI00410485.2	TAO3	STE	11	12	94,7
IPI00293613.2	TBK1	Otro	151	190	95,8
IPI00000878.3	TEC	TK	54	134	92,8
IPI00022353.4	TYK2	TK	111	127	96,9
IPI00289357.4	ULK1	Otro	8	12	96,5
IPI00411818.4	ULK3	Otro	18	20	98,5
IPI00025830.1	Wee1	Otro	51	63	96,4
IPI00013981.4	YES	TK	29	51	89,6

Ejemplo 4: Experimento de Kinobeads usando compuesto inmovilizado CZC31326 y lisados de células de placenta HeLa mixtos

Este ejemplo demuestra el uso de un compuesto inmovilizado (estructura mostrada en la figura 3, CZC31326) para la captura e identificación de cinasas a partir de lisados de placenta HeLa mixtos (Bantscheff *et al.*, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044) en un ensayo de unión de competición. A una alícuota de lisado de células se le añadió 10 μ M del compuesto libre (figura 3, CZC31326) y se dejó que se uniera a proteínas en el lisado. Entonces se añadió la matriz de afinidad con el compuesto inmovilizado para capturar proteínas que no estaban interactuando con el compuesto libre previamente añadido. Se separaron las perlas del lisado y se eluyeron las proteínas unidas a las perlas en tampón de muestras de SDS y posteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (figura 10). Se cortaron bandas de gel adecuadas y se sometieron a digestión proteolítica en el gel con tripsina. Se procesó la segunda alícuota de lisado de manera idéntica, sin embargo no se añadió compuesto libre (control de disolvente de DMSO). Se marcaron los péptidos que se originaban a partir de las muestras 1 y 2 con reactivos iTRAQ (iTRAQ 114 e iTRAQ 117) y se analizaron las muestras combinadas con un sistema de cromatografía de líquidos Nanoflow acoplado en línea a un experimento de espectrómetro de masas en tándem (CL-EM/EM) seguido por cuantificación del ión indicador iTRAQ en los espectros de EM/EM tal como se describió en el ejemplo 2.

Se muestran las cinasas identificadas en la tabla 6 que incluye los valores de competición en tanto por ciento para la muestra a la que se le había añadido compuesto libre 10 μ M. En total se identificaron 88 cinasas diferentes y competían en diferentes grados.

Tabla 6: Cinasas identificadas a partir de la mezcla de lisado de placenta HeLa con CZC31326

Secuencia representativa	Nombre de la cinasa	Grupo de la cinasa	Espectros cuantificados	Péptidos redundantes	% de competición
IPI00479760.6	AAK1	Otro	323	868	94,5
IPI00029219.1	ALK2	TKL	7	7	94,3
IPI00410287.3	AMPKa1	CAMK	192	379	94,9
IPI00307755.3	AMPKa2	CAMK	26	64	95,2
IPI00329488.4	ARG	TK	9	39	91,2
IPI00298940.3	AurA	Otro	113	153	94
IPI00796914.1	AurB	Otro	10	18	90,8
IPI00004497.2	BCR	Atípico	4	8	90,2
IPI00337426.1	BIKE	Otro	20	80	92,9
IPI00828081.1	CaMK2d	CAMK	109	939	72,1
IPI00169392.5	CaMK2g	CAMK	232	1027	84,8
IPI00657696.1	CaMKK1	Otro	8	40	94,2
IPI00290239.2	CaMKK2	Otro	52	173	94,3
IPI00026689.4	CDC2	CMGC	30	42	93,4
IPI00031681.1	CDK2	CMGC	72	117	93
IPI00023530.6	CDK5	CMGC	104	153	92,6
IPI00552413.2	CDK9	CMGC	23	68	95,3
IPI00016613.2	CK2a1	Otro	70	182	94,6
IPI00020602.1	CK2a2	Otro	54	72	95,4
IPI00296337.2	DNAPK	Atípico	77	278	69,2
IPI00018195.3	Erk1	CMGC	18	49	77,8
IPI00003479.3	Erk2	CMGC	66	117	68,5
IPI00413961.3	FAK	TK	271	796	93,8
IPI00029263.2	FER	TK	90	224	95,3
IPI00294344.2	FES	TK	52	71	95,1
IPI00293565.4	FLT4	TK	63	90	89,3
IPI00787531.1	GAK	Otro	144	177	93,6
IPI00149094.4	GCK	STE	22	56	93,8
IPI00292228.1	GSK3A	CMGC	72	154	93,7
IPI00216190.1	GSK3B	CMGC	74	178	93,3
IPI00029045.1	IKKe	Otro	24	35	89,7
IPI00026984.1	IRAK3	TKL	8	8	92
IPI00007641.2	IRAK4	TKL	74	82	93,8
IPI00015974.1	IRE1	Otro	6	8	91,8
IPI00011633.3	JAK1	TK	206	260	95
IPI00024672.1	JNK1	CMGC	42	157	85
IPI00303550.2	JNK2	CMGC	93	402	83,1
IPI00021396.1	KDR	TK	5	8	90

IPI00794835.1	LRRK2	TKL	9	43	85,2
IPI00298625.2	LYN	TK	10	21	76,1
IPI00219604.3	MAP2K1	STE	4	8	83,7
IPI00185860.4	MAP2K5	STE	29	98	90,4
IPI00003814.1	MAP2K6	STE	16	19	89,2
IPI00513803.3	MAP3K2	STE	37	46	93,9
IPI00386260.3	MAP3K4	STE	21	72	92,2
IPI00412433.1	MAP3K5	STE	28	114	86
IPI00418221.3	MAP3K6	STE	14	27	84,3
IPI00412740.5	MAP3K7	STE	9	15	82,1
IPI00555838.1	MARK2	CAMK	64	734	93,7
IPI00183118.4	MARK3	CAMK	26	222	93,1
IPI00000977.1	MLK3	TKL	56	59	93,8
IPI00142487.2	MLK4	TKL	4	14	88,9
IPI00306833.3	MPSK1	Otro	7	8	91,5
IPI00640957.2	MRCKa	AGC	28	216	92,1
IPI00477763.3	MRCKb	AGC	117	160	94
IPI00022536.1	MSK2	AGC	33	80	95,3
IPI00011488.4	MST1	STE	17	26	94,6
IPI00411984.4	MST2	STE	8	16	93,9
IPI00465101.5	NEK3	Otro	19	39	94,8
IPI00301609.8	NEK9	Otro	234	546	89
IPI00014068.1	PAK4	STE	221	318	94,2
IPI00012891.1	PHKg2	CAMK	4	4	89,9
IPI00009688.1	PIP5K2A	Lípido cinasa	6	10	95
IPI00152303.7	PIP5K2C	Lípido cinasa	58	91	95,4
IPI00385449.4	PKCa	AGC	10	16	94,9
IPI00009334.4	PKD2	CAMK	28	44	95,4
IPI00015538.1	PKD3	CAMK	15	26	95,7
IPI00436355.1	PKG1	AGC	37	92	90,4
IPI00412672.1	PKN1	AGC	10	11	93,7
IPI00844111.1	PKN2	AGC	16	43	94
IPI00021248.1	PLK1	Otro	40	46	94,7
IPI00029702.1	PYK2	TK	46	121	92,7
IPI00021917.1	RIPK2	TKL	13	17	92,2
IPI00020898.1	RSK2	AGC	50	112	96
IPI00477982.1	RSK3	AGC	106	210	94,8
IPI00022827.1	SLK	STE	53	130	93,2
IPI00328867.6	SRC	TK	17	88	92,2
IPI00018597.1	SYK	TK	39	58	93,4
IPI00410485.2	TAO3	STE	28	37	94,4
IPI00293613.2	TBK1	Otro	224	281	93,8
IPI00000878.3	TEC	TK	35	80	89,2
IPI00005733.1	TGFbR1	TKL	5	16	90,8
IPI00412829.1	TIE2	TK	20	23	91,6
IPI00022633.3	TNK1	TK	76	123	94,3
IPI00022353.4	TYK2	TK	74	96	93,8
IPI00411818.4	ULK3	Otro	52	74	94,6
IPI00025830.1	Wee1	Otro	45	56	95,2
IPI00013981.4	YES	TK	65	109	90,3

