



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 442**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98957812 .5**  
86 Fecha de presentación : **12.11.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1030678**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2000**

54 Título: **Método de alto rendimiento para clasificar funcionalmente proteínas identificadas usando un enfoque genómico.**

30 Prioridad: **12.11.1997 US 65129 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2007**

73 Titular/es: **Johnson & Johnson Pharmaceutical  
Research & Development L.L.C.  
920 Route 202  
Raritan, New Jersey 08869, US**

72 Inventor/es: **Pantoliano, Michael, W.;  
Salemme, Francis, R. y  
Carver, Theodore, E., Jr.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 273 442 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 de alto rendimiento para clasificar funcionalmente proteínas identificadas usando un enfoque genómico.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a un método de clasificación de una proteína basado en la capacidad de uno o más ligandos para modificar la estabilidad, y particularmente, la estabilidad térmica, de la proteína, de tal manera que la modificación de la estabilidad indica una interacción entre el ligando y la proteína.

**Técnica relacionada**

Los ~ 3 x 10<sup>9</sup> pares de bases de nucleótidos contenidos en el genoma humano codifican para aproximadamente de 60.000 a 100.000 proteínas esenciales (Alberts *et al.*, En: “*Molecular Biology of the Cell*”, 3<sup>a</sup> Ed., Alberts, B. D. *et al.*, Eds. (1994); Rowen, L. *et al.*, *Science* 278:605 (1997)). Los investigadores del proyecto Genoma Humano están identificando rápidamente todos los genes de los 23 pares de cromosomas humanos. Los productos de estos genes se reconocen ampliamente como el conjunto futuro de dianas terapéuticas para el desarrollo de productos farmacéuticos en las próximas décadas. Aunque la secuenciación del genoma humano se completará enormemente en el plazo de unos cuantos años, la elucidación de la función de estos genes se retrasará aún más. Por tanto, se requieren nuevas tecnologías para comprender la organización funcional del genoma humano y realizar la transición desde la “genómica estructural”, o información de secuencia, hasta la “genómica funcional”, o función génica, y la asociación con fenotipos normales y patológicos (Hieter & Boguski, *Science*, 278:601 (1997)).

La dificultad de esta tarea se ha ilustrado claramente mediante el reciente descubrimiento de que de los 4288 genes en el genoma elemental de *E. coli*, la función de aproximadamente el 40% de las proteínas codificadas por estos genes es completamente desconocida (Blattner *et al.*, *Science* 257:1453 (1997)). De hecho, de los 12 microorganismos para los que está disponible la información genómica completa, siendo *S. cerevisiae* el mayor con 12,1 megabases (6034 genes), sólo se han identificado del 44% al 69% de los genes usando las comparaciones computacionales de secuencias de estado de la técnica actual (Pennisi, E., *Science* 277:1433 (1997)). Además, la espiroqueta que produce la sífilis tiene 1.014 genes, de los que el 45% no tienen función conocida (Fraser *et al.*, *Science* 281:375-388 (1998)). Como resultado, hay un vacío de información funcional que presenta un reto para las metodologías tradicionales, y al mismo tiempo una oportunidad de descubrir nuevas dianas para la intervención terapéutica.

Sin embargo, la clasificación de las proteínas de función desconocida basándose en la homología de nucleótidos o aminoácidos con proteínas de función conocida es imprecisa y poco fiable. Las proteínas que tienen homología estructural pueden tener funciones diferentes. Por ejemplo, lisozima y  $\alpha$ -lactoalbúmina tienen una homología de secuencia del 40%, pero funciones divergentes. La lisozima es una hidrolasa y la  $\alpha$ -lactoalbúmina es una proteína de unión a calcio que participa en la síntesis de lactosa para su secreción en la leche de mamíferos lactantes (Qasba y Kumar, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32:255-306 (1997)).

Algunas proteínas tienen una función similar, aunque no tienen homología de secuencia. Por ejemplo, las serina proteasas tripsina y subtilisina muestran una función similar, pero no muestran ni homología de secuencia ni homología estructural (Tong *et al.*, *Nature Structural Biology* 9:819-826 (1998)). Las proteína cinasas dependientes de AMP cíclico de la familia de plegamiento de cinasas y D-Ala:D-Ala ligasa de la familia de plegamiento “ATP Grasp”, no tienen homología de secuencia, aunque comparten elementos estructurales comunes para el reconocimiento de ATP y ambas son enzimas dependientes de ATP (Denessiouk *et al.*, *Protein Science* 7:1768-1771 (1998)). Algunas proteínas no muestran homología de secuencia, muestran cierta homología estructural, aunque tienen funciones diferentes. Ejemplos de tales proteínas son la proteína de resistencia a bleomicina, bifenilo 1,2-dioxigenasa y glioxalasa humana (Bergdoll *et al.*, *Protein Science* 7:1661-1670 (1998)).

Por tanto, existe la necesidad de una tecnología precisa, fiable que facilite la rápida clasificación de alto rendimiento de proteínas de función desconocida.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona métodos para clasificar funcionalmente una proteína. Los métodos están relacionados con la capacidad de las moléculas en una multiplicidad de moléculas diferentes para modificar la estabilidad de una proteína, y por tanto, unirse a la proteína.

En un aspecto la presente invención proporciona un método para determinar al menos una función biológica de una proteína diana, comprendiendo dicho método:

- (a) seleccionar una multiplicidad de moléculas diferentes por su capacidad para modificar la estabilidad de dicha proteína diana, en el que la modificación de la curva de desplegamiento de dicha proteína diana por una molécula indica que la molécula se une a dicha proteína diana, comprendiendo dicha etapa de selección:

## ES 2 273 442 T3

- (a1) poner en contacto dicha proteína diana con una o más de dicha multiplicidad de moléculas diferentes en cada uno de una multiplicidad de recipientes;
- 5 (a2) tratar dicha proteína diana en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes para hacer que la proteína se despliegue;
- (a3) medir en cada uno de dichos recipientes un cambio físico asociado con el desplegamiento de dicha proteína diana;
- 10 (a4) generar una curva de desplegamiento para dicha proteína diana para cada uno de dichos recipientes;
- (a5) comparar cada una de dichas curvas de desplegamiento en la etapa (a4) con la curva de desplegamiento obtenida para dicha proteína en ausencia de cualquiera de dicha multiplicidad de moléculas diferentes; y
- 15 (a6) determinar si cualquiera de dicha multiplicidad de moléculas diferentes modifica la estabilidad de dicha proteína, en el que una modificación en la estabilidad está indicada por un desplazamiento en la curva de desplegamiento;
- 20 y
- (b) en el que una modificación en la estabilidad está indicada en la etapa (a6), determinando al menos una función biológica de dicha proteína diana mediante:
- 25 (b1) la generación de una primera lista de moléculas que modifican la curva de desplegamiento de dicha proteína diana; y
- (b2) la comparación de dicha primera lista de moléculas con al menos una segunda lista de moléculas, en la que las moléculas en dicha segunda lista se sabe que modifican la curva de desplegamiento de un grupo de proteínas que comparten función biológica; y
- 30 (b3) la determinación de si alguna molécula en dicha primera lista está incluida en dicha segunda lista; determinando así al menos una función biológica de la proteína diana.

