

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 837**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/557 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016 PCT/EP2016/071901**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046284**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016 E 16775105 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3350596**

54 Título: **Método para determinar perfiles cinéticos en el descubrimiento de fármacos**

30 Prioridad:

16.09.2015 EP 15185422

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

08.09.2020

73 Titular/es:

**ENZYMLOGIC, S.L (100.0%)
C/ Santiago Grisolla nº 2, Tres Cantos
28760 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**ALFONSO SAN-SEGUNDO, ANA PATRICIA y
CORRIONERO PÉREZ, ANA**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 781 837 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

Método para determinar perfiles cinéticos en el descubrimiento de fármacos

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere al campo del área farmacéutica y el descubrimiento de fármacos. Se basa en el desarrollo de un método para determinar simple y rápidamente el perfil cinético de nuevos compuestos en desarrollo y sus posibles dianas en el área farmacéutica. Está destinado a su uso en empresas farmacéuticas y de biotecnología centradas en proyectos de descubrimiento racional de fármacos.

Antecedentes

Los enfoques de descubrimiento de fármacos basados en dianas han usado tradicionalmente la afinidad en estado estacionario como el parámetro principal para evaluar una actividad de un compuesto y predecir su rendimiento en modelos biológicos relevantes. La mayoría de los proyectos de descubrimiento de fármacos se basan en estimaciones de afinidad de compuestos por una proteína diana para guiar la química médica en las etapas tempranas. Sin embargo, es abundante la evidencia de que los compuestos con la misma afinidad, pero muy diferentes en las velocidades de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}), pueden tener un perfil de actividad biológica muy diferente. Muchos expertos reconocen los datos cinéticos de unión como elemento decisivo en el descubrimiento de fármacos que tiene un impacto directo sobre la eficacia y seguridad del fármaco (Copeland 2006; Swinney 2009; Mosnma 2010). Por ejemplo, se espera que los compuestos que presentan velocidades de asociación controladas por difusión sean inhibidores de trombina más eficientes (Elg 1997) y la cinética transitoria también puede ser una ventaja en el desarrollo de fármacos antipsicóticos, en los que puede producirse toxicidad basada en el mecanismo si se inhibe el receptor diana durante un largo periodo de tiempo (Tresadern 2011). Por otro lado, es probable que los modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos clásicos subestimen la selectividad y la eficacia de fármacos con un tiempo de permanencia más prolongado que sus semividas plasmáticas, y se espera que la inclusión de datos cinéticos de unión mejore realmente el valor predictivo de estos modelos (Dahl 2013).

Hay una variedad de instrumentos y técnicas de medición para el análisis cinético. Los métodos clásicos tales como los ensayos de flujo detenido, dilución de salto y de competencia de unión de radioligandos son tediosos y engorrosos, en su mayoría de rendimiento limitado. Hay muchos ejemplos de caracterización cinética mediante el uso de ligandos de radiomarcadores, la mayoría de ellos usando ensayos de competencia de radioligandos y el modelo matemático descrito por Motulski y Mahan en los años ochenta (Motulski 1984). Para realizar estos ensayos, habitualmente se sintetiza un ligando titulado análogo al sustrato natural y se marca de manera personalizada. Este ligando radiactivo se caracteriza en primer lugar cinéticamente para determinar sus velocidades de asociación y disociación. Luego, el ligando desconocido (no radiactivo) más el ligando radiactivo se añaden simultáneamente a la mezcla de reacción, y se deja la reacción durante diferentes tiempos. Después de detener las reacciones, la separación del radioligando unido del libre se realiza mediante técnicas de filtración rápida (como la placa filtrante GF/B usando un colector FilterMate, PerkinElmer) y los filtros deben lavarse abundantemente antes de añadir el cóctel de centelleo. La radiactividad unida al filtro se mide, además, mediante espectrometría de centelleo, usando contadores de centelleo convencionales. Tal como puede mostrarse, estos métodos son tediosos y requieren mucho tiempo, y son necesarias varias etapas de incubación y lavado antes de la lectura final de cada tiempo. Además, es necesario un cuidado especial para trabajar con, almacenar y destruir compuestos radiomarcados.

Recientemente, algunos métodos de unión de TR-FRET se han adaptado para medir velocidades de disociación (K_{off}), que informan sobre eventos de unión en tiempo real y que usan el método de gran dilución clásico (LanthaScreen™_binding y Transcreener™). Sin embargo, estos métodos se basan en el conocimiento previo de la afinidad de la interacción con el fármaco diana, que debe determinarse previamente en experimentos de titulación clásicos con concentraciones diferentes de inhibidores. Luego, cada molécula debe preincubarse con la diana a una concentración entre 10 y 40 veces su K_i , asegurando que todos los sitios de unión estén ocupados por el inhibidor (>90%). Como la afinidad de una molécula frente a su diana es una característica intrínseca de cada molécula, las afinidades de las diferentes moléculas varían en un amplio intervalo. Para automatizar este proceso, es necesario usar sistemas sofisticados de manipulación de líquidos que puedan recoger diferentes volúmenes de diferentes posiciones de la placa desde una primera placa y posteriormente dispensar esos volúmenes en pocillos específicos de una segunda placa (la denominada "selección oportunista"). Además, el análisis en paralelo de compuestos con afinidades muy diferentes implica necesariamente la necesidad de realizar diluciones intermedias de los compuestos más potentes. En algunos casos, también puede ser obligatorio usar placas de dilución intermedias para evitar el coste excesivo asociado con grandes volúmenes. Tal como puede deducirse fácilmente, el protocolo anterior no es útil para conseguir un análisis cinético en un formato de alto rendimiento. Este es uno de los principales motivos por los que el perfil cinético de las moléculas se realiza tradicionalmente sólo con moléculas seleccionadas que ya han avanzado con éxito en el proceso de descubrimiento de fármacos (moléculas que funcionan de manera adecuada en modelos animales o en ensayos clínicos).

Otros métodos cinéticos se basan en técnicas biofísicas sin marcadores, tales como la calorimetría de titulación isotérmica (CTI), la resonancia magnética nuclear, la espectrometría de masas y los biosensores, entre otros. La CTI

requiere grandes cantidades de proteínas purificadas y permite un rendimiento moderado a pesar de los avances técnicos. Por tanto, las técnicas basadas en biosensores, siendo la resonancia de plasmón superficial (RPS) la más destacada, son las técnicas preferidas para la caracterización cinética de los candidatos a fármacos. Los sistemas basados en RPS permiten la detección y cuantificación de interacciones biológicas en tiempo real, sin el uso de marcadores (Lieberg 1983). La diana de interés debe inmovilizarse en la superficie de un chip y luego, el analito se inyecta a través del sistema. La inmovilización de la diana es una etapa crítica en el desarrollo de ensayos de RPS fiables y, aunque hay una variedad de superficies de sensores disponibles y puede usarse una amplia gama de técnicas para la inmovilización de ligandos, la RPS todavía está restringida a proteínas de membrana, puesto que estas proteínas no son lo suficientemente robustas como para soportar la inmovilización en la superficie de un chip. Además, las dianas inmovilizadas no están en su forma nativa, y algunos sitios de unión pueden no ser accesibles, eludiendo la unión del ligando. Además, la RPS implica costosos equipos de laboratorio y exige usuarios altamente capacitados, lo que puede dificultar que sea un método general para evaluar el perfil cinético en un formato de alto rendimiento.

Tal como puede exponerse brevemente, existe una demanda creciente de tecnologías y métodos mejorados que permitan mediciones precisas, rentables y de alto rendimiento de las velocidades de asociación y disociación fármaco-diana. Existe la necesidad de un método fiable, robusto y sensible destinado a analizar el perfil cinético masivo de nuevas moléculas frente a sus dianas principales y otras posibles.

En el presente documento se describe un método robusto y sensible destinado a determinar el perfil cinético masivo de nuevas moléculas frente a su diana principal (obtención de perfiles de cinética de unión) y también frente a otras dianas relacionadas (obtención de perfiles de selectividad cinética) en un formato de alto rendimiento. El método de la invención combina la versatilidad de los ensayos de unión de radioligandos con las ventajas de nuevos ensayos homogéneos basados en sondas fluorescentes, ahorrando así tiempo y costes, y también protegiendo el entorno.

El acceso a datos cinéticos en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento creará grandes oportunidades para un paradigma de descubrimiento temprano de fármacos muy mejorado. De hecho, tales consideraciones han guiado los primeros ejemplos descritos de compuestos líderes y candidatos a fármacos clínicos seleccionados durante las etapas tempranas basándose en su cinética de unión a la diana (Langlois 2012).

El documento Emami-Nemini A *et al.* 2013 (Emami-Nemini A *et al.*, Time-resolved fluorescence ligand binding for G protein-coupled receptors. Nat Protoc. 2013; 8(7):1307-20) da a conocer dos formatos basados en FRET (TR-FRET/SNAP; TR-FRET/Ab) para estudiar los perfiles cinéticos de la unión de ligandos a GPCR.

El documento Emami-Nemini A *et al.* 2013 no da a conocer un método para calcular el perfil cinético de un compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana, que comprende calcular el perfil cinético de cada compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana a partir de las razones de emisión corregidas (ER^*) ajustando dichas razones de emisión corregidas (ER^*) a un modelo cinético de unión competitiva, en el que el perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se define mediante: la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana, con la condición de que no es necesario predeterminar el valor de la constante de inhibición (K_i) del compuesto de interés frente a la proteína o poliproteína diana.

Además, el documento Emami-Nemini A *et al.* 2013 no da a conocer el cálculo de un perfil cinético y en su lugar da a conocer el cálculo de K_i para la unión de un ligando no marcado a una proteína o poliproteína diana.

El método de Emami-Nemini A *et al.* 2013 requiere que se realicen múltiples experimentos para calcular cada variable del perfil cinético. En cambio, el método de la invención proporciona no sólo la constante de afinidad (K_d o K_i), sino también la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) y determina simultáneamente el perfil cinético en un único experimento en un sistema de selección de alto rendimiento (HTS) y usando un análisis de ajuste global de los datos.

El problema que ha de resolverse puede definirse como la provisión de un método simplificado para determinar el perfil cinético de un compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana en un sistema de selección de alto rendimiento (HTS).

El método de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, proporciona una solución a este problema a través de las características diferenciadoras mencionadas anteriormente.

60 Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

65 La presente invención se refiere a un método fiable, robusto y sensible destinado a analizar el perfil cinético masivo de nuevas moléculas frente a su diana principal (obtención de perfiles de cinética de unión) y también frente a otras

posibles dianas (obtención de perfiles de selectividad cinética).

La presente invención se refiere a un método para calcular el perfil cinético de un compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. mezclar simultáneamente en un pocillo de una microplaca:
- (i) una primera molécula a una primera concentración de entre 1 y 500 nM,
- 10 (ii) dicha proteína o poliproteína diana a una segunda concentración de entre 0,5 - 50 nM, y
- (iii) una tercera molécula a una concentración de saturación para la proteína o poliproteína diana de (ii),
- 15 en el que dicha primera molécula tiene afinidad por dicha proteína o poliproteína diana y se marca con una primera molécula fluorescente, y dicha proteína o poliproteína diana se une a entre 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con una segunda molécula fluorescente, o dicha proteína o proteína diana la poliproteína se marca con dicha segunda molécula fluorescente,
- 20 en el que dicha primera molécula fluorescente es un fluoróforo aceptor y dicha segunda molécula fluorescente es un fluoróforo donador, y
- en el que la tercera molécula es un inhibidor de la proteína o poliproteína diana que compite por los mismos sitios de unión de la diana con la primera molécula;
- 25 b. mezclar simultáneamente en cada uno de n pocillos diferentes de dicha microplaca:
- (i) dicha primera molécula a dicha primera concentración,
- (ii) dicha proteína o poliproteína diana a dicha segunda concentración, y
- 30 (iii) un compuesto de interés a una tercera concentración
- en el que dicha primera molécula tiene afinidad por dicha proteína o poliproteína diana y se marca con dicha primera molécula fluorescente y dicha proteína o poliproteína diana se une a 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con dicha
- 35 segunda molécula fluorescente, o dicha proteína o poliproteína diana se marca con dicha segunda molécula fluorescente,
- en el que la tercera concentración es diferente en cada uno de los n pocillos diferentes de dicha microplaca, en el que las etapas a) y b) se realizan simultáneamente;
- 40 c. medir la intensidad de emisión de las señales de fluorescencia emitidas por el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor en cada mezcla obtenida en las etapas a) y b) con un lector de microplacas en tiempos específicos desde 0 hasta 15 horas, en el que se miden dichas intensidades de emisión simultáneamente para todos los pocillos de dicha microplaca en cada tiempo específico o se miden dichas intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha
- 45 microplaca en el plazo de cinco minutos de cada tiempo específico;
- d. calcular la razón de emisión corregida (ER^*) para cada una de las n mezclas diferentes obtenidas en la etapa b) en cada tiempo específico, en el que la razón de emisión corregida para una mezcla dada obtenida en la etapa b) en un tiempo específico dado, se calcula restando la razón de emisión de la mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado (ER_a) de la razón de emisión de dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado (ER_b),
- 50 en el que:
- 55 ER_a se calcula dividiendo la intensidad de emisión de fluoróforo aceptor en dicha mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado ($afEI_a$) entre la intensidad de emisión de fluoróforo donador en dicha mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado ($dfEI_a$) y
- 60 ER_b se calcula dividiendo la intensidad de emisión de fluoróforo aceptor en dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado ($afEI_b$) entre la intensidad de emisión de fluoróforo donador en dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado ($dfEI_b$); y
- e. calcular el perfil cinético de cada compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana a partir de las razones de emisión corregidas (ER^*) obtenidas en la etapa d) ajustando dichas razones de emisión corregidas (ER^*) a un modelo cinético de unión competitiva, en el que el perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se define mediante: la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de
- 65

asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana,

5 con la condición de que no es necesario predeterminar el valor de la constante de inhibición (K_i) del compuesto de interés frente a la proteína o poliproteína diana.

Descripción de las figuras

10 Figura 1: Esquema de flujo de trabajo del método. Después de elegir el modo de análisis (obtención de perfiles cinéticos de unión u obtención de perfiles cinéticos de selectividad), los ensayos se realizan en la microplaca y el lector de microplacas adquiere la fluorescencia emitida. Los datos registrados por el lector de microplacas se gestionan por la aplicación de software Kinetic Data Management E.0 y se obtiene la determinación de perfiles cinéticos de cada compuesto.