Ejemplo 5: Experimento de Kinobeads usando el compuesto inmovilizado CZC25342 y lisados de células de placenta HeLa mixtos

- 5 Este ejemplo demuestra el uso de un compuesto inmovilizado (figura 2, CZC25342) para la captura e identificación de cinasas a partir de lisados de placenta HeLa mixtos (Bantscheff *et al.*, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044) en un ensayo de unión de competición. A una alícuota de lisado de células se le añadió 10 μ M del compuesto libre (figura 2, CZC25342) y se dejó que se uniera a proteínas en el lisado. Entonces se añadió la matriz de afinidad con el compuesto inmovilizado para capturar proteínas que no estaban interactuando con el compuesto libre
- 10 previamente añadido. Se separaron las perlas del lisado y se eluyeron las proteínas unidas a las perlas en tampón de muestras de SDS y posteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (figura 11). Se cortaron bandas de gel adecuadas y se sometieron a digestión proteolítica en el gel con tripsina. Se procesó la segunda alícuota de lisado de manera idéntica, sin embargo no se añadió compuesto libre (control de disolvente

de DMSO). Se marcaron los péptidos que se originaban a partir de las muestras 1 y 2 con reactivos iTRAQ (iTRAQ 114 e iTRAQ 117) y se analizaron las muestras combinadas con un sistema de cromatografía de líquidos Nanoflow acoplado en línea a un experimento de espectrómetro de masas en tándem (CL-EM/EM) seguido por cuantificación del ión indicador iTRAQ en los espectros de EM/EM tal como se describió en el ejemplo 2.

5 Se muestran las cinasas identificadas en la tabla 7 que incluye los valores de competición en tanto por ciento para la muestra a la que se le había añadido compuesto libre 10 μ M. En total se identificaron 83 cinasas diferentes y competían en diferentes grados.

10 Tabla 7: Cinasas identificadas a partir de la mezcla de lisado de placenta HeLa con CZC25342

Secuencia representativa	Nombre de la cinasa	Grupo de la cinasa	Espectros cuantificados	Péptidos redundantes	% de competición
IPI00479760.6	AAK1	Otro	190	620	95,6
IPI00029219.1	ALK2	TKL	15	23	96,4
IPI00410287.3	AMPKa1	CAMK	171	660	95,2
IPI00307755.3	AMPKa2	CAMK	18	53	97,1
IPI00298940.3	AurA	Otro	139	179	93,6
IPI00796914.1	AurB	Otro	23	31	93,1
IPI00337426.1	BIKE	Otro	15	46	94,8
IPI00005731.2	BMPR1A	TKL	5	7	84,1
IPI00828081.1	CaMK2d	CAMK	108	1486	40,6
IPI00169392.5	CaMK2g	CAMK	274	1352	75,2
IPI00290239.2	CaMKK2	Otro	50	240	96,3
IPI00026689.4	CDC2	CMGC	18	22	94,3
IPI00023530.6	CDK5	CMGC	15	20	92,6
IPI00552413.2	CDK9	CMGC	21	34	97,6
IPI00016613.2	CK2a1	Otro	96	310	95,2
IPI00020602.1	CK2a2	Otro	82	153	95,4
IPI00657861.1	DDR1	TK	8	24	94,1
IPI00296337.2	DNAPK	Atípico	14	48	89,2
IPI00003479.3	Erk2	CMGC	16	28	48,5
IPI00413961.3	FAK	TK	133	447	96
IPI00029263.2	FER	TK	89	284	96,7
IPI00294344.2	FES	TK	44	72	96,9
IPI00293565.4	FLT4	TK	99	226	88,2
IPI00219012.4	FYN	TK	8	35	93,2
IPI00787531.1	GAK	Otro	42	78	95,9
IPI00292228.1	GSK3A	CMGC	50	145	94,6
IPI00216190.1	GSK3B	CMGC	56	215	92,5
IPI00099522.2	HIPK3	CMGC	5	10	95,4
IPI00029045.1	IKKe	Otro	31	42	69
IPI00026984.1	IRAK3	TKL	8	9	86,2
IPI00007641.2	IRAK4	TKL	28	49	95,6
IPI00015974.1	IRE1	Otro	4	7	83,4
IPI00011633.3	JAK1	TK	189	277	96,7
IPI00024672.1	JNK1	CMGC	50	397	84,3
IPI00303550.2	JNK2	CMGC	85	384	83,8
IPI00021396.1	KDR	TK	12	20	92,5
IPI00304742.4	LOK	STE	4	22	97,7
IPI00794835.1	LRRK2	TKL	19	25	87,8
IPI00298625.2	LYN	TK	6	37	83,1
IPI00185860.4	MAP2K5	STE	18	21	87,4
IPI00787127.1	MAP3K1	STE	19	117	64,6
IPI00513803.3	MAP3K2	STE	7	10	94,7
IPI00386260.3	MAP3K4	STE	13	24	92,2
IPI00412433.1	MAP3K5	STE	12	67	94,1
IPI00418221.3	MAP3K6	STE	9	30	91,6
IPI00412740.5	MAP3K7	STE	14	26	85,8
IPI00555838.1	MARK2	CAMK	46	822	93,4
IPI00183118.4	MARK3	CAMK	4	105	96,2
IPI00029756.1	MER	TK	6	7	96,5
IPI00294528.1	MET	TK	16	84	94,2

IPI0000977.1	MLK3	TKL	40	59	94,9
IPI00142487.2	MLK4	TKL	10	24	85,8
IPI00306833.3	MPSK1	Otro	7	9	92,1
IPI00022536.1	MSK2	AGC	26	70	93,2
IPI00465101.5	NEK3	Otro	13	31	94,8
IPI00301609.8	NEK9	Otro	256	698	83
IPI00014068.1	PAK4	STE	153	267	94,8
IPI00012891.1	PHKg2	CAMK	7	8	93,4
IPI00009688.1	PIP5K2A	Lípido cinasa	14	46	98,7
IPI00216470.1	PIP5K2B	Lípido cinasa	27	51	97,2
IPI00152303.7	PIP5K2C	Lípido cinasa	89	193	97,3
IPI00385449.4	PKCa	AGC	6	16	96,4
IPI00436355.1	PKG1	AGC	4	15	79,3
IPI00844111.1	PKN2	AGC	7	30	98
IPI00021248.1	PLK1	Otro	12	30	94,6
IPI00029702.1	PYK2	TK	23	83	96,3
IPI00021917.1	RIPK2	TKL	33	43	94,4
IPI00030273.1	RON	TK	28	74	96
IPI00020898.1	RSK2	AGC	31	59	95,6
IPI00477982.1	RSK3	AGC	40	122	95,5
IPI00022827.1	SLK	STE	39	116	95,2
IPI00328867.6	SRC	TK	35	166	89,5
IPI00018597.1	SYK	TK	12	31	94,8
IPI00293613.2	TBK1	Otro	260	363	88,8
IPI00000878.3	TEC	TK	49	175	89,3
IPI00005733.1	TGFbR1	TKL	39	63	95,6
IPI00412829.1	TIE2	TK	27	38	91,4
IPI00022633.3	TNK1	TK	64	128	94,1
IPI00022353.4	TYK2	TK	107	154	96,6
IPI00411818.4	ULK3	Otro	47	60	94,8
IPI00807602.1	ULK4	Otro	9	33	84,7
IPI00025830.1	Wee1	Otro	39	54	97,5
IPI00013981.4	YES	TK	61	142	91,7

Ejemplo 6: Obtención del perfil de selectividad de Kinobeads del compuesto de prueba CZC00019943

5 Este ejemplo ilustra el uso de un ensayo de unión de competición en lisado celular para establecer el perfil de selectividad de cinasas del compuesto de prueba CZC00019943. Se añadió este compuesto a concentraciones definidas (CZC00019943 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M) a lisado de células HL60 permitiendo de ese modo que el compuesto se uniera a las proteínas diana en el lisado. Entonces se puso en contacto el lisado con el compuesto inmovilizado (CZC31326) para capturar las proteínas diana libres restantes. Se eluyeron las proteínas unidas al compuesto inmovilizado con tampón que contenía detergente, se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron mediante espectrometría de masas tal como se describió en el ejemplo 2.