35 En una primera realización, la proteína diana puede desplegarse debido a un cambio térmico y se calienta en la etapa (a2) para generar una curva de desplegamiento térmico para dicha proteína diana como una función de la temperatura para cada uno de dichos recipientes; y se determina al menos una función biológica de dicha proteína diana si las moléculas que desplazan la curva de desplegamiento térmico de dicha proteína diana desplazan las curvas de desplegamiento térmico de proteínas con las que comparten función biológica.

40 En dicha etapa (a) de selección, la multiplicidad de moléculas diferentes pueden ser las moléculas en dicha segunda lista.

45 En la primera realización, la etapa (a5) de comparación puede comprender ordenar dichas moléculas en dicha multiplicidad de moléculas diferentes por su unión a dicha proteína diana según la capacidad de cada una de dicha multiplicidad de moléculas diferentes para desplazar la curva de desplegamiento térmico de dicha proteína diana.

En la primera realización, en dicha etapa (a2) de calentamiento, dicha multiplicidad de recipientes puede calentarse simultáneamente.

50 En la primera realización, dicha etapa (a4) puede comprender además determinar una temperatura del punto medio ( $T_m$ ) de la curva de desplegamiento térmico; y dicha etapa (a5) puede comprender además comparar la  $T_m$  de cada una de dichas curvas de desplegamiento en la etapa (a4) con (1) la  $T_m$  de cada una de dichas otras curvas de desplegamiento térmico y con (2) la  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico obtenida para dicha proteína diana en ausencia de cualquiera de dichas moléculas diferentes.

55 En cualquier realización del primer aspecto de la invención, dicha etapa (a3) puede comprender medir la absorbancia de la luz por el contenido de cada uno de dichos recipientes.

60 En la primera realización de la invención, dicha etapa (a1) puede comprender poner en contacto dicha proteína diana con una molécula de sonda de fluorescencia en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes y dicha etapa (a3) puede comprender:

- (i) excitar dicha molécula de sonda de fluorescencia, en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes, con luz; y
- 65 (ii) medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes, incluyendo medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes, un recipiente cada vez o simultáneamente, o medir la fluorescencia de un subconjunto de dicha multiplicidad de recipientes simultáneamente.

## ES 2 273 442 T3

En la primera realización de la invención, dicha etapa (a3) puede comprender:

- (i) excitar residuos de triptófano en dicha proteína diana, en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes, con luz; y
- (ii) medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes.

En la primera realización de la invención, dicha multiplicidad de recipientes en la etapa (a1) puede comprender una multiplicidad de pocillos en una microplaca.

En una realización adicional, la invención proporciona un método de la primera realización, llevado a cabo en un aparato que comprende:

un primer bloque conductor de calor en contacto con una primera pluralidad de muestras proporcionadas en pocillos separados de una placa de microtitulación, comprendiendo cada una de dichas muestras dicha proteína diana y uno o más de una multiplicidad de compuestos diferenciados de una biblioteca de sondas funcionales;

un controlador de temperatura acoplado a dicho primer bloque conductor de calor;

una fuente luminosa dispuesta adyacente a dicho primer bloque conductor de calor;

un sensor de emisión de fluorescencia dispuesto adyacente a dicho primer bloque conductor del calor; y

medios para procesar una señal de emisión espectral obtenida a partir de dicho sensor de emisión de fluorescencia;

en el que la multiplicidad de compuestos diferenciados de la biblioteca de sondas funcionales se compone de una pluralidad de vitaminas, una pluralidad de coenzimas, una pluralidad de compuestos que tienen grupos funcionales de residuos de aminoácidos y miméticos de los mismos, una pluralidad de quelantes de metales, una pluralidad de iones metálicos, una pluralidad de hidratos de carbono, una pluralidad de ácidos nucleicos, una pluralidad de lípidos, una pluralidad de enzimas, una pluralidad de esteroides, una pluralidad de hormonas amínicas, una pluralidad de alcaloides, una pluralidad de moléculas de fármacos genéricos y una pluralidad de productos naturales; y

en el que dicha biblioteca de sondas funcionales tiene una diversidad suficiente de compuestos para determinar al menos una función biológica de la proteína diana cuando se prueba la multiplicidad de compuestos de la biblioteca de sondas funcionales usando dicho aparato para determinar su capacidad para desplazar la curva de desplegamiento térmico de la proteína diana y se comparan con una lista de compuestos que se sabe que modifican la estabilidad de un grupo de proteínas con las que comparten la función biológica.

Existen varias ventajas de los métodos de la presente invención para el procedimiento de descubrimiento de fármacos, especialmente con respecto a la genómica funcional. Por ejemplo, los métodos de la presente invención proporcionan una utilidad de diana cruzada generalizada porque se basan en propiedades termodinámicas comunes a todos los complejos de ligando/receptor. Además, los métodos de la presente invención facilitan la evaluación directa de proteínas diana derivadas de estudios genómicos porque no es necesario un conocimiento de la función específica de la diana.

Una ventaja adicional proporcionada por los métodos de la presente invención es que pueden aplicarse de manera universal a cualquier receptor que es una diana farmacológica. No es necesario inventar un nuevo ensayo cada vez que se vuelve disponible un nuevo receptor para probarlo. Por tanto, la selección de bibliotecas de compuestos comienza inmediatamente con la preparación de la diana proteica. Cuando el receptor en estudio es una enzima, los investigadores pueden determinar el orden jerárquico de afinidad de una serie de compuestos más rápidamente y más fácilmente de lo que pueden hacerlo usando métodos cinéticos convencionales. Además, los investigadores pueden detectar la unión de ligandos a una enzima, independientemente de si la unión se produce en el sitio activo, en un sitio de unión de cofactor alostérico o en una superficie de contacto de una subunidad del receptor. La presente invención es igualmente aplicable a receptores no enzimáticos.

Aún una ventaja adicional proporcionada por los métodos de la presente invención es que los métodos pueden practicarse usando volúmenes de ensayo miniaturizados (por ejemplo, 1-5  $\mu\text{L}$ ), que facilita el uso de matrices de ensayo de microplaca de alta densidad de 16 x 24 (384 pocillos), 32 x 48 (1536 pocillos) o matrices adaptadas adicionales. Sólo se requieren de aproximadamente 5 a 40 picomoles de proteína (0,1  $\mu\text{g}$  a 1,0  $\mu\text{g}$  para una proteína de 25 kDa) por pocillo de ensayo, para una concentración de proteína final de aproximadamente 1 a 4  $\mu\text{M}$ . por tanto, puede usarse 1,0 mg de proteína para llevar a cabo de  $10^3$  a  $10^4$  ensayos en el formato miniaturizado.