15 Figura 2: Esquema de flujo de trabajo de la aplicación de software Kinetic Data Management E.0. Las mediciones de datos fluorescentes (URF) se obtienen después de leer la fluorescencia de cada pocillo de la microplaca en dos longitudes de onda diferentes. Se adquieren hasta 300 mediciones repetidas por pocillo en tiempo real (hasta 240.000 puntos de datos por microplaca). La aplicación de software calcula la razón de emisión (ER, *emission ratio*) de cada pocillo y registra este valor, multiplicado por 10.000. Cuando no hay más señales de fluorescencia, todos los datos de ER adquiridos se guardan en un archivo Excel de salida. Dependiendo del diseño predeterminado seleccionado en el modo de análisis (obtención de perfiles cinéticos de unión u obtención de perfiles cinéticos de selectividad), se obtendrán diferentes tablas XY por microplaca individual, en el que X son las concentraciones de compuesto en el ensayo e Y son las mediciones de tiempo en segundos o minutos.

25 Figura 3: Caracterización cinética de un ligando conocido marcado con un fluoróforo (Tracer™ 314) frente a la lípido quinasa PI3K-delta. Se ensayaron concentraciones conocidas del trazador (0-20 nM) con la diana PI3K-delta. Se ajustaron los datos al "modelo de asociación en una única fase" y se obtuvieron K_{on} , K_{off} y K_d del ligando marcado para PI3K-delta.

30 Figura 4: Ejemplo de obtención de perfiles cinéticos de unión. Caracterización del perfil cinético de dos inhibidores de referencia frente a la misma diana (PI3K-delta). Se analizaron 8 concentraciones de los inhibidores wortmanina y BEZ-235 (0-250 nM) frente a PI3K-delta. A partir de las razones de emisión corregidas (ER) obtenidas para cada inhibidor, se calcularon K_{on} (K_3), K_{off} (K_4), K_d , τ y $t_{1/2}$.

35 Figura 5: Ejemplo de la obtención de perfiles cinéticos de selectividad. Caracterización del perfil cinético de dos compuestos de referencia frente a tres dianas distintas de la misma familia (CDKs transcripcionales). Se caracterizaron ocho concentraciones de 0 a 1000 nM de los compuestos de referencia sorafenib y estaurosporina frente a las CDKs transcripcionales CDK8/ciclina C, CDK9/ciclina T1 y CDK7/ciclina H/MNAT1. A partir de las razones de emisión corregidas (ER) obtenidas para cada compuesto frente a cada diana, se calcularon K_{on} (K_3), K_{off} (K_4), K_d , τ y $t_{1/2}$. Los valores de sorafenib frente a CDK9/ciclina T1 y CDK7/ciclina H/MNAT1 no se determinaron (nd).

45 Figura 6: Representación gráfica de la razón de emisión corregida (ER^*) a lo largo del tiempo según concentraciones diferentes de antagonista opioide (trazador) que, cuando se ajusta a la ecuación de asociación en una única fase, proporciona los parámetros cinéticos correspondientes, K_{on} , K_{off} y K_d , que resumen los datos cinéticos de la interacción de antagonista opioide L0005RED - hMOR del ligando marcado (antagonista opioide) a hMOR.

50 Figura 7: Parámetros estadísticos a lo largo del tiempo. Análisis para garantizar que los datos obtenidos se ajustan a los criterios de control de calidad. Se calcularon la relación S/B y el valor de Z' + para CDK8/ciclina C registrando datos de fluorescencia desde 0 hasta 600 minutos.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención se refiere a un método fiable, robusto y sensible destinado a analizar los perfiles cinéticos en masa de nuevas moléculas o compuestos de interés frente a sus principales proteínas o poliproteínas diana y frente a tales proteínas o poliproteínas diana potenciales. El método es para calcular el perfil cinético de un compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana, que comprende las siguientes etapas:

a. mezclar simultáneamente en un pocillo de una microplaca:

60 (i) una primera molécula a una primera concentración de entre 1 - 500 nM,

(ii) dicha proteína o poliproteína diana a una segunda concentración de entre 0,5 - 50 nM, y

65 (iii) una tercera molécula a una concentración de saturación para la proteína o poliproteína diana de (ii),

en el que dicha primera molécula tiene afinidad por dicha proteína o poliproteína diana y se marca con una primera

molécula fluorescente, y dicha proteína o poliproteína diana se une a entre 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con una segunda molécula fluorescente, o dicha proteína diana o la poliproteína se marca con dicha segunda molécula fluorescente,

5 en el que dicha primera molécula fluorescente es un fluoróforo aceptor y dicha segunda molécula fluorescente es un fluoróforo donador, y

en el que la tercera molécula es un inhibidor de la proteína o poliproteína diana que compite por los mismos sitios de unión de la diana con la primera molécula;

10

b. mezclar simultáneamente en cada uno de n pocillos diferentes de dicha microplaca:

(i) dicha primera molécula a dicha primera concentración,

15

(ii) dicha proteína o poliproteína diana a dicha segunda concentración, y

(iii) un compuesto de interés a una tercera concentración

20

en el que dicha primera molécula tiene afinidad por dicha proteína o poliproteína diana y se marca con dicha primera molécula fluorescente y dicha proteína o poliproteína diana se une a 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con dicha segunda molécula fluorescente, o dicha proteína o poliproteína diana se marca con dicha segunda molécula fluorescente,

25

en el que la tercera concentración es diferente en cada uno de los n pocillos diferentes de dicha microplaca, en el que las etapas a) y b) se realizan simultáneamente;

30

c. medir la intensidad de emisión de las señales de fluorescencia emitidas por el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor en cada mezcla obtenida en las etapas a) y b) con un lector de microplacas en tiempos específicos desde 0 hasta 15 horas, en el que se miden dichas intensidades de emisión simultáneamente para todos los pocillos de dicha microplaca en cada punto en el tiempo específico o se miden dichas intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha microplaca en el plazo de cinco minutos de cada tiempo específico;

35

d. calcular la razón de emisión corregida (ER^*) para cada una de las n mezclas diferentes obtenidas en la etapa b) en cada tiempo específico, en el que la razón de emisión corregida para una mezcla dada obtenida en la etapa b) en un tiempo específico dado, se calcula restando la razón de emisión de la mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado (ER_a) a partir de la razón de emisión de dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado (ER_b),

40

en el que:

ER_a se calcula dividiendo la intensidad de emisión de fluoróforo aceptor en dicha mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado ($afEI_a$) entre la intensidad de emisión de fluoróforo donador en dicha mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado ($dfEI_a$) y

45

ER_b se calcula dividiendo la intensidad de emisión de fluoróforo aceptor en dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado ($afEI_b$) entre la intensidad de emisión de fluoróforo donador en dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado ($dfEI_b$); y

50

e. calcular el perfil cinético de cada compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana a partir de las razones de emisión corregidas (ER^*) obtenidas en la etapa d) ajustando dichas razones de emisión corregidas (ER^*) a un modelo cinético de unión competitiva, en el que el perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se define mediante: la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana,

55

con la condición de que no es necesario predeterminar el valor de la constante de inhibición (K_i) del compuesto de interés frente a la proteína o poliproteína diana.

60

El objeto de la invención es proporcionar un método para determinar los perfiles cinéticos de nuevas moléculas o compuestos de interés frente a posibles proteínas o poliproteínas mediante un ensayo de unión competitiva.

65

En una realización preferida del método de la invención, la proteína o poliproteína diana se une a entre 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con una segunda molécula fluorescente, y en el que se miden las intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha microplaca en el plazo de cinco minutos de cada tiempo específico.

En una realización preferida del método de la invención, el método para calcular el perfil cinético de cada compuesto

de interés frente a una proteína o poliproteína diana se realiza en un sistema de alto rendimiento (HTS, *high throughput system*).

5 En la presente invención, un sistema de alto rendimiento (HTS) se refiere a un método automatizado que usa robótica, software de control y procesamiento de datos, dispositivos de manipulación de líquidos y detectores sensibles, para realizar rápidamente millones de pruebas químicas, genéticas o farmacológicas.

10 En una realización preferida del método de la invención, la proteína o poliproteína diana comprende al menos una enzima, receptor acoplado a proteínas G, canal iónico, receptor hormonal, proteína estructural y/o proteína transportadora de membrana.

En una realización preferida del método de la invención, el fluoróforo donador comprende un lantánido seleccionado de europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm) o terbio (Tb).

15 En una realización preferida del método de la invención, n es al menos 3.

En una realización preferida del método de la invención, n es un número entre 4 y 8.

20 En una realización preferida del método de la invención, la intensidad de emisión de la señal de fluorescencia medida en la etapa c) se realiza mediante polarización de fluorescencia (FP) o mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET). Más preferiblemente, la medición se realiza mediante TR-FRET.

25 En una realización preferida del método de la invención, el lector de microplacas:

a) mide la intensidad de emisión de cada señal de fluorescencia en dos longitudes de onda, y

b) genera un archivo de valores separados por comas con todas las mediciones determinadas en la etapa a).

30 En una realización preferida del método de la invención, el cálculo del perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se realiza con una aplicación de software ajustada a un modelo de unión competitiva.

35 En una realización preferida del método de la invención, los perfiles cinéticos de múltiples compuestos de interés frente a una única proteína o poliproteína diana se miden en una única microplaca.

En una realización preferida del método de la invención, los perfiles cinéticos de un único compuesto de interés frente a múltiples proteínas o poliproteínas diana se miden en una única microplaca.

40 En una realización preferida del método de la invención, en cada una de las etapas a. y b. la proteína o poliproteína diana se añade a una composición que comprende las otras moléculas, o una composición que comprende las otras moléculas se añade a la proteína o poliproteína diana, antes de mezclar.

45 En una realización preferida del método de la invención, la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se emiten simultáneamente.

50 Con el propósito de la presente invención, el término “comprender” o “que comprende”, en la totalidad de la presente descripción de patente incluye, específicamente, el término “que consiste” o “que consiste en”, cuando se hace referencia al método para determinar los perfiles cinéticos en el descubrimiento de fármacos.

55 El término “proteína o poliproteína diana” en la presente invención comprende al menos una enzima, receptor acoplado a proteínas G, canal iónico, receptor hormonal, proteína estructural y/o proteína transportadora de membrana.

60 Para la presente invención, los términos “compuesto de interés” y “primera molécula” se refieren a cualquier molécula que pueda unirse a los sitios de unión específica en la proteína o poliproteína diana a los que también se une la tercera molécula, tales como inhibidores, agonistas, antagonistas, fármacos, efectores, metabolitos entre otros.

65 Un “anticuerpo” en la presente invención se refiere a un anticuerpo que reconoce la proteína o poliproteína diana del ensayo. Este anticuerpo se marca con un fluoróforo donador. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo se marca con una luciferasa donadora que cataliza la producción de una molécula luminiscente que es un luminóforo donador. En una realización preferida, el fluoróforo donador comprende un lantánido seleccionado de: europio (Eu), samario (Sm), terbio (Tb) o disprosio (Dy). En un aspecto de la divulgación, la luciferasa es una luciferasa que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con una luciferasa seleccionada del género *Photinus* (tal como la

luciferasa de luciérnaga derivada de *Photinus pyralis*), *Vibrio*, *Renilla* (tal como luciferasa de renilla o RLuc derivada de *Renilla reniformis*), *Metridia*, *Photorhabdus*, *Oplophorus* (tal como luciferasa NanoLuc® (Promega) derivada de *Oplophorus gracilirostris*) o de dinoflagelados. En una realización más preferida, el fluoróforo donador comprende un lantánido seleccionado de: europio (Eu) o terbio (Tb). En un aspecto de la divulgación, la luciferasa es una luciferasa que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con una luciferasa seleccionada del género *Photinus* o *Oplophorus*, incluso más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos el 95% con una luciferasa de *Photinus pyralis* tal como la luciferasa de luciérnaga o luciferasa de *Oplophorus gracilirostris* tal como NanoLuc® (Promega).

A efectos de la presente invención, el término “marcado con” significa “unido a”. El método de la invención tiene lugar en una microplaca, una placa de microtitulación, una placa de micropocillos o una pared múltiple, una placa plana rectangular, generalmente desechable y compuesta por plástico que presenta una rejilla de pequeños orificios abiertos denominados pocillos. En general, las microplacas modernas para HTS tienen o bien 384, o bien 1536 o bien 3456 pocillos.

A efectos de la presente invención, una primera molécula (también denominada en el presente documento “trazador”) es una molécula marcada con un fluoróforo, un compuesto químico fluorescente que puede emitir luz tras su excitación, que puede unirse a la proteína o poliproteína diana del ensayo. Dicho fluoróforo puede seleccionarse entre, sin limitación, los colorantes Alexa Fluor™ y BODIPY™ (Life Technologies), DyLight™ Fluor (Thermo Scientific, Pierce), colorantes Atto y Tracy (Sigma Aldrich), FluoProbes™ (Interchim), etc. Este fluoróforo funciona como fluoróforo aceptor en el método de la invención. La unión del trazador a la proteína o poliproteína diana (a la que se une una segunda molécula fluorescente o el anticuerpo que se marca con una segunda molécula fluorescente), produce un alto grado de FRET (cuando se usa una segunda molécula fluorescente), mientras que el desplazamiento del trazador de la proteína o poliproteína diana por un inhibidor de proteína o poliproteína diana (tercera molécula o compuesto de interés) da como resultado una pérdida de FRET (cuando se usa una segunda molécula fluorescente). En un aspecto de la divulgación, la unión del trazador a la proteína o poliproteína diana (a la que se une una luciferasa o el anticuerpo que se marca con una luciferasa), produce un alto grado de BRET, mientras que el desplazamiento del trazador de la proteína o poliproteína diana por un inhibidor de proteína o poliproteína diana (tercera molécula o compuesto de interés) da como resultado una pérdida de BRET.

A efectos de la presente invención, la tercera molécula a una concentración de saturación para la proteína o poliproteína diana se refiere a una molécula a una concentración en la que todos los receptores de la diana están ocupados efectivamente. La mezcla en un pocillo de la microplaca de la primera molécula (“trazador”), la proteína o poliproteína diana y la tercera molécula, mostrará una posible unión inespecífica entre la diana y el trazador, debido al hecho de que cualquier señal de fluorescencia detectada a partir de esta mezcla será producto de dicha unión inespecífica, porque todos los receptores de la diana están ocupados por la tercera molécula y, por tanto, el trazador se unirá a un sitio o receptor de unión inespecífica en la molécula diana. Por tanto, en una realización preferida en cada una de las etapas a. y b. de los métodos de la invención, la proteína o poliproteína diana se añade a una composición que comprende las otras moléculas dadas a conocer en dichas etapas respectivas, o una composición que comprende las otras moléculas dadas a conocer en dichas etapas respectivas se añade a la proteína o poliproteína diana, antes de mezclar. Preferiblemente, dicho mezclado se realiza en las etapas a. y b. en el plazo de 5 minutos entre sí, más preferiblemente en el plazo de 1 minuto entre sí, incluso más preferiblemente de manera simultánea. Por consiguiente, la proteína o poliproteína diana es el último compuesto añadido a cada pocillo de dicha microplaca, o el primer compuesto añadido a cada pocillo de dicha microplaca antes de mezclar, de modo que en el momento inmediatamente anterior a que se inicie la unión ($t = 0$), todos los sitios de unión de la proteína o poliproteína diana están desocupados.