15 Se trataron los extractos de péptidos correspondientes a muestras tratadas con diferentes concentraciones del compuesto de prueba (CZC00019943 10 μ M, 1 μ M y 0,1 μ M) y el control de disolvente (DMSO al 0,5%) con diferentes variantes del reactivo de marcaje isobárico (kit multiplex de reactivos iTRAQ, número de parte 4352135, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los reactivos iTRAQ son un conjunto de reactivos de isótopo estable, específicos de amino, multiplexados que pueden marcar péptidos en hasta cuatro muestras biológicas diferentes permitiendo la identificación y cuantificación simultáneas de péptidos. Se usaron los reactivos iTRAQ según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

20 Se usó el compuesto de prueba CZC00019943 a tres concentraciones diferentes en el lisado de células y se normalizaron los valores de CI_{50} al control de DMSO. Para cinasas seleccionadas, se representaron gráficamente los valores de CI_{50} frente a la concentración de CZC00019943 y se realizó el ajuste de la curva usando el programa Xlfit (ID Busiess Solutions Ltd.) tal como se describió anteriormente. (Bantscheff *et al.*, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044). El valor de CI_{50} corresponde a la concentración de compuesto de prueba a la que la intensidad relativa de la señal de EM para una cinasa es el 50% en comparación con el control de disolvente (DMSO). Los valores logarítmicos (pCI_{50}) para cinasas detectadas en este experimento se representan como gráficos de barras (figura 12).

Ejemplo 7: Ensayo para la identificación de los compuestos que interaccionan con IRAK1 e IRAK4

30 Este ejemplo demuestra un ensayo de unión competitivo en el que se añaden compuestos de prueba directamente a

un lisado de células. Se añadieron diversas concentraciones de compuestos de prueba a muestras de lisado de HL60 y se dejó que se unieran a las proteínas contenidas en la muestra de lisado. Al mismo tiempo, se añadió la matriz de afinidad con el compuesto inmovilizado (figura 3, CZC31326) así como con el fin de capturar proteínas no unidas al compuesto de prueba. Tras el tiempo de incubación, se separaron las perlas con proteínas capturadas del lisado. Se eluyeron entonces las proteínas y se detectó la presencia de IRAK1 y IRAK4 y se determinó cuantitativamente usando anticuerpos específicos y el sistema de detección de infrarrojos Odyssey. Pueden encontrarse protocolos experimentales adicionales en el documento WO2006/134056. Se generaron curvas de respuesta a la dosis para el compuesto libre CZC31326 (figura 13).

10 Lavado de la matriz de afinidad

Se lavó la matriz de afinidad descrita en el ejemplo 1 tres veces en tubos de 15 ml con 15 ml de tampón 1xDP que contenía NP40 al 0,2%. Se recogieron las perlas mediante centrifugación suave (2 minutos a 1200 rpm en centrífuga Herareus) y finalmente se resuspendieron en tampón 1xDP que contenía NP40 al 0,2% para preparar una suspensión de perlas al 5%.

15 Preparación de compuestos de prueba

Se prepararon disoluciones madre de compuestos de prueba en DMSO correspondientes a una concentración 50 veces superior en comparación con la concentración de prueba deseada final (por ejemplo se preparó una disolución madre 0,5 mM para una concentración de prueba final de 10 μ M). Este esquema de dilución dio como resultado una concentración de DMSO final del 2%. Para experimentos control (sin compuesto de prueba), se usó un tampón que contenía DMSO al 2%.

25 Dilución de lisado de células

Se prepararon lisados de células tal como se describió en el ejemplo 2. Para un experimento típico, se descongeló una alícuota de lisado que contenía 50 mg de proteína en un baño de agua a 21°C y entonces se mantuvo a 4°C. Al lisado se le añadió un volumen de tampón 1xDP que contenía inhibidor de proteasas (1 comprimido de inhibidor de proteasas disuelto en 25 ml de tampón 1xDP que contenía NP40 al 0,8%; cóctel inhibidor de proteasas de comprimido libre de EDTA de Roche Applied Sciences, número de catálogo 41647) de modo que se obtuvo una concentración de NP40 final del 0,8%. Se diluyó adicionalmente el lisado añadiendo tampón 1xDP que contenía NP40 al 0,8% e inhibidores de proteinasas de modo que se logró una concentración de proteína final de 10 mg/ml.

35 Incubación del lisado con el compuesto de prueba y la matriz de afinidad

A una placa filtrante de 96 pocillos (Multiscreen HTS, HV Filter Plates, Millipore n.º MSHVN4550) se le añadieron los siguientes componentes por pocillo: 100 μ l de matriz de afinidad (suspensión de perlas al 5%), 3 μ l de disolución de compuesto y 50 μ l de lisado de células diluido. Se sellaron las placas y se incubaron durante dos horas en una sala fría en un instrumento Thermoexer con agitación (650 rpm). Después de eso, se lavó la placa dos veces con 220 μ l de tampón de lavado (1xDP NP40 al 0,4%). Se colocó la placa filtrante sobre la parte superior de una placa de recogida (Greiner bio-one, microplaca PP de 96 pocillos con forma de V, 651201) y entonces se eluyeron las perlas con 40 μ l de tampón de muestras concentrado 2x (Tris 100 mM, pH 7,4, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0,01%, glicerol al 20%, DTT 50 mM). Se almacenó el eluato a -20°C.

45 Detección y cuantificación de cinasas eluidas

Se detectaron las cinasas en los eluatos y se cuantificaron mediante aplicación sobre membranas de nitrocelulosa y usando un primer anticuerpo dirigido contra la cinasa de interés y un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (anticuerpos anti-ratón o anti-conejo IRDye™ de Rockland). Se hizo funcionar el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EE.UU.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en mayo de 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).

Tras la aplicación de los eluatos, se bloqueó en primer lugar la membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT; PALL, BTNT30R) mediante incubación con tampón de bloqueo Odyssey (LICOR, 927-40000) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron entonces las membranas bloqueadas durante 16 horas a 25°C con el primer anticuerpo diluido en tampón de bloqueo Odyssey (LICOR n.º 927-40000). Después de eso, se lavó la membrana dos veces durante 5 minutos con 15 ml de tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (Sigma, T2700) a temperatura ambiente. Entonces se incubó la membrana durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo de detección (anticuerpo marcado IRDye™ de Rockland) diluido en tampón de bloqueo Odyssey (LICOR n.º 927-40000) que contenía Tween-20 al 0,2% y SDS al 0,02%. Después de eso, se lavó la membrana cuatro veces durante 6 minutos cada una con tampón 1 x PBS que contenía Tween 20 al 0,1% a temperatura ambiente. Entonces, se enjuagó la membrana dos veces con tampón PBS para eliminar el Tween-20 residual. Se mantuvo la membrana en tampón 1 x PBS a 4°C y entonces se exploró con el instrumento Odyssey. Se registraron las señales

de fluorescencia y se analizaron según las instrucciones del fabricante. Se calcularon curvas de respuesta a la dosis con el programa XL fit (XLfit4 Excel Add-In versión 4.2.0 Build 13; IDBS, Guilford, RU).

Fuente de anticuerpos:

5 Anti-IRAK1: R&D Systems, AF4048, de cabra, diluido 1:2000; anti-IRAK4: R&D Systems, AF3919, de cabra, diluido 1:2000; anticuerpo secundario marcado fluorescentemente IRDeye800 de asno anti-cabra, Rockland 605-732-125, diluido 1:5000.