Aún una ventaja adicional proporcionada por la presente invención es que los métodos de la presente invención facilitan la selección de ultra alto rendimiento de bibliotecas de compuestos (por ejemplo, bibliotecas de sondas funcionales). Por tanto, los métodos de la presente invención hacen posible seleccionar de 10.000 a 30.000 compuestos al día por estación de trabajo. A esa velocidad, pueden seleccionarse de 2,5 a 6 proteínas diana al día, por estación de

trabajo, frente a una biblioteca de sondas funcionales de 4000 compuestos. Pueden seleccionarse al menos de 500 a 1200 dianas terapéuticas al día, por estación de trabajo, frente a una biblioteca de sondas funcionales de 4000 compuestos. En cinco años, podrían probarse de aproximadamente el 3 al 7,5% de las proteínas codificadas por el genoma humano por estación de trabajo.

5

Aún una ventaja adicional proporcionada por los métodos de la presente invención es que el amplio intervalo dinámico de afinidades de unión que puede someterse a ensayo en el ensayo de pocillo único abarca doce órdenes de magnitud (es decir, desde afinidades femtomolares ( $10^{-15}$  M) hasta milimolares ( $10^{-3}$  M)).

10

Aún una ventaja adicional proporcionada por los métodos de la presente invención es que pueden monitorizarse las interacciones de unión de múltiples ligandos a través de la aditividad próxima de la energía libre de la unión de ligandos para ligandos individuales.

15

Además, los métodos de la presente invención proporcionan información que es más exacta y fiable que la información proporcionada por las metodologías de homología de secuencia convencionales, tal como la notificada en Tatusov, R. L. *et al.*, *Science* 278:631-637 (1997); y Heiter, P. y M. Boguski, *Science* 278:601-602 (1997).

20

25

30

Además, pueden identificarse diferentes clases de enzimas y diferenciarse basándose en diferentes conjuntos de análogos de estado de transición. Por ejemplo, se ha encontrado que los derivados del ácido bencenoborónico (BBA) se unen de manera reversible a diversas serina proteasas tales como las subtilisinas, de fuentes bacterianas, y  $\alpha$ -quimotripsina, de fuentes eucariotas (Nakatani, H., *et al.*, *J. Biochem. (Tokio)* 77:905-8 (1975)). De manera similar, se encontró que análogos de estado de transición de boroarginina, que tienen un grupo arginina en la posición P1 de este peptidomimético sintético, son inhibidores más específicos para las serina proteasas, trombina, tripsina y plasmina (Tapparelli *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:4734-41 (1993)) con la especificidad observada:  $K_d \sim 10$  nM (trombina),  $K_d \sim 1.000$  nM (tripsina),  $K_d \sim 10.000$  nM (plasmina). Esto ilustra una ventaja importante que proporcionan los métodos de la presente invención, con respecto al enfoque de comparación de secuencias para clasificar proteínas: el desplazamiento  $\Delta T_m$  esperado de la unión de un análogo de estado de transición de ácido borónico debe ser mucho más característico de una serina proteasa (independientemente de una fuente bacteriana o eucariota) que la información proporcionada por las comparaciones de secuencias solas. Las serina proteasas de fuentes bacterianas y eucariotas son ejemplos de los libros de texto de evolución convergente y, por tanto, tienen muy poca homología de secuencia, a pesar del hecho de que comparten la función catalítica.

35

A continuación se describen en detalle características y ventajas adicionales de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de las figuras

40

La figura 1A muestra un diagrama de flujo que ilustra un método de la presente invención. La figura 1B muestra otro diagrama de flujo que ilustra un método de la presente invención.

La figura 2 es un diagrama esquemático que ilustra una vista desde arriba de un aparato de ensayo que puede usarse para practicar el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca.

45

La figura 3 muestra los resultados de ensayos de desplazamiento térmico en microplaca de interacciones de unión de un único ligando a tres clases diferentes de sitios de unión para  $\alpha$ -trombina humana.

La figura 4 muestra los resultados de ensayos de desplazamiento térmico en microplaca de interacciones de unión de múltiples ligandos para  $\alpha$ -trombina humana.

50

La figura 5 muestra los compuestos presentes en la placa 1 de la biblioteca de sondas funcionales.

La figura 6 muestra el espectro de actividad para factor Xa que se generó usando los compuestos en la placa 1 de la biblioteca de sondas funcionales.

55

La figura 7 muestra el espectro de actividad para receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1) que se generó usando los compuestos en la placa 1 de la biblioteca de sondas funcionales.

La figura 8 muestra el resultado de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de la unión del represor *lac* dimérico recombinante a una secuencia de operador *lac* palindrómico 21-mérico sintético.

60

La figura 9 muestra el resultado de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de la unión de miosina muscular bovina a adenosina trifosfato (ATP).

65

La figura 10 muestra el resultado de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de la unión de proteína cinasa dependiente de 3'-5'-AMPc de corazón bovino a adenosina trifosfato- $\gamma$ -sulfato (ATP- $\gamma$ -S).

La figura 11 muestra el resultado de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de la unión de dihidrofolato reductasa bovina (DHFR) a metotrexato.

La figura 12 muestra el resultado de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de la unión de dihidrofolato reductasa bovina (DHFR) a NADPH.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

5 En la siguiente descripción, se hará referencia a diversos términos y metodologías conocidos por los expertos en las técnicas bioquímica y farmacológica.

10 La presente invención proporciona métodos para clasificar funcionalmente una proteína, que puede desplegarse, según un conjunto de moléculas en una multiplicidad de moléculas diferentes que modifican la estabilidad de la proteína. Puede hacerse que una proteína se despliegue mediante tratamiento con un agente desnaturante (tal como urea, clorhidrato de guanidinio, tiosuccinato de guanidinio, etc.), un detergente, tratando la proteína con presión, calentando la proteína, etc.

15 En una realización, la presente invención proporciona métodos para clasificar funcionalmente una proteína que supone determinar si se desplaza la curva de desplegamiento térmico de la proteína. Sólo las moléculas que desplazan la curva de desplegamiento térmico se considera que son ligandos que se unen a la proteína. Preferiblemente, se usa el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca para determinar si se desplaza la curva de desplegamiento térmico de la proteína. El ensayo de desplazamiento térmico en microplaca supone determinar si las moléculas que se prueban para determinar su unión desplazan la curva de desplegamiento térmico. El ensayo de desplazamiento térmico en microplaca se describe en la solicitud de patente internacional número PCT/US97/08154 (publicada el 13 de noviembre de 1997 como la publicación número WO97/42500).

25 En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para clasificar una proteína diana que puede desplegarse debido a un cambio térmico.

30 En esta realización, la proteína diana se pone en contacto con una molécula de una multiplicidad de moléculas diferentes en cada uno de una multiplicidad de recipientes. Entonces, se calientan los recipientes, en intervalos, en un intervalo de temperaturas. Preferiblemente, la multiplicidad de recipientes se calienta simultáneamente. Tras cada intervalo de calentamiento, se mide un cambio físico asociado con el desplegamiento térmico de la molécula diana. En una realización alternativa de este método, se calientan los recipientes de manera continua. Se representa una curva de desplegamiento térmico como una función de la temperatura para la molécula diana en cada uno de los recipientes. Preferiblemente, se identifica la temperatura en el punto medio,  $T_m$ , de cada curva de desplegamiento térmico y se compara entonces con la  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico obtenida para la molécula diana en ausencia de cualquiera de las moléculas en los recipientes. Alternativamente, puede compararse una curva de desplegamiento térmico completa con las otras curvas de desplegamiento térmico completas usando herramientas analíticas informáticas.