A efectos de la presente invención, el compuesto de interés está representado por n concentraciones diferentes. Una n -ésima concentración se refiere a la concentración de dicho compuesto que proviene de una dilución en serie. Una dilución en serie se refiere a una dilución gradual de una sustancia en disolución, en una serie de cantidades proporcionales. En la presente invención, se ensayan varias diluciones del compuesto de interés para cada diana. En una realización de la invención, n es al menos 3. Preferiblemente, n es un número entre 4 y 8.

El lector de microplacas, el lector de placas o los fotómetros de microplacas son instrumentos que se usan para detectar eventos biológicos, químicos o físicos de muestras en microplacas. Se usan ampliamente en investigación, descubrimiento de fármacos, validación de bioensayos, procesos de fabricación y control de calidad en la industria farmacéutica y biotecnológica y en organizaciones académicas. Los modos de detección comunes para los ensayos en microplacas son absorbancia, fluorescencia, intensidad, luminiscencia, FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia), fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET), polarización de fluorescencia (FP) y transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET).

La afinidad de un ligando o inhibidor reversible se mide por su capacidad de unión para la molécula diana, y esto se cuantifica normalmente midiendo la constante de disociación para el complejo diana-inhibidor o diana-ligando (K_d). En este caso particular, la constante de disociación a veces se denomina constante de inhibición (K_i). Este valor puede relacionarse con la concentración de inhibidor (o ligando) que se requiere para disminuir la velocidad máxima de la reacción (por ejemplo, unión) a la mitad (CI_{50}), usando diferentes ecuaciones según la modalidad inhibidora. El

método de la invención se basa en el modelo cinético de unión competitiva y, por tanto, no es necesario preincubar la diana con una concentración de saturación de cada molécula que va a analizarse antes de comenzar el ensayo. Al eliminar esta etapa no hay necesidad de predeterminar el valor de K_i de cada molécula en un experimento clásico de dosis-respuesta y todas las moléculas se añaden a varias concentraciones. Por tanto, el método de la invención implica una reducción importante del tiempo y los costes asociados al análisis, que son grandes ventajas de interés para la industria farmacéutica. Además, la presente invención simplifica enormemente el diseño experimental y permite fácilmente la automatización completa de todo el proceso.

El método dado a conocer en la invención establece un método rápido y simple para determinar la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de nuevos compuestos de interés frente a una proteína o poliproteína diana en un formato de alto rendimiento para determinar los perfiles cinéticos de dichos compuestos en el descubrimiento de fármacos. A efectos de la presente invención, el término constante de disociación o afinidad (K_d) se refiere a la afinidad entre un ligando (tal como un fármaco) y una proteína (la diana). Cuanto menor es la constante de disociación, más fuertemente se une el ligando, o mayor es la afinidad entre el ligando y la proteína. Para la presente invención, los términos constante de velocidad de asociación, K_{on} o velocidad de asociación (*on-rate*) se usan indistintamente y deben tomarse como sinónimos. De manera análoga, los términos constante de velocidad de disociación, K_{off} o velocidad de disociación (*off-rate*) se usan indistintamente. A efectos de la presente invención, el término tiempo de permanencia se cuantifica mediante la constante de relajación (τ), que es la inversa de la constante de velocidad de disociación ($1/k_{off}$). Para la presente invención, el término $t_{1/2}$ se refiere a la semivida de disociación de un complejo fármaco-diana y puede definirse como la constante de tiempo de relajación multiplicada por 0,693 ($t_{1/2} = -\ln[0,5]/k_{off}$ o $t_{1/2} = -\ln[0,5] * \tau$). Por tanto, en una realización, el perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se define mediante: la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}), y la constante de relajación (τ) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana.

El método de la invención se basa en fluorescencia. En un aspecto de la divulgación, se usan métodos luminiscentes. La industria farmacéutica ha usado extensamente métodos fluorescentes y otros métodos luminiscentes para el desarrollo de muchos ensayos biológicos destinados a examinar compuestos en proyectos de descubrimiento de fármacos. Muchos factores contribuyen a este hecho, tales como su alta sensibilidad y su amplio rango dinámico. Además, en contraste con los métodos de absorbancia o radiactividad, que están limitados rápidamente por su sensibilidad cuando se miniaturizan, las señales de fluorescencia son estrictamente proporcionales a la concentración de fluoróforo, cualquiera que sea el volumen, lo que permite la miniaturización. Además, la mayoría de los métodos fluorescentes son homogéneos y pueden ejecutarse en una única etapa, evitando las fases de lavado e incubación en los ensayos clásicos.

Sin embargo, la gran mayoría de los métodos fluorescentes y otros métodos luminiscentes existentes en el estado de la técnica, están impulsados por ensayos enzimáticos o de unión destinados a mediciones de unión en equilibrio. Recientemente, se han descrito algunos métodos de unión de TR-FRET adaptados para medir las velocidades de disociación (K_{off}) usando un método de gran dilución clásico, pero esos métodos no pueden usarse en un formato de alto rendimiento. Además, sólo permiten la determinación de la constante de velocidad de disociación (K_{off}). Por el contrario, el método de la invención proporciona un perfil cinético detallado de cada molécula, que incluye las constantes de asociación, disociación y afinidad. Puesto que la duración global de un complejo fármaco-diana puede verse influenciada por ambas, la K_{on} y la K_{off} , la información cinética detallada obtenida mediante el uso del método de la presente invención, para cada molécula es crucial durante el proceso de diseño de moléculas principales y puede afectar significativamente a la farmacodinámica y la seguridad del fármaco en la evaluación en pacientes de las componentes temporales de eficacia y selectividad de diana. La eficacia de un fármaco está relacionada con el tiempo que el fármaco permanece unido a la diana principal sobre la que actuará dicho fármaco. La toxicidad de un compuesto también puede determinarse, basándose en su relación con la selectividad cinética. La presente invención permite la determinación de cuántas dianas deseables o indeseables pueden unirse el fármaco, y durante cuánto tiempo permanece esta unión.

Ejemplos de los modos de detección son la polarización de fluorescencia (FP) y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET). Ambos métodos permiten el desarrollo de ensayos altamente sensibles y homogéneos mediante el uso de un trazador en el rojo lejano (fluoróforo) para minimizar la interferencia del compuesto y proporcionar una lectura robusta. El método de la invención usa el ensayo de TR-FRET como ejemplo, pero es posible generalizar a los métodos para FP debido a su similitud para un experto en la técnica. El principio de FRET se basa en la transferencia de energía entre dos fluoróforos, un donador y un aceptor. Cuando las dos entidades se acercan lo suficiente entre sí, la excitación del donador mediante una fuente de luz desencadena una transferencia de energía hacia el aceptor que emite, a su vez, fluorescencia específica a una longitud de onda dada. Las interacciones moleculares entre biomoléculas pueden evaluarse acoplando cada pareja con un marcador fluorescente y detectando el nivel de transferencia de energía. La FRET con resolución temporal utiliza fluoróforos de larga vida combinados con la detección basada en fluorescencia con resolución temporal que permite minimizar las interferencias de fluorescencia inmediata de fondo (principalmente compuestos y proteínas presentes en líquidos biológicos o suero que son fluorescentes de manera natural) que son de vida corta en comparación con los marcadores de vida larga usados. En una realización de la invención, se mide la intensidad de

emisión de las señales de fluorescencia emitidas en el método de la invención mediante polarización de fluorescencia (FP) o transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET). En un aspecto de la divulgación, se mide la intensidad de emisión de las señales de luminiscencia emitidas usando la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) que permite el desarrollo de ensayos
 5 altamente sensibles y homogéneos mediante el uso de un trazador azul-verde (luminóforo producido mediante catálisis por luciferasa). En una realización más preferida, se mide la intensidad de la señal de fluorescencia mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET). En un aspecto de la divulgación, se mide la intensidad de la señal de luminiscencia mediante transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). En una realización preferida de la invención, el fluoróforo donador
 10 comprende un lantánido seleccionado de europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm) o terbio (Tb). En un aspecto de la divulgación, el luminóforo donador comprende una molécula luminiscente que se produce mediante oxidación catalizada por luciferasa de una luciferina. En un aspecto de la divulgación, dicha luciferina se selecciona de ácido (4S)-2-(6-hidroxi-1,3-benzotiazol-2-il)-4,5-dihidrotiazol-4-carboxílico, formiato de (E)-2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohex-1-il)-1-buten-1-ol,
 15 6-(4-hidroxifenil)-2-[(4-hidroxifenil)metil]-8-(fenilmetil)-7H-imidazo[3,2-a]pirazin-3-ona (coelenteracina), 2-[3-[2-[(2S)-butan-2-il]-6-(1H-indol-3-il)-3-oxo-7H-imidazo[2,1-c]pirazin-8-il]propil]guanidina, 2-furanilmetil-desoxi-coelenteracina, luciferina bacteriana y luciferina de dinoflagelados.

La metodología de la invención combina la alta sensibilidad y capacidad de procesamiento de la tecnología TR-FRET con las ventajas del enfoque cinético de unión competitiva descrito por Motulski y Mahan en los años ochenta,
 20 que se ha usado extensamente con ligandos de marcadores radiactivos para el análisis cinético. Como consecuencia, el método de la invención minimiza los impactos ambientales adversos evitando la radiactividad y maximiza los beneficios económicos, reduciendo los tiempos, costes y volúmenes necesarios para realizar la caracterización del perfil cinético de nuevas moléculas.

En el método de la presente invención, el lector de microplacas mide la intensidad de emisión de cada señal de fluorescencia (fluoróforos donador y aceptor) y genera archivos csv (valores separados por comas, son archivos que
 25 almacenan datos tabulares, números y texto, en forma de texto simple) con todas las mediciones determinadas. En un aspecto de la divulgación, el lector de microplacas mide la intensidad de emisión de cada señal de luminiscencia y fluorescencia (luminóforo donador y fluoróforo aceptor, respectivamente) en dos longitudes de onda diferentes (que dependerán del fluoróforo usado en cada ensayo). El método de la invención mide los perfiles cinéticos, preferiblemente con un sistema de alto rendimiento (HTS) y los resultados se gestionan con la aplicación de software Kinetic data Management E.0, una aplicación de software de Visual Basic desarrollada por los inventores
 30 que importan los datos de los archivos csv obtenidos en el lector de microplacas, identificando el ensayo en cada pocillo de la microplaca según un diseño predefinido. Un diseño predefinido en la presente invención se refiere a una organización específica de las muestras en la microplaca, colocada en el lector de microplacas y seleccionada específicamente antes de comenzar a medir la fluorescencia. La aplicación de software Kinetic data Management E.0 calcula la razón de emisión de cada pocillo de la microplaca y genera un archivo de salida con los datos registrados. La expresión razón de emisión (ER) se refiere en la presente invención, por ejemplo, a una razón de emisión de TR-FRET calculada dividiendo la emisión de fluorescencia del aceptor entre la emisión de fluorescencia del donador respectivo de cada pocillo. Por tanto, en una realización preferida, la intensidad de emisión de la señal de fluorescencia medida en la etapa b) se realiza mediante polarización de fluorescencia (FP) o mediante
 35 transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET), más preferiblemente, la medición se realiza mediante TR-FRET. En un aspecto de la divulgación, la intensidad de emisión de la señal de fluorescencia medida en la etapa b) se realiza mediante transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). En una realización preferida adicional, el lector de microplacas mide la intensidad de emisión de cada señal de fluorescencia a dos longitudes de onda, y genera un archivo de valores separados por comas con todas las mediciones determinadas en la etapa a). En un aspecto de la divulgación, el lector de microplacas mide la intensidad de emisión de una señal de fluorescencia y una señal de luminiscencia a diferentes longitudes de onda, y genera un archivo de valores separados por comas con todas las mediciones determinadas en la etapa a). En la presente
 40 invención, la intensidad de emisión de las señales de fluorescencia emitidas por el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor en cada mezcla obtenida en las etapas a) y b) se mide con un lector de microplacas en tiempos específicos desde 0 hasta 15 horas, en el que se miden dichas intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha microplaca en el plazo de cinco minutos de cada tiempo específico. Preferiblemente, se miden dichas intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha microplaca en el plazo de los dos minutos de cada tiempo específico,
 45 más preferiblemente, en el plazo de un minuto y medio de cada tiempo específico.

En una realización preferida, el perfil cinético de un compuesto de interés frente a la proteína o poliproteína diana se define total o parcialmente mediante la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}), la constante de relajación (τ) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho
 60 compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana. En una realización más preferida de la invención, el cálculo del perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se realiza con una aplicación de software ajustada a un modelo de unión competitiva, preferiblemente un modelo cinético de unión competitiva.

Los parámetros cinéticos de cada compuesto de interés se realizan con una aplicación de software ajustada a un modelo competitivo. Estos parámetros cinéticos se determinan introduciendo el archivo de salida con los datos

generados por la aplicación de software Kinetic data Management E.0 en un software para analizar la cinética molecular, por ejemplo, GraphPad, Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla CA, EE.UU.), y ajustando los valores a un "modelo cinético de unión competitiva". Dicho ajuste implica ajustar matemática o estadísticamente los datos de razón de emisión corregida (ER^*) a dicho modelo cinético de unión competitiva. Preferiblemente, dicho ajuste implica la regresión de la razón de emisión corregida (ER^*) a dicho modelo cinético de unión competitiva. En una realización particular, todos los parámetros cinéticos (K_d , K_{on} , K_{off} , τ y $t_{1/2}$) se obtienen al mismo tiempo para cada unión ligando-diana.

El método de la invención puede usarse de dos maneras diferentes dependiendo de las necesidades: obtención de perfiles cinéticos de unión y obtención de perfiles cinéticos de selectividad.

La primera manera, la obtención de perfiles cinéticos de unión, permite seleccionar múltiples compuestos frente a una única proteína o poliproteína diana, obteniendo el perfil cinético particular de cada compuesto. Esta información es de particular interés para comprender cómo las diferentes estructuras químicas interactúan de diferente manera con la diana. Estos compuestos pueden no discriminarse si se evalúan mediante la afinidad de unión en equilibrio y tales diferencias cinéticas pueden indicar una nueva conformación de proteínas o una tensión interna significativa en el compuesto unido. Esta información cinética impulsará realmente a los químicos médicos a seleccionar aquellas moléculas con una mejor eficiencia predicha. La importancia del tiempo de permanencia de fármaco-diana (y la semivida de disociación del complejo binario fármaco-diana) se enfatiza por su posible impacto en el efecto de duración y la selectividad de la diana. Por tanto, en una realización preferida de la invención, se miden los perfiles cinéticos de múltiples compuestos de interés frente a una única proteína o poliproteína diana en una única microplaca.