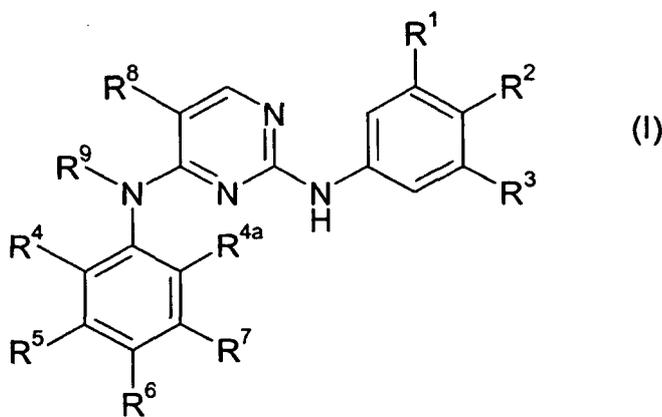
10 Tabla 8: Preparación de tampón 5x-DP

Sustancia:	Disolución madre	Conc. final en tampón de lisis 1 x	Adición para tampón de lisis 115 x
Tris/HCl pH 7,5	1 M	50 mM	250 ml
Glicerol	87%	5%	288 ml
MgCl₂	1 M	1,5 mM	7,5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na₃VO₄	100 mM	1 mM	50 ml

15 Se filtró el tampón 5x-DP a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó en alícuotas de 40 ml a -80°C. Se obtuvieron disoluciones madre a partir de los siguientes proveedores: Tris/HCl 1,0 M pH 7,5 (Sigma, T-2663), glicerol al 87% (Merck, número de catálogo 04091,2500); MgCl₂ 1,0 M (Sigma, M-1028); NaCl 5,0 M (Sigma, S-5150).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de inmovilización de fórmula (I)



5

o una sal del mismo, en la que

10

uno de R^1 , R^2 , R^3 es $X-(CH_2)_n-NH_2$ y los otros dos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; halógeno; CN; $C(O)OR^{10}$; OR^{10} ; $C(O)R^{10}$; $C(O)N(R^{10}R^{10a})$; $S(O)_2N(R^{10}R^{10a})$; $S(O)N(R^{10}R^{10a})$; $S(O)_2R^{10}$; $S(O)R^{10}$; $N(R^{10})S(O)_2N(R^{10a}R^{10b})$; SR^{10} ; $N(R^{10}R^{10a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{10}$; $N(R^{10})C(O)R^{10a}$; $N(R^{10})S(O)_2R^{10a}$; $N(R^{10})S(O)R^{10a}$; $N(R^{10})C(O)N(R^{10a}R^{10b})$; $N(R^{10})C(O)OR^{10a}$; $OC(O)N(R^{10}R^{10a})$; alquilo C_{1-6} ; alquenido C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenido C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{11} , que son iguales o diferentes;

15

X es un enlace químico covalente sencillo; O; S; NH; $NHC(O)$ o $C(O)NH$;

20

n es 0; 1; 2; 3; 4; 5 ó 6, cuando X es un enlace químico covalente sencillo o $NHC(O)$; y n es 2; 3; 4; 5 ó 6, cuando X es O; S o $C(O)NH$;

25

R^{10} , R^{10a} , R^{10b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alquenido C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenido C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{12} , que son iguales o diferentes;

30

R^{11} , R^{12} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; $C(O)OR^{13}$; OR^{13} ; $C(O)R^{13}$; $C(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)N(R^{13}R^{13a})$; $S(O)_2R^{13}$; $S(O)R^{13}$; $N(R^{13})S(O)_2N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})S(O)N(R^{13a}R^{13b})$; SR^{13} ; $N(R^{13}R^{13a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{13}$; $N(R^{13})C(O)R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)_2R^{13a}$; $N(R^{13})S(O)R^{13a}$; $N(R^{13})C(O)N(R^{13a}R^{13b})$; $N(R^{13})C(O)OR^{13a}$ y $OC(O)N(R^{13}R^{13a})$;

35

R^{13} , R^{13a} , R^{13b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alquenido C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenido C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

40

R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^{4a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; X^1 ; halógeno; CN; $C(O)OR^{14}$; OR^{14} ; $C(O)R^{14}$; $C(O)N(R^{14}R^{14a})$; $S(O)_2N(R^{14}R^{14a})$; $S(O)N(R^{14}R^{14a})$; $S(O)_2R^{14}$; $S(O)R^{14}$; SR^{14} ; $N(R^{14}R^{14a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{14}$; $N(R^{14})C(O)R^{14a}$; $N(R^{14})S(O)_2R^{14a}$; $N(R^{14})S(O)R^{14a}$; $N(R^{14})C(O)N(R^{14a}R^{14b})$; $N(R^{14})C(O)OR^{14a}$; $OC(O)N(R^{14}R^{14a})$; alquilo C_{1-6} ; alquenido C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenido C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{15} , que son iguales o diferentes,

45

siempre que uno de R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^{4a} sea X^1 ;

R^{14} , R^{14a} , R^{14b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alquenido C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenido C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{16} , que son iguales o diferentes;

50

R^{15} , R^{16} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en halógeno; CN; $C(O)OR^{17}$; OR^{17} ; $C(O)R^{17}$; $C(O)N(R^{17}R^{17a})$; $S(O)_2N(R^{17}R^{17a})$; $S(O)N(R^{17}R^{17a})$; $S(O)_2R^{17}$; $S(O)R^{17}$; $N(R^{17})S(O)_2N(R^{17a}R^{17b})$; $N(R^{17})S(O)N(R^{17a}R^{17b})$; SR^{17} ; $N(R^{17}R^{17a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{17}$; $N(R^{17})C(O)R^{17a}$; $N(R^{17})S(O)_2R^{17a}$; $N(R^{17})S(O)R^{17a}$; $N(R^{17})C(O)N(R^{17a}R^{17b})$; $N(R^{17})C(O)OR^{17a}$; $OC(O)N(R^{17}R^{17a})$; alquilo C_{1-6} ; alquenido C_{2-6} y alquinilo C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alquenido C_{2-6} y el alquinilo C_{2-6}

opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R^{17} , R^{17a} , R^{17b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

X^1 es $N(R^{18a})S(O)_2R^{18}$ o $N(R^{18a})S(O)_2N(R^{18b}R^{18})$;

R^9 , R^{18a} , R^{18b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-4} ; cicloalquilo C_{3-5} y (cicloalquil C_{3-5})-metilo, estando el alquilo C_{1-4} ; el cicloalquilo C_{3-5} y el (cicloalquil C_{3-5})-metilo opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R^{18} es T; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más de R^{19} , que son iguales o diferentes;

R^{19} es T; halógeno; CN; $C(O)OR^{20}$; OR^{20} ; $C(O)R^{20}$; $C(O)N(R^{20}R^{20a})$; $S(O)_2N(R^{20}R^{20a})$; $S(O)N(R^{20}R^{20a})$; $S(O)_2R^{20}$; $S(O)R^{20}$; $N(R^{20})S(O)_2N(R^{20a}R^{20b})$; $N(R^{20})S(O)N(R^{20a}R^{20b})$; SR^{20} ; $N(R^{20}R^{20a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{20}$; $N(R^{20})C(O)R^{20a}$; $N(R^{20})S(O)_2R^{20a}$; $N(R^{20})S(O)R^{20a}$; $N(R^{20})C(O)N(R^{20a}R^{20b})$; $N(R^{20})C(O)OR^{20a}$; $OC(O)N(R^{20}R^{20a})$; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R^{20} , R^{20a} , R^{20b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

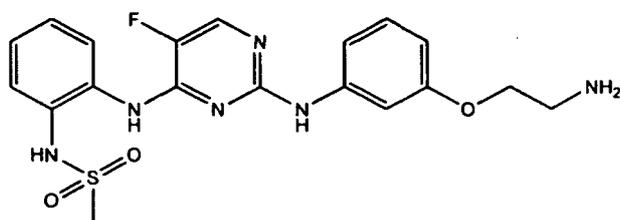
T es fenilo; cicloalquilo C_{3-7} ; o heterocíclico de 4 a 7 miembros, estando T opcionalmente sustituido con uno o más de R^{21} , que son iguales o diferentes;

R^{21} es halógeno; CN; $C(O)OR^{22}$; OR^{22} ; oxo (=O), estando el anillo al menos parcialmente saturado; $C(O)R^{22}$; $C(O)N(R^{22}R^{22a})$; $S(O)_2N(R^{22}R^{22a})$; $S(O)N(R^{22}R^{22a})$; $S(O)_2R^{22}$; $S(O)R^{22}$; $N(R^{22})S(O)_2N(R^{22a}R^{22b})$; $N(R^{22})S(O)N(R^{22a}R^{22b})$; SR^{22} ; $N(R^{22}R^{22a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{22}$; $N(R^{22})C(O)R^{22a}$; $N(R^{22})S(O)_2R^{22a}$; $N(R^{22})S(O)R^{22a}$; $N(R^{22})C(O)N(R^{22a}R^{22b})$; $N(R^{22})C(O)OR^{22a}$; $OC(O)N(R^{22}R^{22a})$; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} o alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

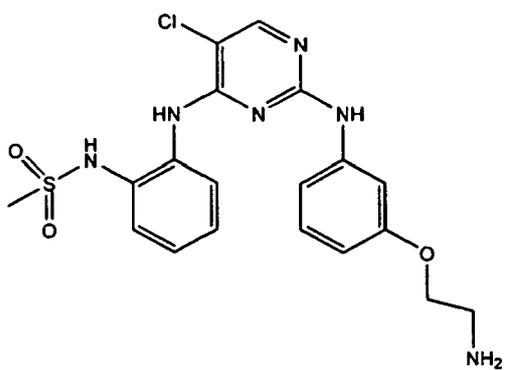
R^{22} , R^{22a} , R^{22b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; alquilo C_{1-6} ; alqueno C_{2-6} y alquino C_{2-6} , estando el alquilo C_{1-6} ; el alqueno C_{2-6} y el alquino C_{2-6} opcionalmente sustituidos con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

R^8 es H; F; Cl; Br; CN; alquilo C_{1-4} ; CH_2F ; CHF_2 ; CF_3 ; OH; OCH_3 ; NO_2 ; NH_2 ; $NHCH_3$; $N(CH_3)_2$ o NO_2 .