40 Los métodos de la presente invención que suponen determinar si las moléculas desplazan la curva de desplegamiento térmico de una proteína son diferentes de los métodos que no suponen determinar si las moléculas desplazan la curva de desplegamiento térmico de una proteína, tales como ensayos de susceptibilidad a la proteólisis, unión a la superficie por una proteína, unión a anticuerpos de una proteína, unión a chaperonas moleculares de una proteína, unión diferencial a un ligando inmovilizado y agregación de proteínas. Tales ensayos son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, véase la patente de los EE.UU. número 5.585.277; y la patente de los EE.UU. número 5.679.582. Estos enfoques descritos en las patentes de los EE.UU. números 5.585.277 y 5.679.582 suponen comparar el grado de plegamiento y/o desplegamiento de la proteína en presencia y en ausencia de una molécula que se está probando para determinar su unión. Estos enfoques no suponen una determinación de si cualquiera de las moléculas que se unen a la proteína desplaza la curva de desplegamiento térmico de la proteína.

50 El término “clasificar funcionalmente proteínas” se refiere a clasificar una proteína según una función biológica, bioquímica, física o química, tal como la capacidad para hidrolizar un resto fosfato (una fosfatasa), para añadir un resto fosfato (una cinasa), etc. Las proteínas pueden clasificarse como teniendo una o más de numerosas funciones diferentes, y los métodos de la presente invención no se limitan a clasificar proteínas como fosfatasa, cinasas u otros tipos de enzimas.

55 Los términos “multiplicidad de moléculas”, “multiplicidad de compuestos” o “multiplicidad de recipientes” se refieren a al menos dos moléculas, compuestos o recipientes.

60 El término “subconjunto de moléculas” en una multiplicidad de moléculas diferentes se refiere a un conjunto de moléculas más pequeño que la multiplicidad de moléculas diferentes.

El término “multivariable” se refiere a más de una variable experimental.

65 El término “selección” se refiere a la prueba de una multiplicidad de moléculas o compuestos para determinar su capacidad para unirse a una molécula diana que puede desplegarse cuando se calienta. El procedimiento de selección es un procedimiento repetitivo, o iterativo, en el que se prueban moléculas para determinar su unión a una proteína en un ensayo de desplegamiento, y particularmente en un ensayo de desplazamiento térmico. Por ejemplo, si un subconjunto de moléculas en una biblioteca de sondas funcionales que se selecciona para determinar la unión a una

## ES 2 273 442 T3

proteína no se unen, entonces se repite la selección con otro subconjunto de moléculas. Si la biblioteca completa no contiene ninguna molécula que se una a la proteína, entonces se repite la selección usando moléculas de otra biblioteca de sondas funcionales.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, una “selección de sondas funcionales” es una evaluación (por ejemplo, un ensayo) de la capacidad de una multiplicidad de moléculas diferentes en una biblioteca de sondas funcionales para unirse a la proteína diana y modificar la estabilidad de la proteína diana.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, una “biblioteca de sondas funcionales” se refiere a una o más moléculas diferentes que se prueban para determinar su capacidad de unirse a una proteína diana y modificar la estabilidad, y particularmente la estabilidad térmica, de la proteína en respuesta al desplegamiento (por ejemplo, desplegamiento térmico). Realizando una prueba de estabilidad, y preferiblemente usando una tecnología de ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, en la proteína en presencia de cada miembro de la biblioteca de sondas  
15 qué ligandos se unen individualmente o en combinación fuerte y específicamente a la proteína diana.

Una biblioteca de sondas funcionales puede ser cualquier clase de biblioteca de moléculas, incluyendo una biblioteca de proteínas, una biblioteca de subunidades de proteína, una biblioteca de péptidos, una biblioteca de vitaminas y cofactores, una biblioteca de inhibidores enzimáticos, una biblioteca de ácidos nucleicos, una biblioteca de hidratos de carbono, una biblioteca de fármacos genéricos, una biblioteca de productos naturales o una biblioteca combinatoria. Para las moléculas en la biblioteca de sondas funcionales que se unen a la proteína diana, puede evaluarse el efecto biológico en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

20 Si la biblioteca de sondas funcionales es una biblioteca combinatoria, entonces preferiblemente la es una biblioteca combinatoria creada usando el sistema DirectedDiversity<sup>®</sup>. El sistema DirectedDiversity<sup>®</sup> se describe en la patente de los EE.UU. 5.463.564.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “espectro de actividad” se refiere a la lista de compuestos (es decir, ligandos) que se unen a la proteína diana y modifican la estabilidad (por ejemplo, la estabilidad térmica) de la proteína diana, y las afinidades respectivas de los ligandos por la proteína diana. Los términos “perfil de unión de sondas funcionales” y “espectro de actividad” son sinónimos. Una disminución en la  $T_m$  sugiere que el compuesto o molécula bloquea la unión de otra molécula que estabilizaría la proteína. Por ejemplo, si un quelante de metales disminuye la  $T_m$ , eso sugiere que la proteína se une a un metal (por ejemplo, una interacción entre calcio y  $\alpha$ -lactoalbúmina). Sin un agente reductor disminuye la  $T_m$ , eso sugiere que la proteína contiene uno o más enlaces disulfuro.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “lista del espectro de referencia funcional” se refiere a una lista de clases de proteína diana (incluyendo referencias a bases de datos electrónicas apropiadas), ligandos asociados, y constantes de unión correspondientes, que pueden usarse para clasificar funcionalmente una proteína diana. Alternativamente, la lista del espectro de referencia funcional puede ser un conjunto de uno o más espectros de actividad para una o más proteínas conocidas. Por tanto, un espectro de actividad para una proteína dada puede servir como una “huella dactilar” para esa proteína y para la clase funcional de proteínas a la que pertenece la proteína.

45 Una “lista de referencia funcional” es una lista de proteínas que comparten una o más características comunes, tal como la unión a un ligando particular, o que muestran una actividad común.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, un “comparador del espectro de actividad” es o bien un medio computacional o bien gráfico mediante el cual puede compararse el espectro de actividad, derivado de la observación de los efectos de la biblioteca de sondas funcionales sobre la proteína diana, con la lista del espectro de referencia funcional. Por ejemplo el comparador del espectro de actividad puede ser software de hoja de cálculo que está fácilmente disponible para los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, puede usarse Microsoft Excel (Microsoft, Inc., Redmont, WA).