La segunda manera, la obtención de perfiles cinéticos de selectividad, permite la detección de un compuesto seleccionado frente a múltiples proteínas o poliproteínas diana, obteniéndose información de cómo esta molécula particular interactúa no sólo con su diana principal sino también con otras posibles dianas en un contexto dinámico. Esta información también es muy valiosa, puesto que muchos fármacos no llegan al mercado debido a problemas de seguridad. Al usar el método de las dos maneras, es posible seleccionar aquellos compuestos con mayor eficiencia potencial y mejores perfiles de seguridad. Además, usando el método en el modo de obtención de perfiles cinéticos de selectividad, también pueden identificarse dianas desconocidas y realizarse el potencial de nuevos usos terapéuticos. Por tanto, en una realización preferida de la invención, se miden los perfiles cinéticos de un único compuesto de interés frente a múltiples proteínas o poliproteínas diana en una única microplaca.

En otro aspecto, este análisis cinético puede complementar los estudios clásicos de relación cuantitativa de estructura-actividad (RCEA) con la relación entre estructura y cinética (REC). Este aspecto es de crucial interés para seleccionar los mejores compuestos para llegar al mercado, lo que permite tomar decisiones pronto y, por tanto, seleccionar aquellos compuestos con mayor potencial de eficiencia y mejores perfiles de seguridad.

En otro aspecto, el método de la invención permite la selección de compuestos con un perfil clínico que es importante para los pacientes: eficacia, seguridad, duración de la acción, mayor tolerabilidad, indicación y diferenciación terapéutica.

Por tanto, el método de la invención permite obtener datos cinéticos en las fases preclínicas tempranas del desarrollo de fármacos, proporcionando una ventaja competitiva a la hora de identificar y mejorar nuevos agentes terapéuticos.

Otra ventaja del método de la invención frente a los métodos de gran dilución clásicos es su simplicidad. Los métodos de la técnica anterior son mucho más complicados y no pueden convertirse fácilmente a un formato de alto rendimiento, como lo hace la presente invención. De hecho, el ajuste global de la cinética del modelo de unión competitiva a los datos de ER^* para cualquier compuesto de interés y proteína o poliproteína diana dado permite que se emitan la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (K_{off}), la constante de relajación (τ) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés a partir de un único método frente a dicha proteína o poliproteína diana, mediante lo cual pueden obtenerse múltiples perfiles cinéticos para múltiples interacciones de compuestos de interés frente a proteínas o poliproteínas diana en un único método, según la presente invención.

En otro aspecto, el método mantiene una ventana de ensayo óptima (> 2) y un buen factor Z' ($> 0,4$) hasta 15 horas mediante el uso de concentraciones de diana en el rango de nanomolar bajo a picomolar. Este es un aspecto crítico para determinar con precisión los parámetros cinéticos de moléculas muy potentes con comportamiento no clásico (inhibidores de unión fuerte y/o de unión lenta). La técnica anterior no describe datos cinéticos que muestren una sensibilidad tan alta y, por tanto, no pueden estimar con precisión los parámetros cinéticos reales.

En la presente invención, la proteína o poliproteína diana comprende al menos una enzima, receptor acoplado a proteínas G, canal iónico, receptor hormonal, proteína estructural y/o proteína transportadora de membrana. En una realización preferida, la proteína o poliproteína diana se selecciona de enzimas con actividad quinasa. La concentración de proteína o poliproteína diana en el método de la invención es de 0,05-50 nM. En una realización

preferida, la concentración de la proteína o poliproteína diana varía en el rango picomolar. El rango picomolar preferido de la concentración de proteína o poliproteína diana es crítico para determinar con precisión los parámetros cinéticos de moléculas muy potentes con comportamiento no clásico (inhibidores de unión fuerte y/o de unión lenta).

5 En una realización más preferida, a efectos de detección de los datos obtenidos mediante el método de la invención, es necesario que la proteína o poliproteína diana se marque con una molécula fluorescente, o se una a un anticuerpo marcado con una molécula fluorescente. En un aspecto de la divulgación, la proteína o poliproteína diana se marca con una luciferasa o se une a un anticuerpo marcado con una luciferasa. En una realización más preferida de la invención, la molécula fluorescente comprende un lantánido. El intervalo de concentración del anticuerpo marcado en la presente invención es desde 0,5 hasta 5 nM. En una realización preferida, el lantánido se selecciona entre europio (Eu), samario (Sm), terbio (Tb) o disprosio (Dy). En una realización más preferida, el marcador de la diana o del anticuerpo que reconoce la diana es europio (Eu) o terbio (Tb). En un aspecto de la divulgación, la luciferasa es una luciferasa que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con una luciferasa seleccionada del género *Photinus*, *Vibrio*, *Renilla*, *Metridia*, *Photorhabdus*, *Oplophorus* o de dinoflagelados.

10 En la presente invención, n se refiere al número de pruebas realizadas en la misma microplaca para un compuesto de interés. Cada prueba se refiere a una concentración diferente de dicho compuesto de interés. Las n concentraciones del compuesto de interés se obtienen mediante dilución en serie del compuesto de interés más concentrado. Preferiblemente, n es al menos 3 concentraciones diferentes del compuesto de interés. En una realización aún más preferida, n es un número entre 4 y 8. Por tanto, en dicha realización aún más preferida, se obtendrán hasta ocho datos de cada compuesto de interés (datos para cada concentración del compuesto de interés). El intervalo de concentración del compuesto de interés que va a ensayarse frente a la proteína o poliproteína diana es desde 100 femtomolar hasta 100 micromolar, preferiblemente de 10 picomolar a 50 micromolar.

15 La primera molécula, un ligando marcado, conjugada con un colorante fluorescente (a efectos de la presente invención también denominado "trazador") reconoce la proteína o poliproteína diana del ensayo. En una realización, este trazador se mezcla simultáneamente en un pocillo de la microplaca con la proteína o poliproteína diana y con un ligando conocido de la proteína o poliproteína diana a una concentración de saturación. En una realización preferida en cada una de las etapas a. y b. de los métodos de la invención, la proteína o poliproteína diana se añade a una composición que comprende las otras moléculas dadas a conocer en dichas etapas respectivas, o una composición que comprende las otras moléculas dadas a conocer en dichas etapas respectivas se añade a la proteína o poliproteína diana, antes de mezclar, preferiblemente, en el que dicho mezclado se realiza en las etapas a. y b. en el plazo de 5 minutos entre sí, más preferiblemente, en el plazo de 1 minuto entre sí, aún más preferiblemente, de manera simultánea. Por consiguiente, en las etapas a. y b., la proteína o poliproteína diana es el último compuesto añadido a cada pocillo de dicha microplaca, o el primer compuesto añadido a cada pocillo de dicha microplaca antes de mezclar, de modo que en el momento inmediatamente anterior a iniciarse la unión ($t = 0$), todos los sitios de unión de la proteína o poliproteína diana están desocupados. El ligando a una concentración de saturación ocupará todos los sitios de unión de la proteína o poliproteína diana, evitando que el trazador se una a la misma proteína o poliproteína diana. Este es el control negativo de la invención, debido al hecho de que cualquier señal de fluorescencia detectada por el fluoróforo aceptor en este pocillo será el resultado de una unión inespecífica de esta molécula a la proteína o poliproteína diana. En otra realización, el trazador se mezcla simultáneamente en un pocillo de una microplaca con la proteína o poliproteína diana y con el compuesto o compuestos de interés del método. El compuesto o compuestos de interés no están marcados. El trazador compite con el compuesto de interés por los mismos sitios de unión en cada molécula diana. A efectos de la presente invención, esta competencia de unión entre el compuesto de interés y el trazador constituye "un ensayo". Las constantes cinéticas k_{on} , k_{off} y la concentración del trazador de la presente invención se conocen antes de realizar cada ensayo. En una realización preferida, la concentración del trazador está en el intervalo de 1-500 nM.

20 En otra realización de la invención, las mezclas del método de la invención pueden realizarse mediante un brazo robótico sin la interferencia de ninguna persona.

25 En una realización del método de la invención, se realiza la medición de la intensidad de las señales de fluorescencia mediante un lector de microplacas desde 0 hasta 15 horas en tiempo real y el volumen máximo de cada muestra es de 15 μ l. En un aspecto de la divulgación, se realiza la medición de la intensidad de las señales de luminiscencia mediante un lector de microplacas desde 0 hasta 15 horas en tiempo real y el volumen máximo de cada muestra es de 15 μ l. A efectos de la presente invención, tiempo real se refiere a la medición de la intensidad en cada uno de los periodos de tiempo fijos hasta, por ejemplo, 10 horas. En una realización más preferida, el volumen total de cada muestra es de 5-10 μ l. En una realización de la invención, pueden usarse microplacas de 384 ó 1536 pocillos para realizar el método de la invención. En una realización más preferida, se usan placas de 384 pocillos. El lector de microplacas registra las señales de fluorescencia de cada pocillo según el software proporcionado por el fabricante del lector de microplacas, y genera archivos csv (valores separados por comas) con los datos de la adquisición de fluorescencia de intensidad. La medición de la señal de fluorescencia a las 0 horas significa que el lector de microplacas mide dicha señal inmediatamente después de añadir todos los componentes de la mezcla. En un aspecto de la divulgación, el lector de microplacas registra las señales de luminiscencia de cada pocillo según el

software proporcionado por el fabricante del lector de microplacas, y genera archivos csv (valores separados por comas) con los datos de la adquisición de luminiscencia de intensidad. La medición de la señal de luminiscencia a las 0 horas significa que el lector de microplacas mide dicha señal inmediatamente después de añadir todos los componentes de la mezcla.

5 El diseño de la microplaca para el método de la invención se selecciona en una aplicación de Visual Basic antes de la adquisición de datos de fluorescencia por el lector de microplacas. En un aspecto de la divulgación, el diseño de la microplaca se selecciona en una aplicación de Visual Basic antes de la adquisición de datos de luminiscencia por el lector de microplacas. El diseño de la microplaca define la posición específica de cada ensayo en la microplaca. La posición en la microplaca depende del tipo de ensayo cinético que se realizará dentro del método de la invención: obtención de perfiles cinéticos de unión u obtención de perfiles cinéticos de selectividad (figura 1). En una realización de la invención, el diseño de obtención de perfiles cinéticos de unión permite el análisis de un máximo de 46 análisis cinéticos de 46 compuestos diferentes frente a una única diana en una microplaca de 384 pocillos. En otra realización, el diseño de obtención de perfiles cinéticos de selectividad permite el análisis de un máximo de 32 análisis cinéticos de un único compuesto frente a 32 dianas diferentes en una microplaca de 384 pocillos.

Los datos de fluorescencia adquiridos por el lector de microplacas se gestionan mediante una aplicación de software, que importa los datos de fluorescencia de los archivos csv registrados por el lector de microplacas, a un archivo de salida de hoja de cálculo (figura 2). En un aspecto de la divulgación, los datos de luminiscencia adquiridos por el lector de microplacas se gestionan mediante una aplicación de software, que importa los datos de luminiscencia de los archivos csv registrados por el lector de microplacas, a un archivo de salida de hoja de cálculo (figura 2). Los datos obtenidos de los archivos csv antes de ejecutar esta aplicación de software muestran los valores de fluorescencia para cada pocillo de la placa, en los que las medidas de fluorescencia se adquieren cada tiempo fijo (por ejemplo, 6 minutos) durante un periodo de tiempo determinado (por ejemplo, 10 horas) en tiempo real. Los datos obtenidos de los archivos csv antes de ejecutar esta aplicación de software muestran los valores de luminiscencia para cada pocillo de la placa, en los que las medidas de luminiscencia se adquieren cada tiempo fijo (por ejemplo, 6 minutos) durante un periodo de tiempo determinado (por ejemplo, 10 horas) en tiempo real. Preferiblemente, se miden las intensidades de emisión para todos los pocillos de una microplaca de 384 pocillos en el plazo de cinco minutos de cada el tiempo específico, más preferiblemente de manera simultánea. En una realización preferida, hay dos datos de fluorescencia de cada pocillo en cada tiempo: la fluorescencia emitida a dos longitudes de onda diferentes que pertenecen a la molécula donadora (el lantánido o el anticuerpo conjugado con el lantánido, que se une a la diana del ensayo) y la fluorescencia emitida por la molécula aceptora (ligando marcado). En un aspecto de la divulgación, hay un dato de luminiscencia y un dato de fluorescencia de cada pocillo en cada tiempo: la luminiscencia emitida a una longitud de onda por la molécula donadora (la luciferasa o el anticuerpo conjugado con la luciferasa, que se une a la diana del ensayo) y la fluorescencia emitida a otra longitud de onda por la molécula aceptora (ligando marcado). El archivo csv obtenido después de la adquisición de datos por el lector de microplacas, es el "archivo de entrada" para la aplicación de software. En una realización más preferida, los datos presentados en el archivo de entrada son: "Número de placa" (el número de la microplaca en el método), "Repetición de placa" (la lectura de cada pocillo en un tiempo), "Pocillo" (posición de la muestra en el pocillo de la microplaca), "Tiempo de medición" (tiempo en el que se adquiere una medición, desde 0 minutos hasta 10 horas), "Señal" (valor de fluorescencia), "Destellos/tiempo" (número de lecturas de un valor de fluorescencia medido en un pocillo). En un aspecto de la divulgación, los datos presentados en el archivo de entrada son: "Señal" (valor de luminiscencia), "Destellos/tiempo" (número de lecturas de un valor de luminiscencia medido en un pocillo). En una realización preferida, las lecturas del valor de fluorescencia de cada pocillo de la microplaca por el lector de microplaca son desde 30 hasta 300 veces en tiempo real, más preferiblemente desde 100 hasta 300 veces en tiempo real. En un aspecto de la divulgación, las lecturas del valor de luminiscencia de cada pocillo de la microplaca por el lector de microplacas son desde 30 hasta 300 veces en tiempo real, más preferiblemente de 100 a 300 veces en tiempo real. En una realización incluso más preferida, se obtienen hasta 240.000 datos por placa en menos de 2 minutos en una microplaca de 384 pocillos.

50 Cuando se ejecuta la aplicación de software, se calcula la razón de emisión (ER) de cada pocillo a partir del archivo de entrada, una ER para cada ensayo en cada tiempo para cada concentración de compuesto. La ER se calcula a partir de la razón de los datos de fluorescencia adquiridos del donador y el aceptor y puede multiplicarse por 10.000. En un aspecto de la divulgación, se calcula la ER a partir de la razón de los datos de luminiscencia adquiridos del donador y el aceptor y puede multiplicarse por 10.000. En la invención, los datos de unión específica, o la razón de emisión corregida (ER*) se obtiene para una concentración dada del compuesto de interés en un tiempo dado, restando la ER del control negativo en dicho tiempo dado, definido como los pocillos que contienen un inhibidor conocido (primera molécula) a una concentración de saturación de la ER de dicho compuesto de interés a dicha concentración dada y dicho tiempo dado. El control negativo permite tener en cuenta la unión inespecífica:

$$ER^* = afEI_b/dfEI_b - afEI_a/dfEI_a$$

Interpretación de los parámetros:

65 $afEI_b$ se refiere a la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo aceptor de la muestra que contiene el compuesto de

interés a dicha concentración dada y en dicho tiempo dado.

dfEl_b se refiere a la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo donador de la muestra que contiene el compuesto de interés a dicha concentración dada y en dicho tiempo dado.