2. Compuesto de inmovilización según la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en



y



3. Método para la preparación de un producto de inmovilización, en el que al menos un compuesto de inmovilización según la reivindicación 1 ó 2 se inmoviliza sobre un soporte sólido, en particular en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de Sepharose (por ejemplo Sepharose activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el producto de inmovilización resulta de una unión covalente directa o mediada por ligador del compuesto de inmovilización al soporte sólido, en particular en el que el ligador es un grupo alqueno C₁₋₁₀, que está interrumpido o terminado opcionalmente por uno o más átomos o grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en S, O, NH, C(O)O, C(O) y C(O)NH y estando el ligador opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en halógeno, OH, NH₂, C(O)H, C(O)NH₂, SO₃H, NO₂ y CN, en particular en el que dicha inmovilización se produce mediante el grupo amino primario en el residuo X-(CH₂)_n-NH₂ para uno de R¹, R², R³ en la fórmula (I) según la reivindicación 1.
5. Producto de inmovilización, que puede obtenerse mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4.
6. Producto de inmovilización, que comprende el compuesto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 inmovilizado sobre un soporte sólido, en particular seleccionándose el soporte sólido del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de Sepharose (por ejemplo Sepharose activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas.
7. Método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de
- proporcionar una preparación proteica que contiene una variedad de cinasas,
 - poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y
 - detectar el complejo o los complejos formados en la etapa b).
8. Método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de:
- proporcionar dos alícuotas de una preparación proteica que contiene una variedad de cinasas,
 - poner en contacto una alícuota con el producto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización,
 - poner en contacto la otra alícuota con el producto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y
 - determinar la cantidad del complejo o de los complejos formados en las etapas b) y c).
9. Método para la identificación de un compuesto que interacciona con cinasa, que comprende las etapas de:
- proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene una variedad de cinasas,

- b) incubar una alícuota con un compuesto dado,
- c) recoger las células de cada alícuota,
- 5 d) lisar las células con el fin de obtener preparaciones proteicas,
- e) poner en contacto las preparaciones proteicas con el producto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 en condiciones que permiten la formación de uno o más complejos diferentes entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y
- 10 f) determinar la cantidad del complejo o de los complejos formados en cada alícuota en la etapa e).
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la variedad de cinasas incluye uno o más miembros de la familia IRAK, preferiblemente IRAK 1 o IRAK 4.
- 15 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la variedad de cinasas incluye NIK.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que una cantidad reducida del complejo formado en la alícuota incubada con el compuesto en comparación con la alícuota no incubada con el compuesto indica que dicha cinasa es una diana del compuesto.
- 20 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la cantidad del complejo se determina mediante la separación de la cinasa del producto de inmovilización y la posterior detección de la cinasa separada o la posterior determinación de la cantidad de la cinasa separada, en particular en el que la cinasa se detecta o la cantidad de la cinasa se determina mediante métodos de espectrometría de masas o de inmunodetección, preferiblemente con un anticuerpo dirigido contra la cinasa.
- 25 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que dicho compuesto dado se selecciona del grupo que consiste en compuestos sintéticos o fármacos sintéticos orgánicos, más preferiblemente fármacos orgánicos de molécula pequeña y compuestos de molécula pequeña naturales.
- 30 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, en el que el compuesto dado es un inhibidor de cinasa.
- 35 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en el que el suministro de una preparación proteica incluye las etapas de recoger al menos una célula que contiene cinasas y lisar la célula.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, en el que las etapas de la formación del complejo se realizan en condiciones esencialmente fisiológicas.
- 40 18. Método para determinar la presencia de una o más cinasas en una muestra, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una preparación proteica de la que se espera que contenga dicha una o más cinasas,
- 45 b) poner en contacto la preparación proteica con el producto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 en condiciones que permiten la formación de un complejo entre una de las cinasas y el producto de inmovilización, y
- c) detectar si una o más cinasas han formado un complejo con el producto de inmovilización.
- 50 19. Uso del compuesto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o del producto de inmovilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 para la identificación de compuestos que interaccionan con cinasas o para la purificación de cinasas.