55 En muchos casos, puede asignarse provisionalmente una función de un gen a través de homología a secuencias de función conocida (una “hipótesis funcional” derivada de la homología de secuencia). Puede emplearse el ensayo de desplazamiento térmico para validar tal hipótesis funcional, o para identificar la función correcta de una lista de posibles funciones implicadas por la homología de secuencia. Por ejemplo, hay proteínas que hidrolizan ATP y convierten la energía de la hidrólisis en energía mecánica, conocidas como “motores moleculares”. Estas proteínas incluyen ADN y ARN helicasas, cinesinas, chaperoninas para replegar las proteínas, y los complejos proteicos en la base de flagelos bacterianos. Estas proteínas comparten todas homología de secuencia en el dominio de hidrólisis de ATP, mientras que sus otras funciones son diferentes. En una aplicación de los métodos de la presente invención, la homología de secuencia conocida para una parte de una diana proteica (por ejemplo, un dominio de ATPasa) puede usarse para diseñar ensayos de desplazamiento térmico usando bibliotecas de sondas funcionales especiales dirigidas a diferentes posibles funciones de la proteína diana (por ejemplo, bibliotecas que contienen moléculas para determinar con sonda las actividades especiales de chaperoninas, helicasas, cinesinas y otros motores moleculares).  
65 Alternativamente, puede identificarse una proteína diana por medio de homología de secuencia como una tirosina cinasa, y la presente invención podría usarse entonces para seleccionar esta diana frente a una biblioteca de péptidos que contiene muchos posibles sitios de fosforilación de sustratos. Estos ejemplos ilustran que la presente invención es sumamente complementaria al procedimiento de asignar función usando la homología de secuencia, porque la presente

invención puede usarse para confirmar, rechazar o elaborar las funciones hipotéticas indicadas por la homología de secuencia.

5 En consecuencia, en una realización la presente invención proporciona también un método para clasificar funcionalmente una proteína, método que comprende (a) seleccionar una o más de una multiplicidad de moléculas diferentes que se sabe que se unen a una clase particular de proteínas para determinar su capacidad para modificar la estabilidad de dicha proteína, en el que la modificación de la estabilidad de la proteína indica que la molécula se une a la proteína, (b) generar un espectro de actividad para la proteína procedente de la etapa de selección, en el que el espectro de actividad refleja un subconjunto de moléculas, de la multiplicidad de moléculas diferentes, que modifican la estabilidad de dicha proteína, y (c) clasificar la proteína como un miembro de dicha clase de proteínas si la una o más de la multiplicidad de moléculas diferentes modifican la estabilidad de la proteína.

15 Debe indicarse que el procedimiento anterior para elaborar o especificar la función de la proteína usando un ensayo de desplazamiento térmico también puede aplicarse a hipótesis funcionales generadas usando otros métodos de asignación de la función de una proteína (por ejemplo, estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos, patrones de expresión celular de ARNm o una proteína codificada por un gen diana, y efectos fenotípicos de alterar un gen diana para cambiar su función al nivel de organismo).

20 Además, usando los métodos de la presente invención, puede evaluarse la unión de más de un ligando a más de un sitio en una proteína, y clasificarse la proteína según el subconjunto de moléculas que se unen a la proteína. Por ejemplo, una proteína de función desconocida que se encuentra que se une a ADN y a adenosina trifosfato (ATP) puede clasificarse como una proteína que afecta a la estructura de ADN. Por tanto, usando información referente a la unión de múltiples ligandos, puede restringirse el gran número de posibles clasificaciones de proteínas a sólo unas cuantas clasificaciones probables.

25 Además, usando los métodos de la presente invención, puede seleccionarse una proteína de función desconocida por una función adicional, previamente desconocida. Preferiblemente, se usa el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca para seleccionar la biblioteca de sondas funcionales de moléculas frente a las proteínas.

30 El término “función” se refiere a la función biológica de una proteína, péptido o polipéptido. Por ejemplo una cinasa es una proteína para la que su función es catalizar la adición covalente de un grupo fosfato a otra proteína.

35 El término “molécula” se refiere al compuesto que se prueba para determinar su afinidad de unión por la molécula diana. Este término engloba compuestos químicos de cualquier estructura, incluyendo, pero sin limitarse a ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, y péptidos. Más específicamente, el término “molécula” engloba compuestos en una biblioteca de compuestos o combinatoria. Los términos “molécula” y “ligando” son sinónimos.

40 El término “poner en contacto una proteína diana” se refiere en términos generales a poner la proteína diana en solución con la molécula que va a seleccionarse por su unión. En términos menos generales, poner en contacto se refiere a voltear, remover, agitar o hacer vibrar una solución de la proteína diana y la molécula que va a seleccionarse por su unión. Más específicamente, poner en contacto se refiere a mezclar la proteína diana con la molécula que va a seleccionarse por su unión. El mezclado puede conseguirse, por ejemplo, mediante captación y descarga repetidas a través de la punta de una pipeta. Preferiblemente, poner en contacto se refiere a equilibrar la unión entre la proteína diana y la molécula que va a seleccionarse por su unión. La puesta en contacto puede producirse en el recipiente o antes de que se sitúen en el recipiente la proteína diana y la molécula que va a seleccionarse.

45 El término “recipiente” se refiere a cualquier receptáculo o cámara en el que puedan situarse el receptor y la molécula que va a seleccionarse por su unión. El término “recipiente” engloba tubos de reacción (por ejemplo, tubos de ensayo, microtubos, viales, etc.). Preferiblemente, el término “recipiente” se refiere a un pocillo en una placa de microtitulación o microplaca de múltiples pocillos.

El término “muestra” se refiere al contenido de un recipiente.

55 Los términos “emisión espectral”, “cambio térmico” y “cambio físico” engloban la liberación de energía en la forma de luz o calor, la absorción de energía en la forma de luz o calor, cambios en la turbidez y cambios en las propiedades polares de la luz. Específicamente, los términos se refieren a la emisión de fluorescencia, transferencia de energía de fluorescencia, absorción de luz ultravioleta o visible, cambios en las propiedades de polarización de la luz, cambios en las propiedades de polarización de la emisión de fluorescencia, cambios en la velocidad de cambio de la fluorescencia con el tiempo (es decir, tiempo de vida de fluorescencia), cambios en la anisotropía de fluorescencia, cambios en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, cambios en la turbidez y cambios en la actividad enzimática. Preferiblemente, los términos se refieren a la fluorescencia, más preferiblemente a la emisión de fluorescencia. La emisión de fluorescencia puede ser intrínseca a una proteína o puede deberse a una molécula indicadora de fluorescencia. El uso de técnicas de fluorescencia para monitorizar el desplegamiento de la proteína se conoce bien por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, véase Eftink, M. R., *Biophysical J.*, 66:482-501 (1994).

65 El término “desplegamiento” se refiere a la pérdida de estructura, tal como la ordenación cristalina de las cadenas laterales de aminoácidos, la estructura de la proteína secundaria, terciaria o cuaternaria.

El término “plegar”, “replegar” y “renaturalizar” se refieren a la adquisición de la ordenación de las cadenas laterales de aminoácidos, la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, correctas de una proteína, que proporciona la función química y biológica completa de la biomolécula.

5 El término “proteína desnaturalizada” se refiere a una proteína que se ha tratado para eliminar la ordenación de las cadenas laterales de aminoácidos, la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria nativas. El término “proteína nativa” se refiere a una proteína que tiene el grado de ordenación de las cadenas laterales de aminoácidos, la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria que dota a la proteína con función química y biológica completa. Una proteína nativa es una que no se ha calentado y no se ha tratado con agentes de desplegamiento o productos químicos tales como la urea.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos “proteína” y “polipéptido” son sinónimos.