5 En un aspecto de la divulgación, dfEl_b se refiere a la intensidad de la fluorescencia del luminóforo donador de la muestra que contiene el compuesto de interés a dicha concentración dada y en dicho tiempo dado.

10 afEl_a se refiere a la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo aceptor de la muestra que contiene el control negativo en dicho tiempo dado.

dfEl_a se refiere a la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo donador de la muestra que contiene el control negativo en dicho tiempo dado.

15 En un aspecto de la divulgación, dfEl_a se refiere a la intensidad de la fluorescencia del luminóforo donador de la muestra que contiene el control negativo en dicho tiempo dado.

20 Preferiblemente, el software se usa para generar un archivo de salida (una hoja de cálculo) con cada valor de ER* de los datos de entrada ajustados (de ajuste) al diseño predefinido, en una tabla XY para cada ensayo en la microplaca, en el que los valores de X se refieren a la concentración de compuesto o ligando no marcado en el ensayo y los valores de Y se refieren a las medidas de tiempo. En una realización de la invención, se generan un máximo de 46 tablas XY en un ensayo de obtención de perfiles cinéticos de unión cuando se usa una microplaca de 384 pocillos. En otra realización, se genera un máximo de 32 tablas XY en un ensayo de obtención de perfiles cinéticos de selectividad cuando se usa una microplaca de 384 pocillos.

25 Otro aspecto dado a conocer en la presente invención se refiere al método de determinación de fluorescencia. El método de determinación en la invención puede realizarse mediante polarización de fluorescencia (FP) o transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET). En una realización preferida, la determinación de fluorescencia se realiza mediante TR-FRET. Un aspecto de la divulgación se refiere al método de determinación de luminiscencia realizado mediante transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET).

30 En una realización preferida de la presente invención, se evalúan criterios de aceptación de control de calidad de los resultados mediante parámetros estadísticos. Los controles negativos y positivos de la microplaca se usan para calcular los parámetros estadísticos S/B y los factores Z' que indican la robustez y la sensibilidad del ensayo realizado con el método de la invención. Los criterios de aceptación para estos factores son S/B >2 y Z' >0,4, aunque estos factores pueden cambiar dependiendo de la diana. La adquisición de datos en la presente invención se realiza en tiempo real y, por consiguiente, esos parámetros estadísticos deben analizarse en modo de tiempo real. Es obligatorio en la invención que el factor Z' y la ventana del ensayo se ajusten a los límites de aceptación establecidos durante todo el tiempo del ensayo, que en algunos casos puede extenderse hasta 15 horas.

35 En una realización preferida de la presente invención, los parámetros cinéticos de cada compuesto de interés en el método de la invención se determinan ajustando los datos obtenidos de la aplicación de software a un modelo cinético de unión competitiva. El ajuste es un ajuste matemático o estadístico. Otro aspecto dado a conocer en la presente invención se refiere a que el método de la invención no predetermina el valor de K_i de la proteína o poliproteína diana antes de comenzar el método de la invención. En una realización preferida, se calculan los parámetros cinéticos de cada compuesto (K_{on}, K_{off}, K_d y t_{1/2}) mediante una aplicación de software conocida por un experto en la técnica. El modelo cinético de unión competitiva describe el comportamiento cinético de dos compuestos cuando compiten por la unión a la misma diana. Existe un ligando conocido (previamente caracterizado cinéticamente, por ejemplo, el trazador) que compite, en un experimento en tiempo real, con el compuesto en cada ensayo. Los datos del ligando marcado se ajustan a las ecuaciones descritas a continuación (asociación en una única fase y unión específica a un sitio). Como la velocidad de asociación de un ligando a su molécula diana depende de la concentración de ligando, se usaron varias concentraciones. Se analizan las curvas de progreso y se obtienen las constantes de velocidad aparentes (k_{obs}) correspondientes. Entonces, se representan gráficamente los valores de k_{obs} frente a la concentración de ligando y se obtienen los parámetros cinéticos del ligando de marcador mediante análisis de regresión lineal. La extrapolación de la representación gráfica a la ordenada en el origen (en X = 0) corresponde a la velocidad de disociación (K₂ o K_{off}) y la pendiente es igual a la velocidad de asociación (K₁ o K_{on}). Según la ley de acción de masas, la razón de K_{off} con respecto a K_{on} es la K_d de unión al receptor.

60 Asociación en una única fase

$$Y = Y_0 + (\text{meseta} - Y_0) * (1 - \exp(-K_{\text{obs}} * x))$$

Interpretación de los parámetros:

65 Y₀ es el valor de Y cuando X (tiempo) es cero. Se expresa en las mismas unidades que Y,

meseta es el valor de Y a tiempos infinitos, expresado en las mismas unidades que Y.

K_{obs} es la constante de velocidad aparente, expresada en la inversa de las unidades de tiempo del eje X. Si X está en minutos, entonces K_{obs} se expresa en la inversa de minutos.

- 5 La concentración de ligando marcado y los valores de K_{on} (K_1) y K_{off} (K_2) del ligando marcado deben introducirse como "restricciones" cuando se analizan compuestos desconocidos.

Unión específica a un sitio

- 10 La unión a un sitio describe la unión en equilibrio de un ligando a una diana en función de la concentración creciente de ligando.

$$Y = B_{max} * X / (K_d + X)$$

- 15 Interpretación de los parámetros:

Y es la unión específica.

X es la concentración del ligando.

- 20 B_{max} es el número máximo de sitios de unión, expresado en las mismas unidades que el eje Y. Es la unión específica extrapolada a concentraciones muy altas de ligando.

K_d es la constante de disociación en equilibrio, expresada en las mismas unidades que el eje X (concentración). Cuando la concentración de ligando es igual a K_d , la mitad de los sitios de unión están ocupados en equilibrio.

- 25 En una realización de la invención, cuando el método consiste en una obtención de perfiles cinéticos de unión, los datos se ajustan a la ecuación que se describe a continuación y las constantes de velocidad de disociación y asociación de un compuesto no marcado (los compuestos/ligandos/nuevas moléculas del ensayo) pueden determinarse:

Cinética de unión competitiva

30
$$K_A = K_1 \times L \times 10^{-9} + K_2$$

$$K_B = K_3 \times I \times 10^{-9} + K_4$$

35
$$S = \text{SQRT} [(K_A - K_B)^2 + 4 \times K_1 \times K_3 \times L \times I \times 10^{-18}]$$

$$K_F = 0,5 \times (K_A + K_B + S)$$

$$K_S = 0,5 \times (K_A + K_B - S)$$

40
$$\text{DIFF} = K_F - K_S$$

$$Q = B_{max} \times K_1 \times L \times 10^{-9} / \text{DIFF}$$

45
$$Y = Q \times (K_4 \times \text{DIFF} / (K_F \times K_S) + [(K_4 - K_F) / K_F] \times \exp(-K_F \times X) - [(K_4 - K_S) / K_S] \times \exp(-K_S \times X))$$

$$T = 1/K_4$$

$$t_{1/2} = \ln(2) / K_4$$

50
$$K_d = K_4 / K_3$$

Interpretación de los parámetros:

- 55 K_A , K_b , S, K_F , K_S , DIFF, Q e Y son grupos matemáticos para simplificar las ecuaciones. Las restricciones K_1 y K_2 son valores constantes del trazador, ya conocidos antes de realizar el método de la invención. Estos valores se obtuvieron tal como se describió anteriormente, ajustando los datos a la ecuación de cinética de asociación.

K_1 es la constante de velocidad de asociación (K_{on}) del ligando marcado (trazador) en $M^{-1} \text{ min}^{-1}$.

- 60 K_2 es su constante de velocidad de disociación (K_{off}) del ligando marcado (trazador) en min^{-1} .

L es un valor constante, igual a la concentración de ligando marcado (trazador) en nM.

I es una constante de columna cuyo valor proviene de los títulos de columna.

5 K_3 es la constante de velocidad de asociación (K_{on}) de ligando no marcado (compuesto de interés) en $M^{-1} \text{ min}^{-1}$.

K_4 es la constante de velocidad de disociación (K_{off}) de ligando no marcado (compuesto de interés) en min^{-1} .

10 B_{max} es la unión máxima en equilibrio con una concentración muy alta de ligando marcado expresada en las unidades del eje Y, preferiblemente en Mol. Habitualmente, es mucho mayor que cualquier unión observada en el experimento.

SQRT es la abreviatura matemática para raíz cuadrada.

15 X es el tiempo, expresado en min.

En una realización del método de la invención, se incluyen varias concentraciones de nuevas moléculas/compuestos/ligandos desconocidos (sin marcar) para determinar con precisión los parámetros cinéticos de la interacción con la diana. Además, es obligatorio ajustar algunas restricciones en el modelo para obtener datos precisos. Por tanto, las constantes de velocidad de la primera molécula o ligando marcado (trazador) deben restringirse a valores constantes determinados a partir de experimentos previos. El método permite la implementación continua con nuevas dianas. Para cada diana particular, debe optimizarse y validarse un ensayo de unión específica. En una realización de la invención, se realizan experimentos de titulación con concentraciones diferentes de ligando marcado (trazador) y se monitorizan las señales de fluorescencia en un modo de tiempo real (obteniéndose "continuamente" datos para todas las muestras a intervalos discretos a lo largo del tiempo). En un aspecto de la divulgación, se realizan experimentos de titulación con concentraciones diferentes de ligando marcado (trazador) y se monitorizan las señales de luminiscencia en un modo de tiempo real (obteniéndose "continuamente" datos para todas las muestras a intervalos discretos a lo largo del tiempo). En una realización preferida, las señales de fluorescencia son de TR-FRET. En un aspecto de la divulgación, las señales de bioluminiscencia son de BRET. Los datos de TR-FRET se ajustan matemática o estadísticamente al "modelo de cinética de asociación" y se obtienen las K_{on} , K_{off} y K_d correspondientes del ligando marcado (trazador). Estos valores se incluyen en el modelo competitivo cinético como valores de restricción e influyen en los parámetros cinéticos de compuestos desconocidos, por lo que es muy importante determinar con precisión estos valores.

35 El método dado a conocer en la presente invención complementa los estudios clásicos de RCEA (relación cuantitativa de estructura-actividad), usados habitualmente durante el proceso de optimización de moléculas principales, con datos de información cinética relevantes para discriminar compuestos con las mismas afinidades. Como resultado de la racionalización de la química médica, se ha establecido que muchos compuestos muestran valores de potencia extremadamente altos (rango picomolar) y, por tanto, es necesario un ensayo altamente sensible para no subestimar su potencia. Además, es necesario discriminar entre dichos compuestos aquellos con un perfil cinético diferente, es decir aquellos que se asocian y/o se disocian de la diana de una manera diferente. Este aspecto es de crucial interés para seleccionar aquellos compuestos con el perfil clínico que es importante para los pacientes: eficacia, seguridad, duración de acción, mayor tolerabilidad, indicación y diferenciación terapéutica.

45 Finalmente, la presente invención combina la alta sensibilidad y el rendimiento de los métodos fluorescentes con las ventajas del enfoque cinético de unión competitiva. Como consecuencia, este método minimiza los impactos ambientales adversos evitando la radiactividad y maximiza los beneficios económicos, reduciendo los tiempos y los volúmenes necesarios para realizar la caracterización del perfil cinético de las nuevas moléculas.

50 Ejemplos

EJEMPLO 1: Caracterización cinética de un trazador seleccionado para una quinasa.

55 El presente ejemplo ilustra la caracterización cinética de un trazador seleccionado para una quinasa particular/representativa. La quinasa del ejemplo es la fosfoinosítido 3-quinasa delta, que pertenece a la familia de las lípido quinazas (PI3quinasa-delta, $PI3K_{\text{delta}}$). El ligando marcado (trazador) seleccionado es una molécula pequeña conjugada con el colorante fluorescente Alexa™ Fluor 647 (Tracer³¹⁴, Life Technologies). Esta molécula es un análogo competitivo de ATP que se une a $PI3K_{\text{delta}}$ y está dirigido por un anticuerpo marcado con europio, también unido a la quinasa del presente ensayo. Cuando tanto el trazador como el anticuerpo se unen a la diana de interés (por ejemplo, $PI3K_{\text{delta}}$), hay una alta señal de TR-FRET, mientras que el desplazamiento del trazador por un inhibidor de quinasa da como resultado una pérdida de TR-FRET.

65 El presente ejemplo muestra un experimento de titulación con concentraciones diferentes de Tracer³¹⁴. Se preparó una disolución que contiene la enzima $PI3K_{\text{delta}}$ (GST-p110 delta/p85 alfa, Carna Biosciences) y el anticuerpo marcado con europio LanthaScreen™ anticuerpo de cabra anti-GST marcado con europio (Eu-anti GST, Life Technologies), a una concentración doble de la deseada usada en el ensayo (0,5 nM y 2 nM, respectivamente). Se

preparó esta disolución en tampón de quinasa A (HEPES 50 mM pH 7,5, EGTA 1 mM, Brij-35 al 0,01%, MgCl₂ 10 mM, de Life Technologies) que contiene DMSO al 1%. Además, se preparó otra disolución que contenía una concentración de saturación de un inhibidor específico de PI3K_{delta} (PI-103 a 10 micromolar) en lugar de DMSO para tener en cuenta la unión inespecífica (muestra de control bajo o control negativo).

Luego, se prepararon diluciones en serie de factor dos del trazador, que oscilaban entre 20 y 0 nanomolar. Se dispensaron cinco microlitros de cada disolución en placas de 384 pocillos, en las que se añadió la última disolución que contenía PI3K_{delta}, una vez que se habían dispensado las disoluciones que contenían respectivamente el ligando marcado (trazador) y el inhibidor de PI3K_{delta} a concentraciones de saturación en el pocillo. Inmediatamente, se recogieron las señales de TR-FRET a lo largo del tiempo en un lector de microplacas (volumen final de 10 μ l). Se llevaron a cabo mediciones a temperatura ambiente y se repitieron a intervalos de 6 segundos durante 10 minutos (habitualmente, esta etapa podría extenderse hasta que la unión alcance el equilibrio o la señal se estabilice).

Entonces se usa la aplicación Enzymlogig Kinetic management data E.0 tal como se explica en la descripción detallada de la presente invención para generar una tabla XY que representa gráficamente la razón de emisión corregida (ER*) según las concentraciones diferentes de trazador (eje X) y el tiempo (eje Y) (figura 3). Estos datos se ajustan a la ecuación de asociación en una única fase mediante el uso del software GraphPad Prism™ tal como se describió anteriormente y se obtienen las K_{on}, K_{off} y K_d correspondientes del ligando marcado (Tracer³¹⁴) a PI3K_{delta}. La figura 3 incluye una representación gráfica que resume la razón de emisión corregida a lo largo del tiempo a cada concentración de Tracer³²⁴ (de 20 a 0 nM). Además, también se incluye una tabla con los parámetros cinéticos obtenidos que resumen los datos cinéticos de la interacción Tracer³¹⁴-PI3K_{delta}.