Figura 1

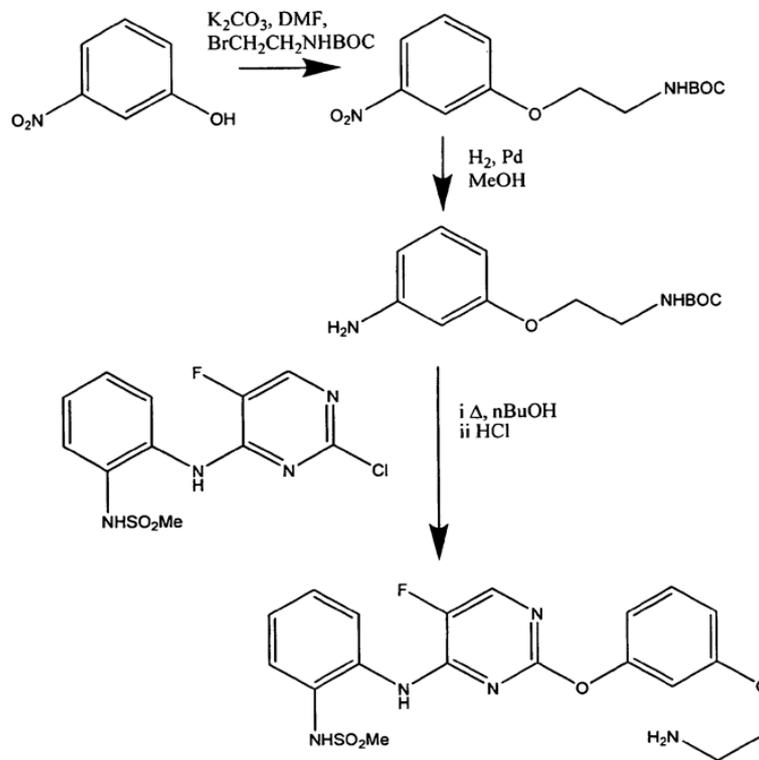


Figura 2

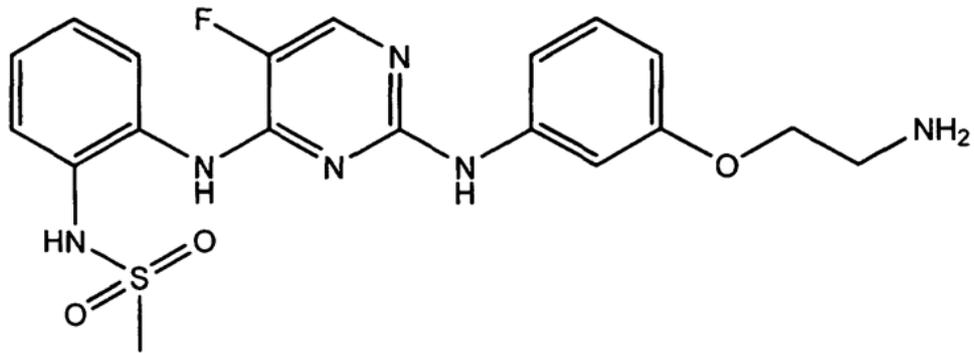


Figura 3

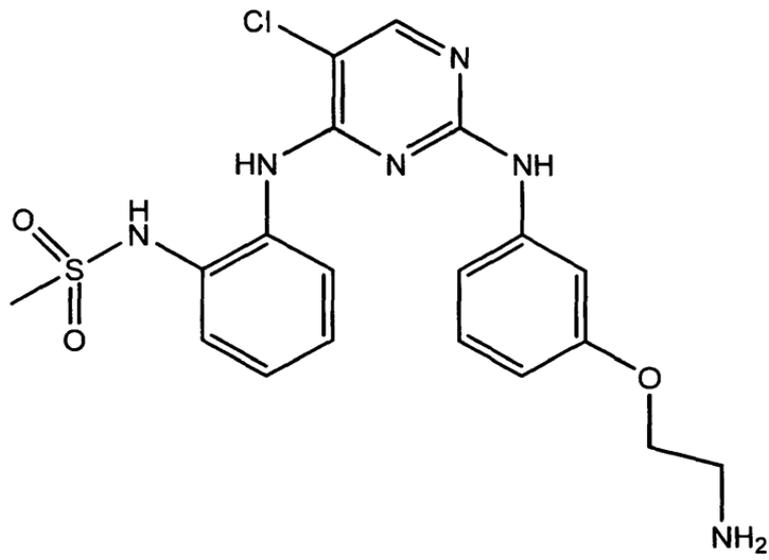


Figura 4

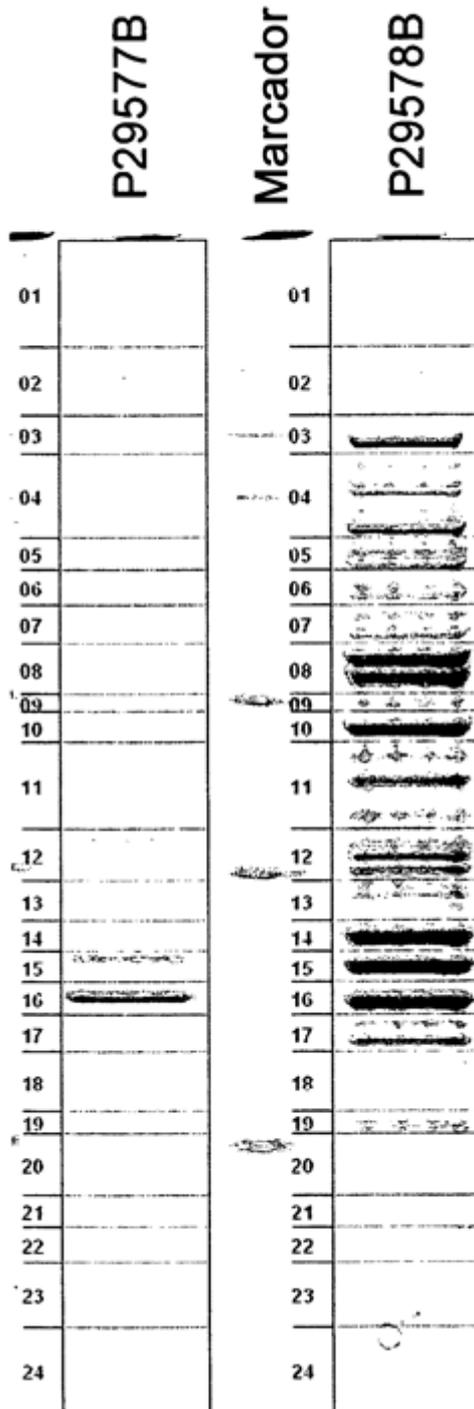


Figura 5

1 MAGGPGPGEP AAPGAQHFLY EVPPWVMCRF YKVMDALEPA DWCQFAALIV
 51 RDQTELRRLCE RSGQRTASVL WPWINRNARV ADLVHILTHL QLLRARDIIT
 101 AWHPPAPLPS PGTTAPRPSS IPAPAEAEAW SPRKLPSSAS TFLSPAFFGS
 151 QTHSGPELGL VPSPASLWPP PPSPAPSSTK PGPESSVSLI QGARPFPFCW
 201 PLCEISRGRH NFSEELKIGE GGFGCVYRAV MRNTVYAVKR LKENADLEWT
 251 AVKQSFLTEV EQLSRFRHPN IVDFAGYCAQ NGFYCLVYGF LPNGSLEDRL
 301 HCQTQACPPL SWPQRDLILL GTARAIQFLH QDSPSLIHGD IKSSNVLLDE
 351 RLTPKLGDFG LARFSRFAGS SPSQSSMVAR TQTVRGTLAY LPEEYIKTGR
 401 LAVDTRDTFSF GVVLETLAG QRAVKTHGAR TKYLDLVEE EAEAGVALR
 451 STQSTLQAGL AADAWAAPIA MQIYKKHLDL RPGPCPELGL LGLGQLACCC
 501 LHRRAKRRPP MTQVYERLEK LQAVVAGVPG HSEAASCIPP SPQENSYVSS
 551 TGRAHSGAAP WQPLAAPSGA SAQAAEQLQR GPNQPVEEDE SLGGLSAALR
 601 SWHLTPSCPL DPAPLREAGC PQGDTAGESS WGSPPGSRPT AVEGLALGSS
 651 ASSSSEPPQI IINPARQKMV QKLALYEDGA LDSLQLLSSS SLPGLGLEQD
 701 RQGPEESDEF QS

Figura 6

1 MAGNCGARGA LSAHTLLFDL PPALLGELCA VLDSCDGALG WRGLAERLSS
 51 SWLDVRHIEK YVDQKSGTR ELLWSWAQKN KTIGDLLQVL QEMGHRAIH
 101 LITNYGAVLS PSEKSYQEGG FPNILFKETA NVTVDNVLIP EHNEKGVLLK
 151 SSISFQNIIE GTRNFHKDFL IGEGEIFEVY RVEIQNLTYA VKLKFQEKKM
 201 QCKKHWKRFLE SELEVLLLFH HPNILELAAY FTETEKFCLI YPYMRNGTLF
 251 DRLQCVGDTA PLPWHIRIGI LIGISKAIHY LHNVPCSVI CGSISSANIL
 301 LDDQFQPKLT DFAMAHRSH LEHQSCTINM TSSSSKHLWY MPEEYIRQK
 351 LSIKTDVYSF GIVIMEVLTG CRVVLDDPKH IQLRDLLREL MEKRGLDSCL
 401 SFLDKKVPPC PRNFSAKLFC LAGRCAATRA KLRPSMDEVL NTLESTQASL
 451 YFAEDPPTSL KSFRCPSPLF LENVPSIPVE DDESQNNLL PSDEGLRIDR
 501 MTQKTPFECS QSEVMFLSLD KKPEKRNEE ACNMPSSSCE ESWFPKYIVP
 551 SQDLRPYKVN IDPSSEAPGH SCRSRPVESS CSSKFSWDEY EOYKKE

Figura 7

1 MNKPITPSTY VRCLNVGLIR KLSDFIDPQE GWKKLAVAIK KPSGDDRYNQ
 51 FHIRRFEALL QTGKSPTSEL LFDWGTNCT VGDLVDLLIQ NEFFAPASLL
 101 LPDAVPKTAN TLPSKEAITV QQKQMPFCDK DRTLMTVPQN LEQSYMPADS
 151 SSPENKSLEV SDTRFHSFSF YELKNVTNNF DERPISVGGN KMGEGGFGVV
 201 YKGYVNNTTV AVKKLAAMVD ITTEELKQQF DQEIKVMAKC QHENLVELLG
 251 FSSDGDDLCL VVYMPNGSL LDRLSCLDGT PPLSWHMRCK IAQGAANGIN
 301 FLHENHHIHR DIKSANILLD EAFTAKISDF GLARASEKFA QTVMTSRIVG
 351 TTAYMAPEAL RGEITPKSDI YSFGVVLLEI ITGLPAVDEH REPQLLLDIK
 401 EEIEDEEKTI EDYIDKKMND ADSTSVEAMY SVASQCLHEK KNKRPDIKKV
 451 QQLLQEMTAS