15 Una “curva de desplegamiento” es una representación del cambio físico asociado con el desplegamiento de una proteína como una función de la temperatura, concentración de desnaturalizante, presión, etc. Una “curva de desnaturalización” es una representación del cambio físico asociado con la desnaturalización de una proteína o un ácido nucleico como una función de la temperatura, concentración de desnaturalizante, presión, etc.

20 Una “curva de desplegamiento térmico” es una representación del cambio físico asociado con la desnaturalización de una proteína o un ácido nucleico como una función de la temperatura. Véase, por ejemplo, Davidson *et al.*, *Nature Structure Biology* 2:859 (1995); y Clegg, R. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:2994-2998 (1993).

25 El término “desplazamiento en la curva de desplegamiento térmico” se refiere a un desplazamiento en la curva de desplegamiento térmico para una proteína que está unida a un ligando, con respecto a la curva de desplegamiento térmico de la proteína en ausencia del ligando.

30 El término “modificación de la estabilidad” se refiere al cambio en la cantidad de presión, la cantidad de calor, la concentración de detergente o la concentración de desnaturalizante que se requiere para producir un grado dado de cambio físico en una proteína diana que está unida por uno o más ligandos, con respecto a la cantidad de presión, la cantidad de calor, la concentración de detergente o la concentración de desnaturalizante que se requiere para producir el mismo grado de cambio físico en la proteína diana en ausencia de cualquier ligando. La modificación de la estabilidad puede presentarse como un aumento o una disminución en la estabilidad. La modificación de la estabilidad de una proteína por un ligando indica que el ligando se une a la proteína. La modificación de la estabilidad de una proteína por más de un ligando indica que los ligandos se unen a la proteína.

35 El término “modificación de la estabilidad térmica” se refiere al cambio en la cantidad de energía térmica que se requiere para producir un grado dado de cambio físico en una proteína diana que está unida por uno o más ligandos, con respecto a la ausencia de cualquier ligando. La modificación de la estabilidad térmica puede presentarse como un aumento o una disminución en la estabilidad térmica. La modificación de la estabilidad térmica de una proteína por un ligando indica que el ligando se une a la proteína. La modificación de la estabilidad térmica de una proteína por más de un ligando indica que los ligandos se unen a la proteína.

40 La “temperatura del punto medio,  $T_m$ ” es el punto medio de la temperatura de una curva de desplegamiento térmico. La  $T_m$  puede determinarse fácilmente usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Weber, P. C. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2717-2724 (1994) y Clegg, R. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:2994-2998 (1993).

50 Tal como se trató anteriormente, es preferible determinar el efecto de una o más moléculas sobre la estabilidad térmica de una proteína diana según un cambio en la  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico para la proteína. Alternativamente, puede determinarse el efecto de una o más moléculas sobre la estabilidad térmica de una proteína diana según el cambio en la curva de desplegamiento térmico completa para la proteína diana.

55 El término “molécula de sonda de fluorescencia” se refiere a un fluoróforo extrínseco, que es una molécula o un compuesto fluorescente que puede asociarse con un receptor desplegado o desnaturalizado y, tras la excitación mediante luz de una longitud de onda definida, emite energía de fluorescencia. El término molécula de sonda de fluorescencia engloba todos los fluoróforos. Más específicamente, para las proteínas, el término engloba fluoróforos tales como tioinosina, y N-etenoadenosina, formicina, dansilo, derivados de dansilo, derivados de fluoresceína, 6-propionil-2-(dimetilamino)-naftaleno (PRODAN), 2-anilino-naftaleno y derivados de N-arilamino-naftaleno-sulfonato tales como 1-anilino-naftaleno-8-sulfonato (1,8-ANS), 2-anilino-naftaleno-6-sulfonato (2,6-ANS), 2-amino-naftaleno-6-sulfonato, N,N-dimetil-2-aminonaftaleno-6-sulfonato, N-fenil-2-aminonaftaleno, N-ciclohexil-2-aminonaftaleno-6-sulfonato, N-fenil-2-amino-naftaleno-6-sulfonato, N-fenil-N-metil-2-aminonaftaleno-6-sulfonato, N-(o-toluil)-2-amino-naftaleno-6-sulfonato, N-(m-toluil)-2-amino-naftaleno-6-sulfonato, N-(p-toluil)-2-aminonaftaleno-6-sulfonato, ácido 2-(p-toluidinil)-naftaleno-6-sulfónico (2,6-TNS), 4-(dicianovinil)julolidina (DCVJ), 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (LAURDAN), cloruro de 6-hexadecanoil-2-(((2-(trimetilamonio)etil)metil)-amino)naftaleno (PATMAN), rojo Nilo, N-fenil-1-naftilamina, 1,1-diciano-2-[6-(dimetilamino)naftalen-2-il]propeno (DDNP), ácido 4,4'-dianilino-1,1-binaftil-5,5-disulfónico (bis-ANS), y colorantes derivados de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol, vendidos con la marca comercial DAPOXYL™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), incluyendo los colorantes de 5-(4''-di-

## ES 2 273 442 T3

metilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol proporcionados en Diwu, *Z. et al., Photochemistry and Photobiology* 66(4):424-431 (1997), y en BioProbes 25: págs. 8-9, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR (1997).

5 Ejemplos de colorantes derivados de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol, y el número de catálogo correspondiente de Molecular Probes, incluyen butilsulfonamida de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol (D-12801), 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol-(2-aminoetil)sulfonamida (D-10460), butilsulfonamida de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol (D-12801), ácido 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol-3-sulfonamidofenilborónico (D-10402), sal sódica del ácido 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol sulfónico (D-12800), sulfonilhidrazina de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol (D-10430), 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol-(2-bromoacetamidoetil)sulfonamida (D-10300), 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol-2-(3-(2-piridilditio)propionamidoetil)sulfonamida (D-10301), cloruro de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazolsulfonilo (D-10160), succinimidil éster del ácido 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol-3-sulfonamidopropiónico (D-10162), succinimidil éster del ácido 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazolcarboxílico (D-10161).

15 Preferiblemente, el término "molécula de sonda de fluorescencia" se refiere a 1,8-ANS o 2,6-TNS, y colorantes derivados de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol, vendidos bajo la marca comercial de DAPOXYL™, tales como los proporcionados en Diwu, *Z. et al., Photochemistry and Photobiology* 66(4):424-431 (1997). Todavía más preferiblemente, el término se refiere a colorantes derivados de 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol, vendidos bajo la marca comercial de DAPOXYL™, tales como los proporcionados en Diwu, *Z. et al., Photochemistry and*  
20 *Photobiology* 66(4):424-431 (1997). Lo más preferiblemente, el término se refiere a la sal sódica del ácido 5-(4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazol sulfónico (D-12800).

El término "soporte" engloba una plataforma u otro objeto, de cualquier forma, que por sí mismo puede soportar al menos dos recipientes. El soporte puede componerse de cualquier material, incluyendo, pero sin limitarse a vidrio, plástico o metal. Preferiblemente, el soporte es una microplaca de múltiples pocillos. Los términos microplaca y placa de microtitulación son sinónimos. El soporte puede retirarse del elemento de calefacción. En la presente invención, se usa una pluralidad de soportes. Cada soporte alberga una pluralidad de recipientes.