EJEMPLO 2: Caracterización cinética de dos inhibidores diferentes frente a la misma diana usando el método en el modo de obtención de perfiles cinéticos de unión.

El presente ejemplo ilustra la caracterización cinética de dos inhibidores diferentes frente a la misma diana usando el método de la invención en el modo de obtención de perfiles cinéticos de unión. La quinasa PI3K_{delta} se ha seleccionado para ilustrar este ejemplo. El Tracer³¹⁴ (Life Technologies) caracterizado se ha usado como ligando marcado (trazador).

Los compuestos de referencia elegidos para el presente ejemplo son wortmanina y BEZ-235, que son conocidos por inhibir la diana seleccionada. Se ha descrito previamente por muchos autores la afinidad de estos dos compuestos de referencia en equilibrio, con valores de K_d en el rango nanomolar. Sin embargo, hasta la fecha no se ha informado sobre ningún parámetro cinético para estas interacciones. Para determinar el perfil cinético de estos inhibidores (K_{on}, K_{off}, K_d y t_{1/2}), los datos experimentales se ajustaron a la "cinética de unión competitiva". Este modelo describe el comportamiento cinético de dos compuestos cuando compiten por la unión a la misma diana. Hay un ligando conocido (Tracer³¹⁴ en este ejemplo) que compete, en un experimento en tiempo real, con los compuestos desconocidos cuyos perfiles cinéticos se desea conocer (wortmanina y BEZ235).

Se realiza el experimento tal como se describe en el ejemplo 1 para la caracterización del trazador. Se preparan las muestras en el tampón de quinasa A a las mismas concentraciones descritas en el ejemplo 1 (PI3K_{delta} a 0,5 nM y Eu-anticuerpo anti-GST a 2 nM). También se incluyen pocillos de control en la microplaca con inhibidor de PI-103 a 10 μ M para tener en cuenta la unión inespecífica. Para la caracterización cinética de los compuestos desconocidos, se añade Tracer³¹⁴ a todos los pocillos a una concentración constante (alrededor de su K_d, en el presente ejemplo, 5 nM) y se incluyen ocho concentraciones diferentes de cada compuesto desconocido (wortmanina y BEZ235) en los pocillos de la microplaca. Las ocho concentraciones diferentes son el resultado de diluciones en serie de factor cuatro de los compuestos desconocidos, que oscilan entre 250 nM y 0. Se prepararon estas diluciones en serie en una placa madre (al doble de la concentración del ensayo) y se dispensaron rápidamente a la placa de análisis, siendo la última en dispensarse al pocillo la quinasa PI3K_{delta}. Se registraron las señales de TR-FRET correspondientes a la unión competitiva entre Tracer³¹⁴ y los compuestos de prueba a lo largo del tiempo tal como se describió anteriormente. El presente ejemplo se ilustra en la figura 4.

Luego, se transformaron los datos usando la aplicación de software Kinetic Management data E.0 y finalmente se ajustaron al modelo competitivo cinético, usando el software GraphPad Prism™. Se ajustaron los datos a la ecuación descrita en la presente solicitud de patente, que restringe las constantes de velocidad K₁ (K_{on}) y K₂ (K_{off}) del ligando marcado (Tracer³¹⁴) a valores constantes determinados a partir del experimento anterior. Es importante que estos análisis se realicen correctamente, puesto que los parámetros cinéticos del ligando marcado se incluyen como restricciones para análisis adicionales en muestras desconocidas dentro del método.

En el presente ejemplo, K₁ es la constante de velocidad de asociación de Tracer³¹⁴ en M⁻¹min⁻¹ (4,49E+08) y K₂ es su constante de velocidad de disociación en unidades de min⁻¹ (3,217). La concentración de trazador (L) también se restringe a la concentración de trazador empleada en el ensayo, es decir, 5 nM en el presente ejemplo. Además, I se restringe a ser una constante de columna cuyo valor proviene de los títulos de columna. Hay tantos valores de I como concentraciones diferentes usadas en el experimento, expresadas en nM. En este ejemplo, 8 valores (es decir, 8 columnas para cada compuesto) oscilan entre 250 nM y 0. Luego, después de ajustar los datos al modelo cinético,

se determinaron las constantes de velocidad de disociación y asociación de los dos compuestos de referencia (K_3 y K_4 , respectivamente). Además, los valores de K_d para cada inhibidor de referencia pueden derivarse del análisis cinético como la razón de K_4 con respecto a K_3 . El término $t_{1/2}$ se calcula como $-\ln[0,5]$ dividido entre el valor de K_4 . La tabla incluida en la figura 4 resume los parámetros cinéticos obtenidos para ambos inhibidores de PI3K $_{\text{delta}}$.

Tal como puede mostrarse en la tabla, wortmanina y BEZ235 exhiben un perfil cinético muy diferente cuando se unen a PI3K $_{\text{delta}}$. BEZ235 se disocia muy rápido de la diana (milisegundos), mientras que la semivida de disociación estimada para el complejo wortmanina-PI3K $_{\text{delta}}$ está cerca de 300 min. Además, sus valores de afinidad también son muy diferentes, desde alrededor de 10 nanomolar en el caso de BEZ235, hasta alrededor de 300 picomolar para wortmanina.

El ejemplo descrito anteriormente ilustra cómo pueden analizarse compuestos muy diferentes de la misma manera, usando las mismas concentraciones de diana y de compuesto y sin la necesidad de determinar previamente sus valores de K_d en experimentos clásicos de dosis-respuesta. Como consecuencia, el método de la invención puede usarse fácilmente en formato de alto rendimiento (HTS) para caracterizar cinéticamente una amplia gama de moléculas.

EJEMPLO 3: Caracterización cinética de dos inhibidores diferentes frente a tres quinasas dependientes de ciclina relacionadas usando el método en el modo de obtención de perfiles cinéticos de selectividad.

El ejemplo 3 ilustra cómo funciona el método de la invención en el modo de obtención de perfiles cinéticos de selectividad. Este ejemplo incluye dos compuestos de referencia, sorafenib y estaurosporina, frente a 3 quinasas dependientes de ciclina relacionadas (CDK7/ciclina H MNAT1, CDK8/ciclina C y CDK9/ciclina T1). En todos los experimentos se usó la misma molécula marcada (trazador, Tracer²³⁶, Life Technologies). Tal como se describió en los ejemplos anteriores, el trazador usado en el ensayo debe caracterizarse cinéticamente antes del experimento. Se calcularon la asociación (K_{on}), disociación (K_{off}) y K_d de Tracer²³⁶ frente a cada CDK seleccionada como diana. Se introdujeron estos valores como restricciones para el modelo competitivo cinético, tal como se explica en el ejemplo 2.

Se realizaron los experimentos de manera similar a la descrita para PI3K $_{\text{delta}}$ en los ejemplos 1 y 2. Las concentraciones de quinasas usadas en el presente ejemplo son: 2 nM para CDK8/ciclina C y CDK9/ciclina T1 y 5 nM para CDK7/ciclina H MNAT1. La concentración de Tracer²³⁶ es de 10 nM, 30 nM y 150 nM, respectivamente para cada diana. Se usó un Eu-anticuerpo anti-His a 2 nM en los tres casos. Tal como se describió previamente, se usaron ocho concentraciones de cada inhibidor de referencia (sorafenib y estaurosporina) en cada caso, oscilando entre 1000 nM y 0 nM, resultado de diluciones en serie de factor cuatro de los compuestos. Se registraron las señales de TR-FRET correspondientes a la unión competitiva entre Tracer²³⁶ y los compuestos de prueba para cada diana, a lo largo del tiempo tal como se describió anteriormente.

La figura 5 ilustra una representación gráfica representativa con las razones de emisión corregidas (ER^*) obtenidas de la interacción CDK8-sorafenib a lo largo del tiempo.

Se transforman los datos usando la aplicación de software Kinetic Management data E.0 y finalmente se ajustan al modelo competitivo cinético, usando el software GraphPad Prism™. También se ajustaron los datos a la ecuación descrita en la presente solicitud de patente, lo que restringe las constantes de velocidad K_1 (K_{on}) y K_2 (K_{off}) del ligando marcado (Tracer²³⁶) a valores constantes determinados a partir del experimento previo. Después de ajustar los datos al modelo cinético, se determinaron las constantes de velocidad de disociación y asociación de los dos compuestos de referencia para cada diana tal como se describe en el ejemplo 2.

Tal como puede mostrarse en la tabla incluida en la figura 5, ambos inhibidores muestran un perfil muy diferente dependiendo de la molécula diana. Por un lado, el sorafenib es un inhibidor específico de CDK8/ciclina C, mientras que la estaurosporina es un pan-inhibidor de las 3 CDK, que muestra valores de K_d similares para las 3 dianas (entre 3,2 a 8,5 nM). Curiosamente, el comportamiento cinético de la estaurosporina es muy diferente entre las tres CDK del ejemplo, y la interacción con CDK8 se extiende durante 20 minutos, mientras que la interacción con CDK7 sólo se mantiene menos de 1 minuto.

Este ejemplo ilustra cómo la cinética de unión proporciona información valiosa sobre el mecanismo de unión de una molécula frente a diferentes dianas que pueden influir en su posible perfil de eficacia y/o seguridad cuando se usa en ensayos clínicos.

EJEMPLO 4: Caracterización cinética de un ligando seleccionado de un GPCR marcado directamente con un fluoróforo.

El presente ejemplo ilustra la caracterización cinética de un ligando seleccionado de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) representativo. El GPCR del ejemplo es el receptor de opioides mu humano, que pertenece a la familia de receptores de opioides (hMOR). El ligando marcado (trazador) es un derivado de naltrexona marcado con una sonda fluorescente de HTRF que emite en el rojo (L0005RED, Cisbio). Esta molécula es un antagonista de

opioides que se une a hMOR. Las células de riñón embrionario humano (HEK) expresan el receptor de opioides marcado directamente con criptato de terbio. Cuando el marcador se une directamente al receptor, hay una alta señal de TR-FRET, mientras que el desplazamiento del trazador por un agonista o antagonista de GPCR da como resultado una pérdida de TR-FRET.

5 El presente ejemplo muestra un experimento de titulación con diferentes concentraciones del antagonista de opioides, que oscilan entre 32 nM y 0 nM (diluciones en serie de factor dos). Se preparó una disolución que contenía las células HEK que expresaban hMOR al triple de la concentración deseada usada en el ensayo. Además, se preparó otra disolución que contenía una concentración de saturación de un antagonista específico de hMOR (naloxona 50 micromolar, Sigma) en lugar de DMSO para tener en cuenta la unión inespecífica (muestra de control baja o control negativo). Todas las disoluciones se prepararon en tampón TAGlite (LABMED, CisBio). Se realizó el experimento de manera similar a los ejemplos 1 a 3, en el que hMOR (diana) fue el último en disponerse en los pocillos.

15 Para la determinación de las constantes cinéticas de unión para el antagonista de opioides, se midió la dependencia de la razón de emisión corregida (ER^*) en función de la concentración de ligando a lo largo del tiempo en pocillos duplicados. Entonces se usó la aplicación Enzymologic Kinetic management data E.0 tal como se explica en la descripción detallada de la presente invención para generar una tabla XY que representa gráficamente la razón de emisión corregida (ER^*) según las diferentes concentraciones de trazador (eje X) y el tiempo (eje Y) (figura 6). Estos datos se ajustaron a la ecuación de asociación en una única fase mediante el uso del software GraphPad Prism™ tal como se describió previamente y se obtuvieron las k_{on} , k_{off} y K_d correspondientes del ligando marcado (antagonista de opioides L0005RED) a hMOR. La figura 6 incluye una representación gráfica que resume la razón de emisión corregida a lo largo del tiempo a cada concentración de antagonista de opioides. Además, también se incluye una tabla con los parámetros cinéticos obtenidos que resumen los datos cinéticos de la interacción antagonista de opioides-hMOR.

EJEMPLO 5: Control de calidad del ensayo.

30 Para establecer el control de calidad del método de la invención, se realiza un análisis estadístico automáticamente en cada microplaca. Este análisis muestra si los resultados obtenidos superan o no los criterios de aceptación de control de calidad establecidos del ensayo.

35 Se usan los controles negativos y positivos en los experimentos para calcular los parámetros estadísticos S/B y los factores Z' , lo que indica si un ensayo es robusto y sensible. Aunque estos factores pueden cambiar dependiendo de la diana, en términos generales, los criterios de aceptación para estos factores son $S/B > 2$ y $Z' > 0,4$.

40 La figura 7 ilustra el análisis estadístico de S/B y Z' a lo largo del tiempo de un experimento seleccionado realizado con CDK8/ciclina C durante 10 horas. Se calculan los valores en modo continuo, aunque se representan gráficamente a intervalos de 60 minutos. Se realizó el experimento en las mismas condiciones experimentales descritas en el ejemplo 3 de esta invención (CDK8/ciclina C 2 nM, Eu-anticuerpos anti-His 2 nM y Tracer²³⁶ 10 nM).

Tal como puede observarse en la figura, ambos parámetros, razón S/B y Z' , están muy por encima de los criterios de aceptación durante todo el tiempo del experimento.

45 **Bibliografía**

1. Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. Nat Rev Discov. 2006 5 (9): 730-9. Errata en Nat Rev Drug Discov 2007 6(3): 249.
- 50 2. Swinney DC. The role of binding kinetics in therapeutically useful drug action. Curr Opin Drug Discov Devel. 2009 12(1): 31-39.
3. Zhang R, Monsma F. Binding kinetics and mechanism of action: toward the discovery and development of better and best in class drugs. Expert Opin Drug Discov. 2010 5(11): 1023-9.
- 55 4. Motulski HJ, Mahan LC. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. Mol Pharmacol. 1984 25(1): 1-9. Errata en Mol Pharmacol. 2014 86(5): 592.
5. Elg M, Gustafsson D, Deinum J. The importance of enzyme inhibition kinetics for the effect of thrombin inhibitors in a rat model of arterial thrombosis. Thromb Haemost. 1997 78(4): 1286-92.
- 60 6. Tresadern G, Bartolome JM, Macdonald GJ, Langlois X. Molecular properties affecting fast dissociation from the D2 receptor. Bioorg Med Chem. 2011 19(7): 2231-41.
7. Dahl G, Akerud T. Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. Drug Discov Today 2013 18(15-16): 697-707.

8. Lieberg B, Nylander C, Lundström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators* 4, 299-304 (1983).

5 9. Langlois X, Megens A, Lavresen H, Atack J, Cik M, te Riele P, Peeters L, Wouters R, Vermeire J, Hendrickx H, Macdonald G, De Bruyn M. Pharmacology of JNJ-37822681, a specific and fast-dissociating D2 antagonist for the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 342(1): 91-105.