Figura 8

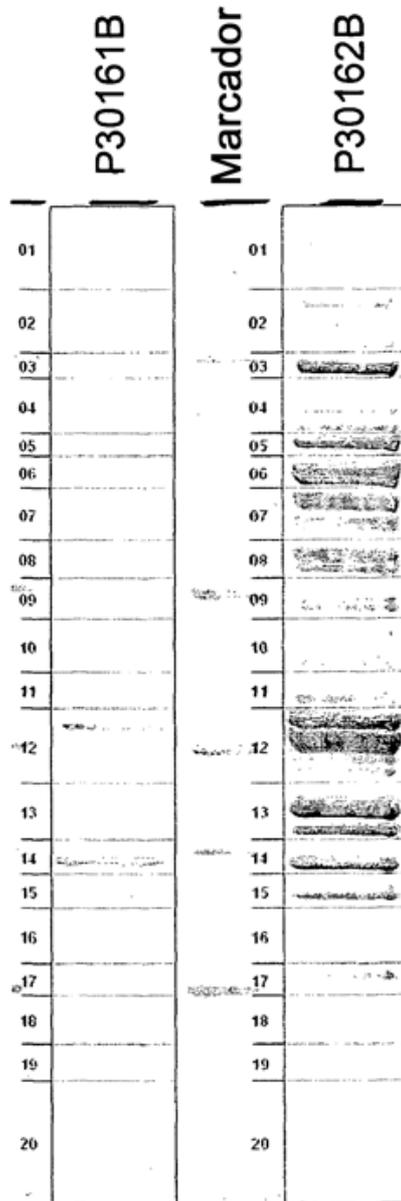


Figura 9

1 MAVMEMACPG APGSAVGQQK ELPKPKEKTP PLGKKQSSVY KLEAVEKSPV
 51 FCGKWEILND VITKGTAKEG SEAGPAAISI IAQAECENSQ EFSPTFSERI
 101 FIAGSKQYSQ SESLDQIPNN VAHATEGKMA RVCWKGKRRS KARKKRKKKS
 151 SKSLAHAGVA LAKPLPRTPE QESCTIPVQE DESPLGAPYV RNTPOFTKPL
 201 KEPGLGQLCF KQLGEGLRPA LPRSELHKLI SPLQCLNHVW KLHHPQDGGP
 251 LPLPTHFPFY SRLPHFPFPH PLQPWKPHPL ESFLGKLACV DSQKPLPDPH
 301 LSKLACVDSP KPLPGPHLEP SCLSRGAHEK FSVEEYLVHA LQGSVSSSQ
 351 HSLTSLAKTW AARGSRREP SPKTEDNEGV LLTEKLPVD YEYREEVHWA
 401 THQLRLGRGS FGEVHRMEDK QTGFQCAVKK VRLEVFRAEE LMACAGLTSP
 451 RIVPLYGAVR EGPWVNIFME LLEGGSLGQL VKEQGCLPED RALYYLGOAL
 501 EGLEYLHSRR ILHGDVKADN VLLSSDGSHA ALCDFGHAVC LQPDGLGKSL
 551 LTGDYIPGTE THMAPEVVLG RSCDAKVDVW SSCMMLHML NGCHPWTQFF
 601 RGPLCLKIAS EPPPVREIPP SCAPLTAQAI QEGLRKEPIH RVSAAELGGK
 651 VNRALQQVGG LKSPWRGEYK EPRHPPNQA NYHQTLHAQP RELSPRAPGP
 701 RPAEETTGRA PKLQPPLPPE PPEPNKSPPL TLSKEESGMW EPLPLSSLEP
 751 APARNPSSPE RKATVPEQEL QQLEIELFLN SLSQPFSLEE QEQILSCLSI
 801 DSLSLSDDSE KNPSKASQSS RDTLSSGVHS WSSQAEARSS SWNMVLARGR
 851 PTDTPSYFNG VKVQIQSLNG EHLHIREFHR VKVGDIATGI SSQIPAAAFS
 901 LVTKDGPVR YDMEVPDSGI DLQCTLAPDG SFAWSRVKH GQLENRP