Los términos "medición espectral" y "medición espectrofotométrica" son sinónimos y se refieren a mediciones de cambios en la absorción de luz. Las mediciones de turbidez, mediciones de absorción de luz visible y mediciones de absorción de luz ultravioleta son ejemplos de mediciones espectrales. La medición de la fluorescencia intrínseca de una proteína diana, y la fluorescencia de un fluoróforo extrínseco que se compleja con o une a una proteína diana también son ejemplos de medición espectral y medición espectrofotométrica.

35 El término "medición polarimétrica" se refiere a mediciones de cambios en las propiedades de polarización de la luz y emisión de fluorescencia. El dicroísmo circular y la rotación óptica son ejemplos de propiedades de polarización de la luz que pueden medirse polarimétricamente. Las mediciones de dicroísmo circular y rotación óptica se toman usando un espectropolarímetro. Las mediciones "no polarimétricas" son aquellas que no se obtienen usando un espectropolarímetro.

40 El conocimiento de la función celular y/o biológica de las proteínas puede ser una baza valiosa en el descubrimiento de fármacos, en el que puede ser útil en el desarrollo de una comprensión detallada de la hipótesis terapéutica para la función del fármaco, en el diseño de estrategias específicas para el diseño de fármacos y en revelar posibles efectos secundarios de los fármacos.

45 Existen decenas de miles de enzimas y receptores diferentes que constituyen potenciales dianas farmacológicas, y constantemente se están descubriendo más a través de estudios de secuenciación del genoma. Estas proteínas y receptores celulares tienen funciones específicas en el sistema biológico, que están definidas prácticamente por los ligandos moleculares con los que forman interacciones específicas. Las interacciones típicas que tienen importancia funcional incluyen interacciones de enzimas con ligandos moleculares como sustratos o análogos de sustratos, cofactores, dominios adaptadores, ácidos nucleicos, etc. e interacciones de receptores con ligandos específicos, otros receptores, componentes estructurales de la superficie celular, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.

55 Aunque es posible ampliamente aislar, o clonar y expresar proteínas que son supuestas dianas farmacológicas, en muchos casos no habrá una base de conocimiento funcional sobre la proteína que pueda ayudar en fases subsiguientes del procedimiento de descubrimiento de fármacos. Sin embargo, una fracción sustancial de las moléculas de proteína conocidas entran en clases mecánicas que comparten importantes características, incluyendo su capacidad para unirse a tipos específicos de ligandos moleculares, incluyendo cofactores enzimáticos, sustratos enzimáticos o análogos de sustratos, etc. En consecuencia, es posible clasificar muchas proteínas de función desconocida por lo demás, mediante  
60 su capacidad para unirse específicamente a diversas clases de ligandos, ya sean solos o en combinación.

Cuando una proteína se une a un ligando biológico de manera funcionalmente significativa, existe un efecto sobre el estado físico de la proteína que se refleja en su estabilidad con respecto al estado sin ligando. En consecuencia, puede clasificarse funcionalmente una proteína de función desconocida previamente incubándola con un panel de sondas  
65 de ligandos y cofactores biológicos (una biblioteca de sondas funcionales) y midiendo qué ligandos tiene efectos sobre la estabilidad de la proteína. Alternativamente, puede determinarse una función desconocida previamente de una proteína de función conocida previamente incubándola con una panel de sondas de ligandos y cofactores biológicos (una biblioteca de sondas funcionales) y midiendo qué ligandos tiene efectos sobre la estabilidad de la proteína.

Tal como se ha establecido a partir de estudios termodinámicos de interacciones proteína-ligando, cuando se asocian dos moléculas para formar un complejo de interacción favorable y específico, las interacciones de unión se asocian con una reducción en la energía libre total del complejo y una estabilización neta del complejo proteína-ligando con respecto a la proteína sin ligando. En términos prácticos, esto significa que cuando una enzima o receptor interacciona con sus cofactores específicos, o análogos de cofactores, la enzima o receptor se estabilizará mediante las interacciones. Sin embargo, es posible que puedan existir situaciones especiales en la que la unión al ligando puede desestabilizar la proteína diana. Por ejemplo, algunas proteínas contienen más de un dominio o sitio alostérico a los que pueden unirse uno o más ligandos.

## Visión general de los métodos de la presente invención

Los métodos de la presente invención, así como otra información, se representan en las figuras 1A y 1B.

### A. Identificación de un supuesto gen diana

Las proteínas diana son proteínas para las que la unión a un fármaco puede tener potencial terapéutico y cuya caracterización funcional puede ser útil en el procedimiento de descubrimiento de fármacos. Se identifican muchos genes que son dianas potenciales para la intervención terapéutica a través de una correlación fenomenológica que relaciona un defecto genético con un estado patológico (por ejemplo, cuando se correlaciona una enfermedad hereditaria con un defecto genético en una enzima o receptor específico) o a través de diferencias en los patrones de expresión de proteínas en tejidos enfermos frente a normales.

En muchos casos, es posible determinar alguna "función" de un producto génico a través de la homología de secuencia con una proteína homóloga sobre la que se conocen datos funcionales o estructurales. Sin embargo, en una fracción sustancial de casos, la homología de secuencia puede no ser suficiente para establecer relaciones funcionales, y se necesita un medio alternativo para establecer la función de manera que pueda facilitar directamente el procedimiento de descubrimiento de fármacos.

### B. Clonar y expresar la proteína

Para practicar los métodos de la presente invención, es necesario obtener la proteína diana en cantidades suficientes para un ensayo biológico. Las proteínas que son posibles nuevas dianas farmacológicas y/o requieren caracterización funcional pueden aislarse directamente de una fuente natural usando una variedad de procedimientos de aislamiento bioquímico establecidos.

La disponibilidad de secuencias génicas completas a partir de datos de secuencias del genoma facilita la clonación y expresión de dianas proteicas identificadas a través de métodos genómicos. Por ejemplo, la secuencia de ADN diana conocida puede usarse para diseñar sondas de oligonucleótidos para seleccionar clones de ADNc de longitud completa que contienen el ADNc completo que codifica para el gen de interés de una biblioteca representativa de muchos de tales clones de ADNc. En otro ejemplo, la secuencia de ADN diana conocida puede usarse para diseñar cebadores de PCR para la amplificación y clonación selectivas del gen de interés a partir del ADN genómico total. Éstos y otros métodos para la clonación y expresión de alto rendimiento son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Por tanto, los datos de secuencias génicas de longitud completa proporcionan automáticamente los medios directos para la producción en paralelo, de alto rendimiento de dianas proteicas, una primera etapa necesaria en cualquier estrategia de selección funcional de alto rendimiento, basada en moléculas.

### C. Selección de estabilidad térmica

Con el fin de realizar un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, es necesario determinar las condiciones de ensayo que son óptimas para llevar a cabo el ensayo. Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos que se pliegan espontáneamente en estructuras tridimensionales, sumamente organizadas, estables. La actividad y las funciones biológicas de una proteína diana, incluyendo prácticamente todas las propiedades catalíticas y de unión específicas que caracterizan la proteína, dependen de su estructura tridimensional.