REIVINDICACIONES

1. Método para calcular el perfil cinético de un compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana, que comprende las siguientes etapas:

- 5
- a. mezclar simultáneamente en un pocillo de una microplaca:
- (i) una primera molécula a una primera concentración de entre 1 y 500 nM,
- 10 (ii) dicha proteína o poliproteína diana a una segunda concentración de entre 0,5 - 50 nM, y
- (iii) una tercera molécula a una concentración de saturación para la proteína o poliproteína diana de (ii),
- 15 en el que dicha primera molécula tiene afinidad por dicha proteína o poliproteína diana y se marca con una primera molécula fluorescente, y dicha proteína o poliproteína diana se une a entre 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con una segunda molécula fluorescente, o dicha proteína diana o la poliproteína se marca con dicha segunda molécula fluorescente,
- 20 en el que dicha primera molécula fluorescente es un fluoróforo aceptor y dicha segunda molécula fluorescente es un fluoróforo donador, y
- en el que la tercera molécula es un inhibidor de la proteína o poliproteína diana que compite por los mismos sitios de unión de la diana con la primera molécula;
- 25 b. mezclar simultáneamente en cada uno de n pocillos diferentes de dicha microplaca:
- (i) dicha primera molécula a dicha primera concentración,
- (ii) dicha proteína o poliproteína diana a dicha segunda concentración, y
- 30 (iii) un compuesto de interés a una tercera concentración
- en el que dicha primera molécula tiene afinidad por dicha proteína o poliproteína diana y se marca con dicha primera molécula fluorescente y dicha proteína o poliproteína diana se une a 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con dicha segunda molécula fluorescente, o dicha proteína o poliproteína diana se marca con dicha segunda molécula fluorescente,
- 35 en el que la tercera concentración es diferente en cada uno de los n pocillos diferentes de dicha microplaca, en el que las etapas a) y b) se realizan simultáneamente;
- 40 c. medir la intensidad de emisión de las señales de fluorescencia emitidas por el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor en cada mezcla obtenida en las etapas a) y b) con un lector de microplacas en tiempos específicos desde 0 hasta 15 horas, en el que se miden dichas intensidades de emisión simultáneamente para todos los pocillos de dicha microplaca en cada tiempo específico o se miden dichas intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha microplaca en el plazo de cinco minutos de cada punto en el tiempo específico;
- 45 d. calcular la razón de emisión corregida (ER^*) para cada una de las n mezclas diferentes obtenidas en la etapa b) en cada tiempo específico, en el que la razón de emisión corregida para una mezcla dada obtenida en la etapa b) en un tiempo específico, se calcula restando la razón de emisión de la mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado (ER_a) a partir de la razón de emisión de dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado (ER_b),
- 50 en el que:
- 55 ER_a se calcula dividiendo la intensidad de emisión de fluoróforo aceptor en dicha mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado ($afEI_a$) entre la intensidad de emisión de fluoróforo donador en dicha mezcla obtenida en la etapa a) en dicho tiempo específico dado ($dfEI_a$) y
- 60 ER_b se calcula dividiendo la intensidad de emisión de fluoróforo aceptor en dicha mezcla obtenida en la etapa b) en dicho tiempo específico dado ($afEI_b$) entre la intensidad de emisión de fluoróforo donador en dicha mezcla obtenida en la etapa b) en tiempo específico dado ($dfEI_b$); y
- 65 e. calcular el perfil cinético de cada compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana a partir de las razones de emisión corregidas (ER^*) obtenidas en la etapa d) ajustando dichas razones de emisión corregidas (ER^*) a un modelo cinético de unión competitiva, en el que el perfil cinético de dicho compuesto

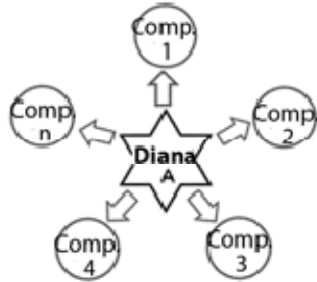
de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se define mediante: la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana,

- 5 con la condición de que no es necesario predeterminar el valor de la constante de inhibición (K_i) del compuesto de interés frente a la proteína o poliproteína diana.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína o poliproteína diana se une a entre 0,5 - 5 nM de un anticuerpo marcado con una segunda molécula fluorescente, y en el que se miden las intensidades de emisión para todos los pocillos de dicha microplaca en el plazo de cinco minutos de cada tiempo específico.
- 10 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el método para calcular el perfil cinético de cada compuesto de interés frente a una proteína o poliproteína diana se realiza en un sistema de alto rendimiento (HTS).
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína o poliproteína diana comprende al menos una enzima, receptor acoplado a proteínas G, canal iónico, receptor hormonal, proteína estructural y/o proteína transportadora de membrana.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fluoróforo donador comprende un lantánido seleccionado de europio (Eu), disprosio (Dy), samario (Sm) o terbio (Tb).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que n es al menos 3.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en el que n es un número entre 4 y 8.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la intensidad de emisión de la señal de fluorescencia medida en la etapa c) se realiza mediante polarización de fluorescencia (FP) o mediante transferencia de energía de resonancia de fluorescencia con resolución temporal (TR-FRET).
- 30 9. Método según la reivindicación 8, en el que se realiza la medición mediante TR-FRET.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el lector de microplacas:
- 35 a) mide la intensidad de emisión de cada señal de fluorescencia en dos longitudes de onda, y
- b) genera un archivo de valores separados por comas con todas las mediciones determinadas en la etapa a).
- 40 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cálculo del perfil cinético de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se realiza con una aplicación de software ajustada a un modelo de unión competitiva.
- 45 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los perfiles cinéticos de múltiples compuestos de interés frente a una única proteína o poliproteína diana se miden en una única microplaca.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que los perfiles cinéticos de un único compuesto de interés frente a múltiples proteínas o poliproteínas diana se miden en una única microplaca.
- 50 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que en cada una de las etapas a. y b. la proteína o poliproteína diana se añade a una composición que comprende las otras moléculas, o una composición que comprende las otras moléculas se añade a la proteína o poliproteína diana, antes de mezclar.
- 55 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la constante de afinidad (K_d), la constante de velocidad de asociación (K_{on}), la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y el tiempo de permanencia ($t_{1/2}$) de dicho compuesto de interés frente a dicha proteína o poliproteína diana se emiten simultáneamente.

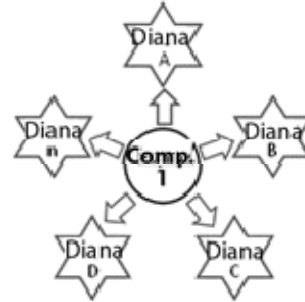
Iniciar plataforma

1. Seleccionar modo de análisis

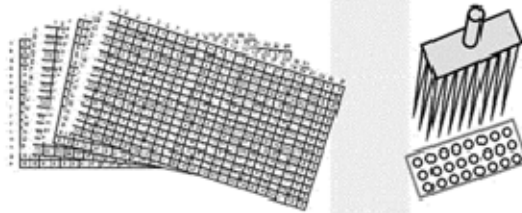
Obtención de perfiles cinéticos de unión



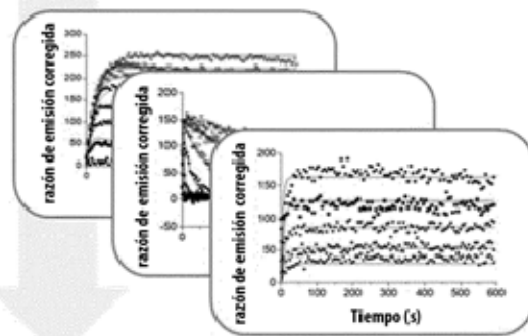
Obtención de perfiles cinéticos de selectividad