Figura 10

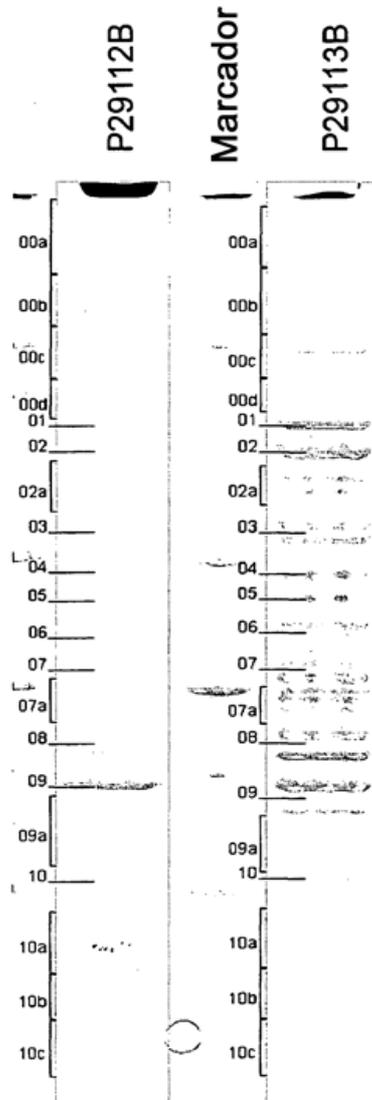


Figura 11

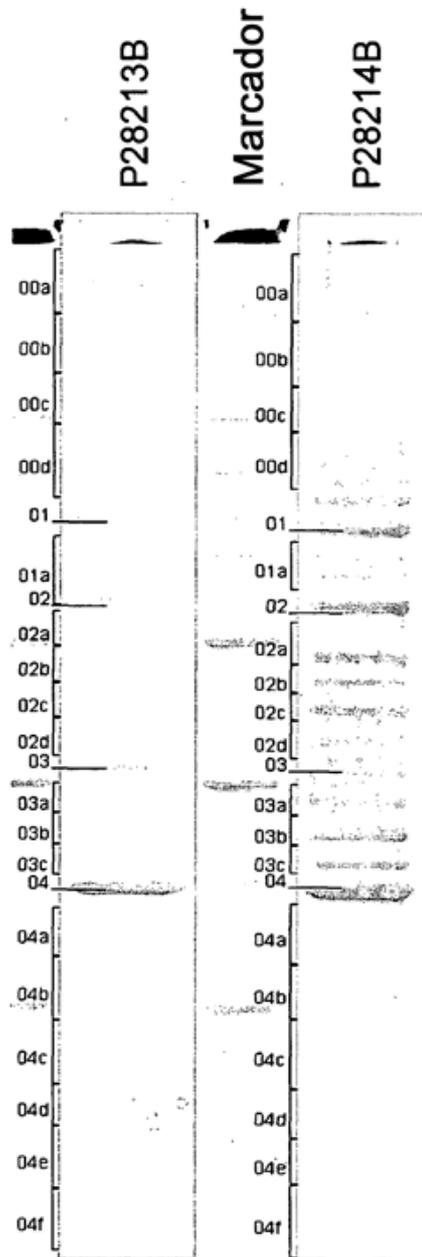


Figura12

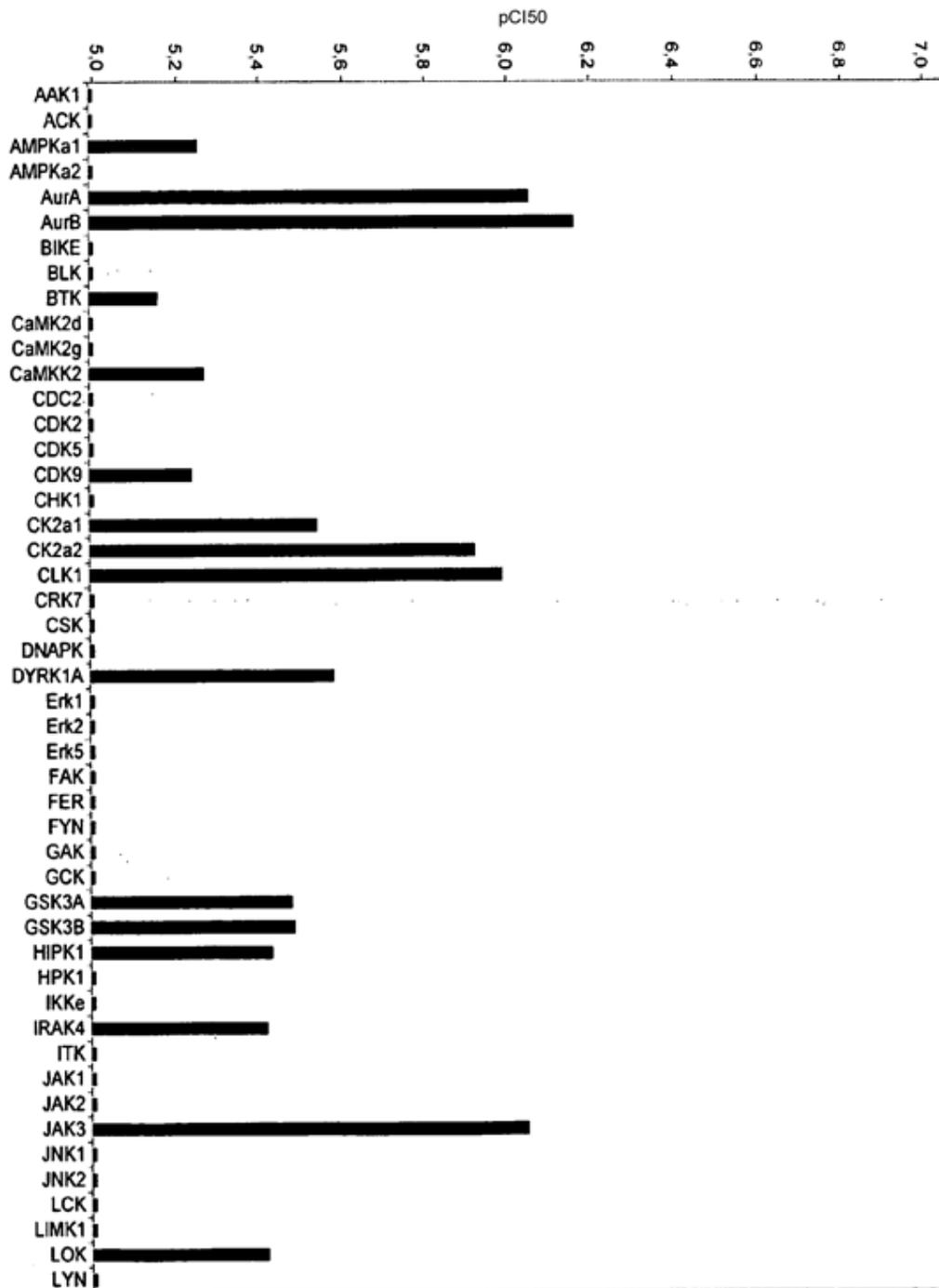


Figura 12 - continuación

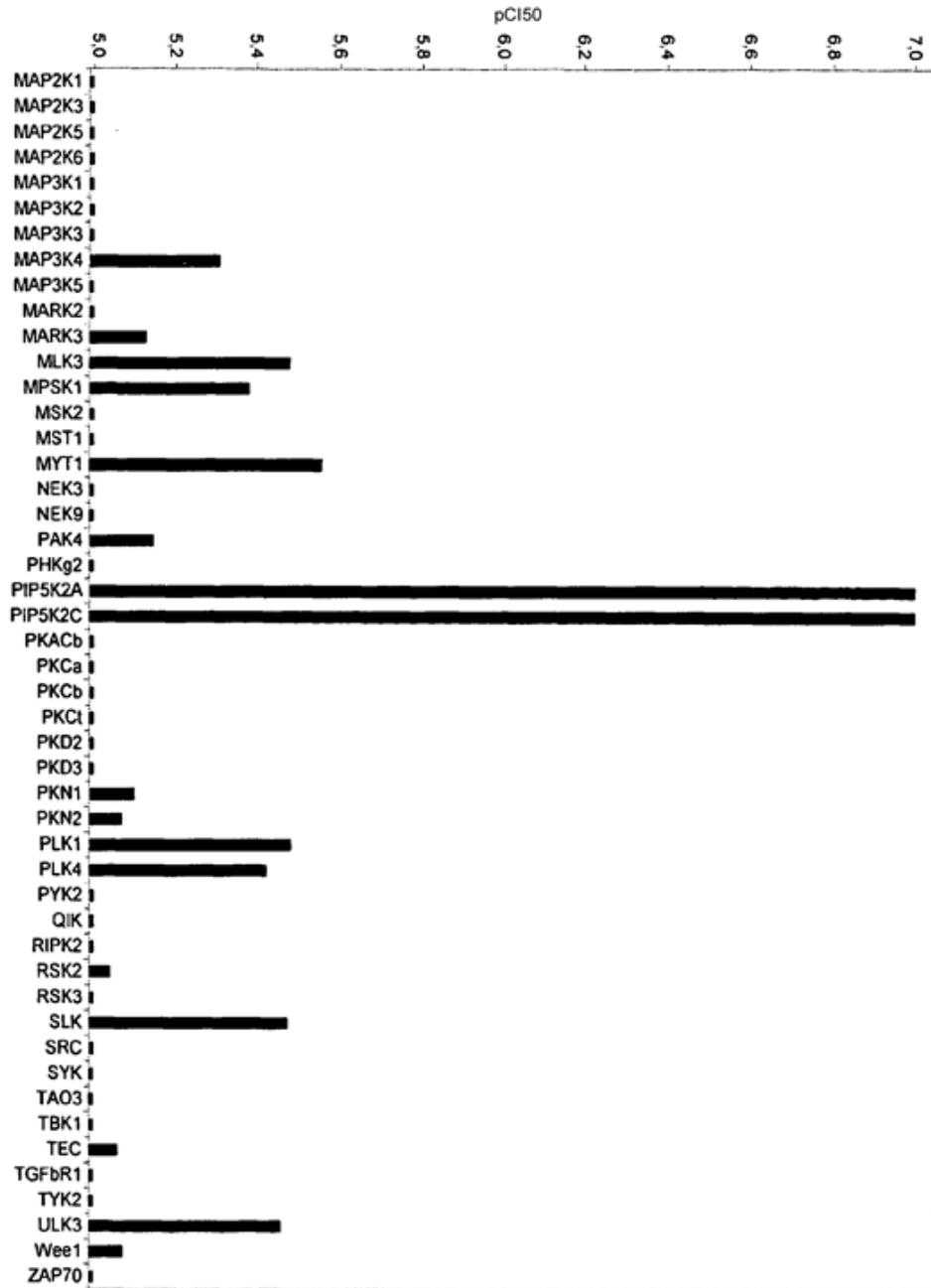
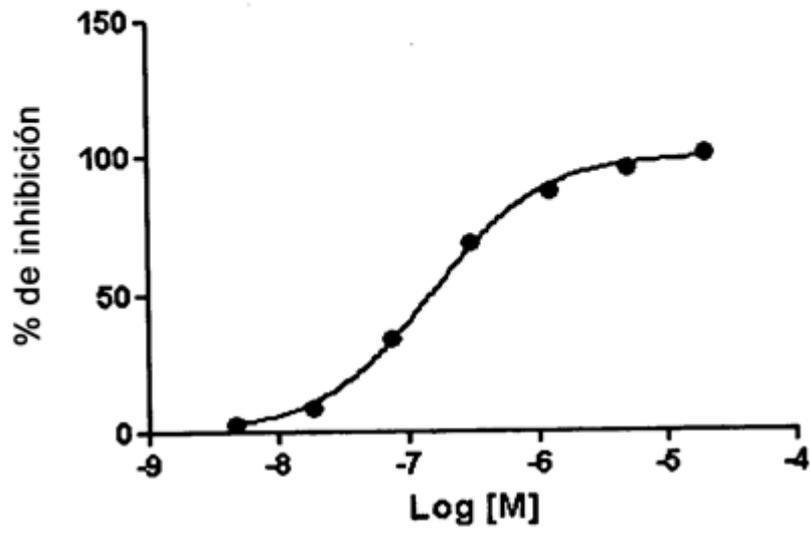


Figura 13

A



B