2. Realizar los experimentos



3. Recopilar y analizar datos



Obtención de perfiles cinéticos
FIGURA 1

Enzymologic kinetic data management E.0

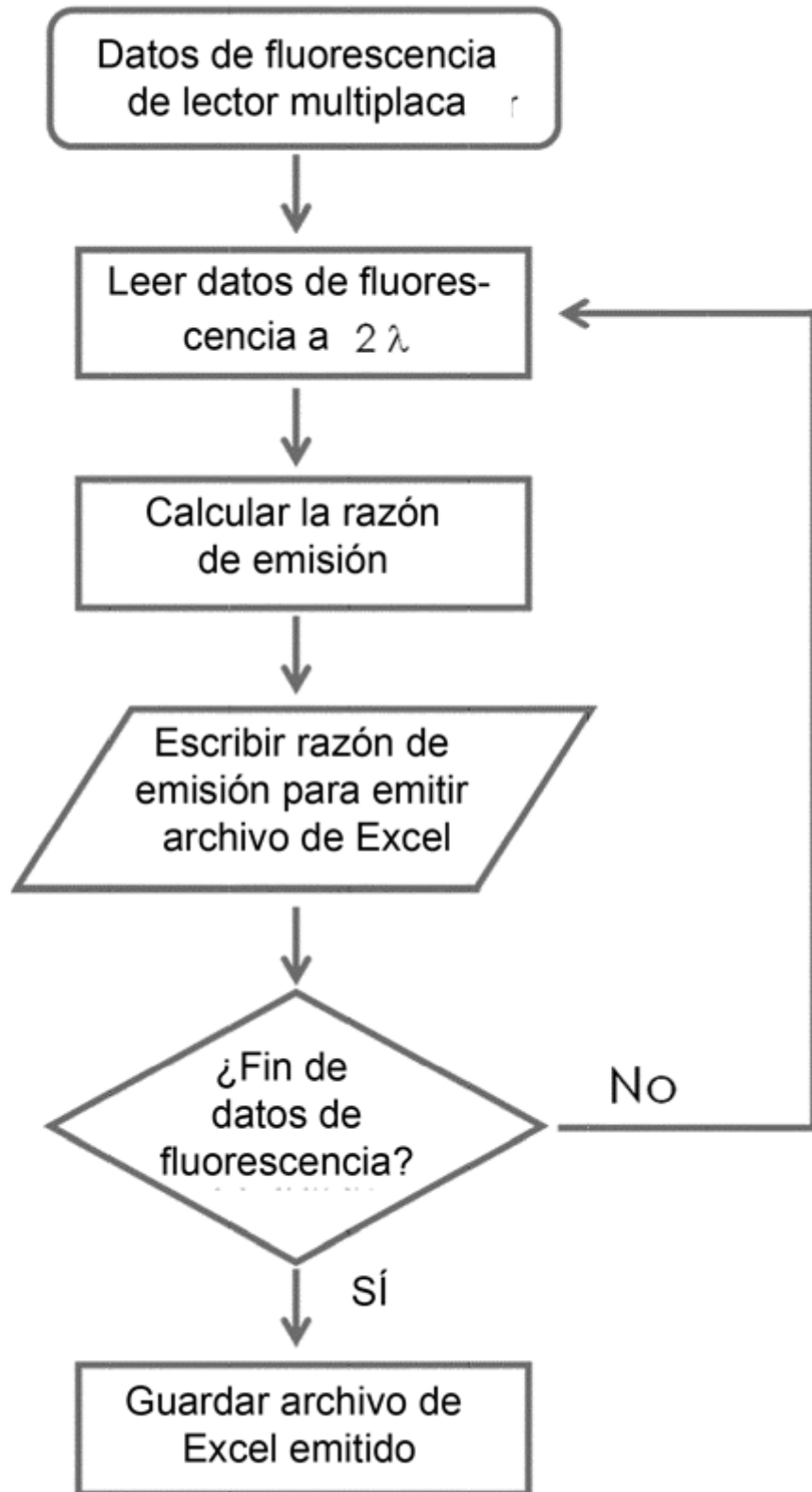


FIGURA 2

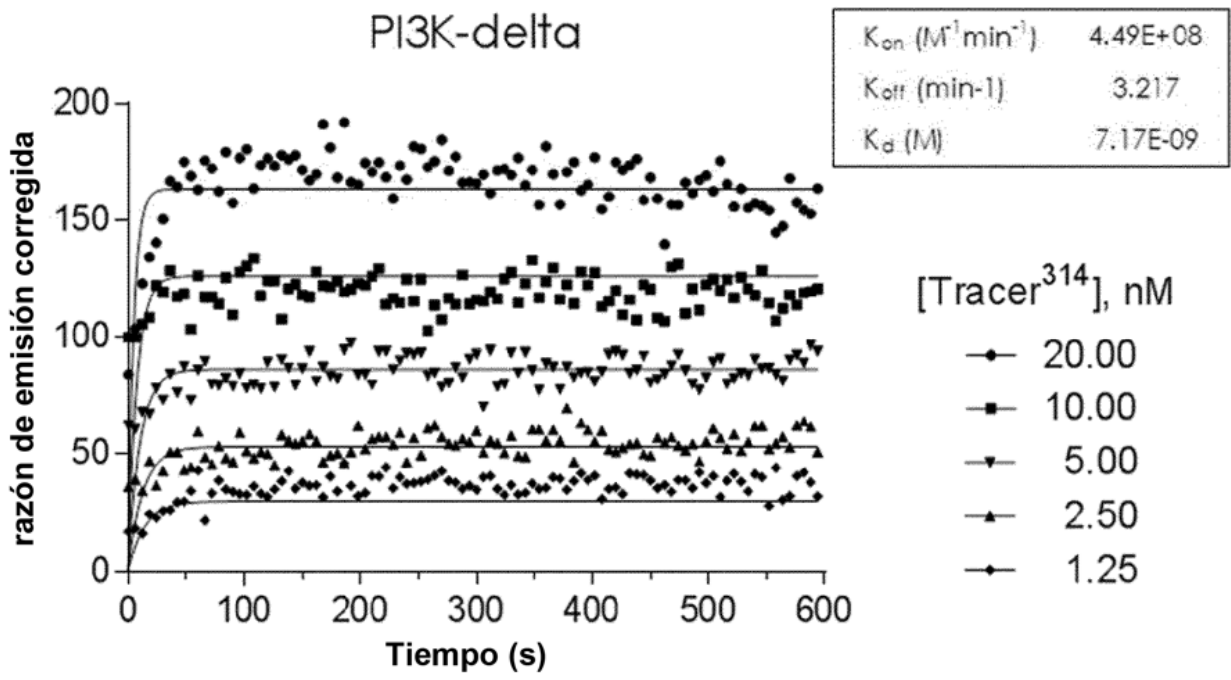
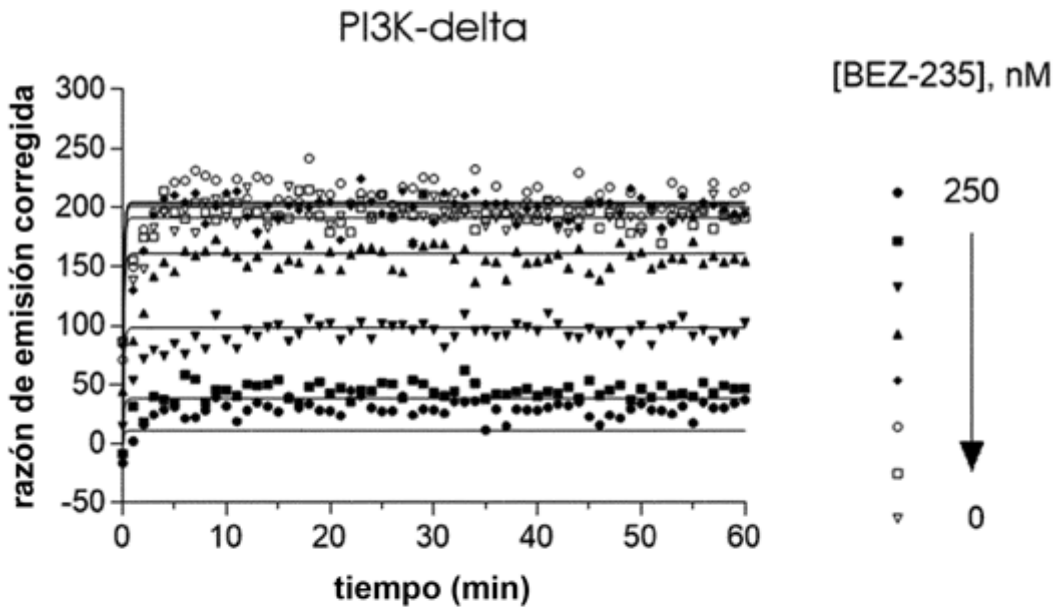
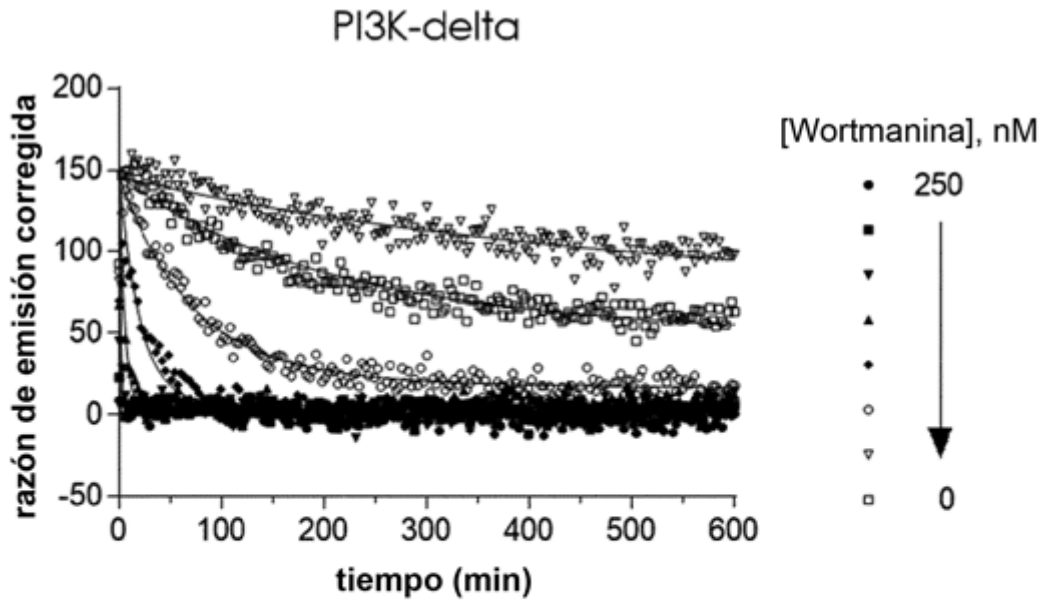
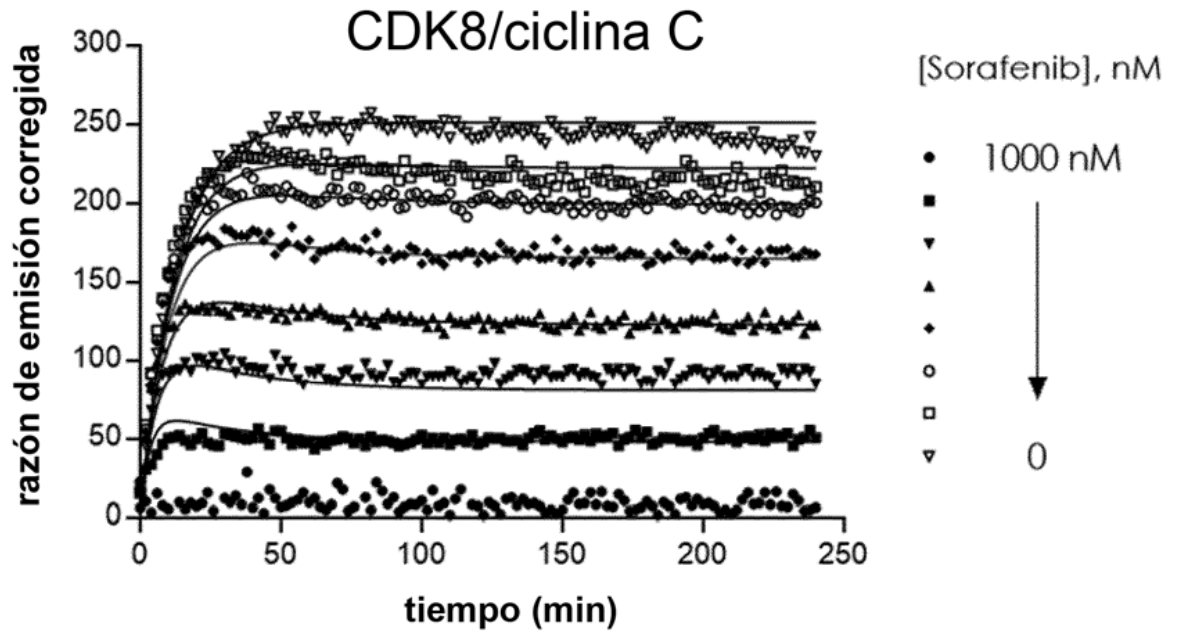


FIGURA 3



	Wortmanina	BEZ-235
K_3 (M^1s^{-1})	1.35E+06	1.42E+08
K_4 (s^{-1})	3.93E-05	1.50
k_d (M)	2.91E-11	1.06E-08
τ (min)	423.9	0.011
$T_{1/2}$ (min)	293.8	0.008

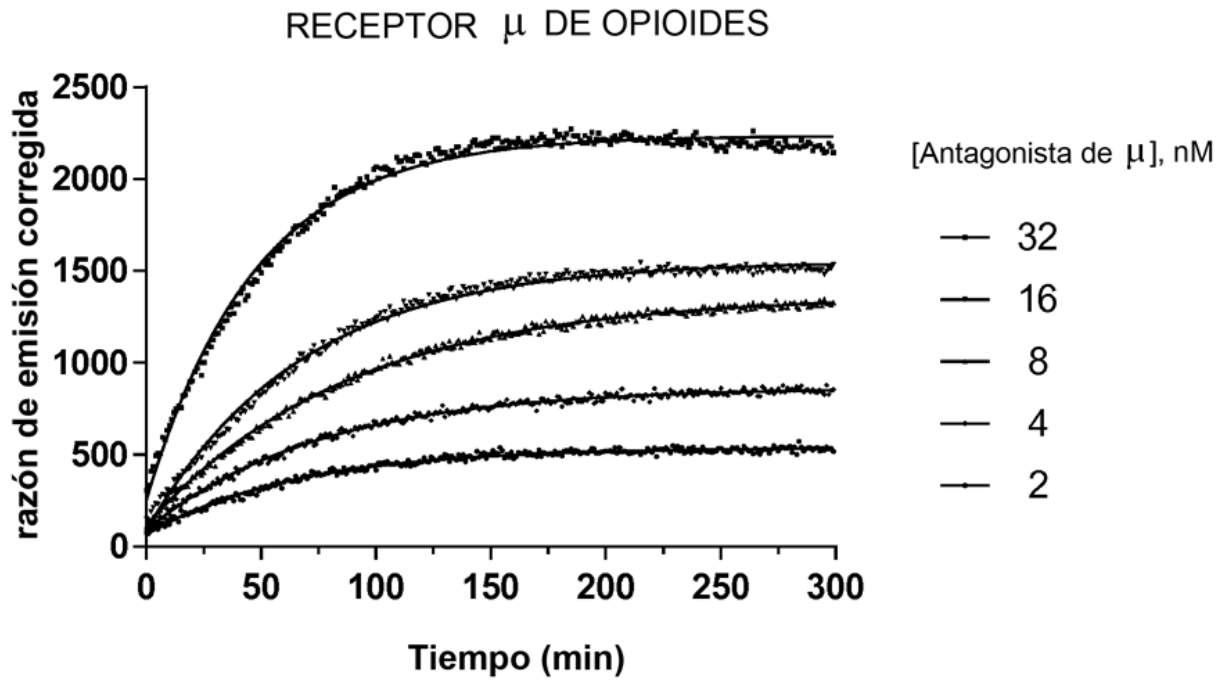
FIGURA 4



	CDK8/ciclina C		CDK9/ciclina T1		CDK7/ciclina H MNAT1	
	Sorafenib	Estaurosporina	Sorafenib	Estaurosporina	Sorafenib	Estaurosporina
$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	1.01E+04	1.75E+05	nd [#]	2.60E+06	nd	1.78E+06
$K_{off} (s^{-1})$	3.03E-04	5.95E-04	nd	8.33E-03	nd	1.52E-02
$K_d (M)$	3.00E-08	3.4E-09	nd	3.2E-09	nd	8.5E-09
$\tau (min)$	55.00	28.00	nd	2.00	nd	1.10
$T_{1/2} (min)$	38.12	19.40	nd	1.39	nd	0.76

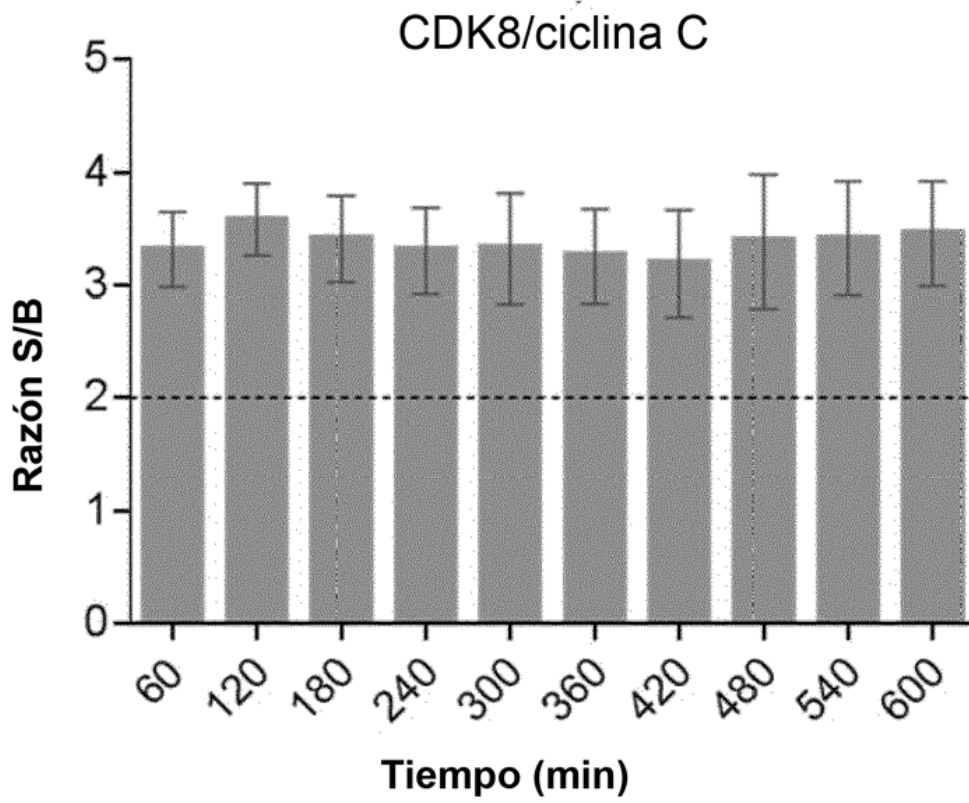
[#]nd: no determinado

FIGURA 5



K_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	2.80E+04
K_{off} (s^{-1})	1.90E-04
K_d (M)	6.79E-09

FIGURA 6



Tiempo (min)	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600
Z'	0.64	0.72	0.73	0.64	0.71	0.64	0.63	0.65	0.65	0.68

FIGURA 7

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Literatura no patente citada en la descripción

- EMAMI-NEMINIA et al. Time-resolved fluorescence ligand binding for G protein-coupled receptors. *Nat Protoc.*, 2013, vol. 8 (7), 1307-20 [0009]
- COPELAND RA ; POMPLIANO DL ; MEEK TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Discov.*, 2006, vol. 5 (9), 730-9 [0111]
- *Erratum in Nat Rev Drug Discov*, 2007, vol. 6 (3), 249 [0111]
- SWINNEY DC. The role of binding kinetics in therapeutically useful drug action. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 2009, vol. 12 (1), 31-39 [0111]
- ZHANG R ; MONSMA F. Binding kinetics and mechanism of action: toward the discovery and development of better and best in class drugs. *Expert Opin Drug Discov.*, 2010, vol. 5 (11), 1023-9 [0111]
- MOTULSKI HJ ; MAHAN LC. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol.*, 1984, vol. 25 (1), 1-9 [0111]
- *Erratum in Mol Pharmacol.*, 2014, vol. 86 (5), 592 [0111]
- ELG M ; GUSTAFSSON D ; DEINUM J. The importance of enzyme inhibition kinetics for the effect of thrombin inhibitors in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost.*, 1997, vol. 78 (4), 1286-92 [0111]
- TRESADERN G ; BARTOLOME JM ; MACDONALD GJ ; LANGLOIS X. Molecular properties affecting fast dissociation from the D2 receptor. *Bioorg Med Chem.*, 2011, vol. 19 (7), 2231-41 [0111]
- DAHL G ; AKERUD T. Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. *Drug Discov Today*, 2013, vol. 18 (15-16), 697-707 [0111]
- LIEBERG B ; NYLANDER C ; LUNDSTRÖM I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Actuators*, 1983, vol. 4, 299-304 [0111]
- LANGLOIS X ; MEGENS A ; LAVRESEN H ; ATACK J ; CIK M ; TE RIELE P ; PEETERS L ; WOUTERS R ; VERMEIRE J ; HENDRICKX H. Pharmacology of JNJ-37822681, a specific and fast-dissociating D2 antagonist for the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther.*, 2012, vol. 342 (1), 91-105 [0111]