Prácticamente todos los dominios proteicos activos, plegados se comportan térmicamente como cristales orgánicos que se funden con una transición de fase de pseudoprimer orden, bien definida, cooperativa: es decir, se funden a un estado similar a un líquido orgánico, parcialmente desordenado, con una temperatura de fusión ( $T_m$ ) bien definida que refleja la energía libre de estabilización de la estructura tridimensional de la proteína en las condiciones de disolvente experimentales. La tecnología de desplazamiento térmico en microplaca usa colorantes fluorescentes sensibles al entorno para detectar sensiblemente el proceso de desplegamiento térmico y para monitorizar directamente los efectos sobre la estabilidad de la proteína que surgen de las perturbaciones del entorno de disolvente o a través de la unión de ligandos a la proteína.

La estabilidad del estado plegado tridimensional de una proteína puede perturbarse potencialmente de varias maneras. Una manera es alterar el entorno de disolvente acuoso en el que las moléculas de proteína se pliegan inicialmente a partir de un polímero desorganizado en el estado organizado de manera tridimensional. Cambiando las propiedades de disolvente en masa alrededor de la proteína, puede alterarse la estabilidad del estado plegado con respecto a la

estabilidad del estado desplegado. Esto puede proporcionar una estrategia útil para hallar condiciones óptimas para medir la unión de ligandos y es el principio subyacente a la selección de estabilidad.

#### D. Selección de optimización del ensayo de desplazamiento térmico en microplaca

La selección de optimización del ensayo es un conjunto de condiciones de disolvente y colorantes fluorescentes que se usan con la proteína diana para determinar las condiciones óptimas para realizar el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca. La proteína se somete a una variedad de condiciones en solución y/o a colorantes fluorescentes con el fin de evaluar el comportamiento de la proteína y/o la lectura del ensayo.

Ejemplos de variaciones en las condiciones podrían incluir la adición de disolventes orgánicos, variaciones en el pH, sales, etc. que tienen el potencial de alterar la estabilidad relativa de los estados plegado y desplegado de la proteína. Ejemplos en las variaciones en los colorantes podrían incluir aquellas cuyas diferencias en la carga, polaridad, longitud de onda de excitación, longitud de onda de emisión, intensidad de la señal de fondo u otras propiedades ofrecen ventajas en la precisión de la medición, miniaturización u optimización de la señal con respecto al ruido en condiciones de ensayo específicas. La optimización de las condiciones que facilitan la selección de estabilidad es un proceso empírico y puede practicarse fácilmente por un experto habitual en la técnica.

#### E. Biblioteca de sondas funcionales

Una fracción sustancial de moléculas de proteína que pueden servir como potenciales dianas farmacológicas entran en clases mecanísticas que comparten importantes características. Por ejemplo, muchas enzimas usan ATP como cofactor energético, otras usan nucleótidos de piridina como cofactores, algunas usan ambos como cofactores, etc.

Examinando la bibliografía científica o a través de medios experimentales, es posible compilar un conjunto de sustratos enzimáticos, análogos de sustratos, cofactores, dominios de proteínas adaptadoras, análogos de ácidos nucleicos, polisacáridos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, péptidos efectores u otras moléculas que se ha determinado que se unen específicamente a una clase definida de moléculas de proteína, o en las que se ha adjuntado significación funcional a la unión fuerte a una clase de moléculas conocida funcionalmente.

Tal como se utiliza en el presente documento, una “biblioteca de sondas funcionales” se refiere a una o más moléculas diferentes que se prueban para determinar su capacidad para unirse a una proteína diana y modificar la estabilidad térmica de la proteína en respuesta al desplegamiento térmico. Realizando una prueba de estabilidad térmica (preferiblemente usando la tecnología de ensayo de desplazamiento térmico en microplaca) en la proteína en presencia de cada miembro de la biblioteca de sondas funcionales, pueden incubarse los compuestos con la proteína diana individualmente o en grupos para determinar qué ligandos se unen individualmente o en grupos fuerte y específicamente a la proteína diana.

Ejemplos de moléculas que pueden comprender una biblioteca de sondas funcionales, incluyen, pero no se limitan a los siguientes.

##### 1. Vitaminas y coenzimas

NADH/NAD, NADPH/NADP, ATP/ADP, ATP- $\gamma$ -S, acetyl-CoA, biotina, S-adenosil-metionina, tiamina pirofosfato (TPP), oligosacáridos sulfatados, oligosacáridos de tipo heparina, GTP, GTP- $\gamma$ -S, gamma-S, piridoxal-5-fosfato, flavina mononucleótido (FMN), flavina-adenina dinucleótido (FAD), ácido fólico, ácido tetrahidrofólico, metotrexato, vitamina K<sub>1</sub>, sal de succinato de vitamina E, vitamina D<sub>3</sub>, 25-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>, 1- $\alpha$ -25-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina C, vitamina B<sub>6</sub>, coenzima A, n-butiril-coenzima A, ácido transretinoico y hemo.

##### 2. Grupos funcionales de residuos de aminoácidos y sus miméticos

Elementos estructurales:

Grupos guanidino

Grupos imidazol

Grupos fenilo

Grupos fenólicos

Grupos indol

Cadenas alifáticas

Derivados bloqueados y aminoácidos individuales

## ES 2 273 442 T3

Estructuras de orden superior:

Hormonas peptídicas

5 Vasopresina

Insulina

10 TRH

Corticotropina

Glucagón

15 Dominios SH<sub>2</sub>, dominios SH<sub>3</sub>, dominios de plextrina, etc.

Péptidos bioactivos

20 Lectinas

### 3. *Quelantes de metales*

25 Quelantes de calcio (Calbiochem, San Diego, CA) Quelantes de hierro

### 4. *Iones metálicos*

30 Metales de transición

Calcio, magnesio

### 5. *Hidratos de carbono*

35 Elementos estructurales

Glucosa

40 Galactosa

Xilosa

Biomoléculas de orden superior:

45 Celulosa

Almidón

50 Fructosa

Manosa

Sacarosa

55 Lactosa

Hidratos de carbono bioactivos (disponibles de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

60 6. *Ácidos nucleicos*

Elementos estructurales:

65 Uracilo

Timidina

Citosina

Adenina

5 Guanina

Estructuras de orden superior:

Oligonucleótidos

10 Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Ácido ribonucleico (ARN).

15 Los métodos de la presente invención también pueden usarse para seleccionar proteínas frente a bibliotecas de ácidos nucleicos sintéticos y que se producen de manera natural (por ejemplo, oligonucleótidos) para tratar con sonda diferentes clases de proteínas de unión a ácidos nucleicos. Por ejemplo, existen muchas proteínas de unión a ADN que pueden identificarse por su capacidad para unirse a clases particulares de secuencias de ADN. Pueden adquirirse o sintetizarse bibliotecas grandes que contienen muchas secuencias de ácidos nucleicos diferentes (por ejemplo, los 20 4096 posibles hexámeros sintéticos diferentes). A altas concentraciones, puede detectarse todo o parte del sitio de unión relacionado de proteínas de unión a ácidos nucleicos específica del sitio. En el caso de que una proteína parezca unirse a varias secuencias diferentes, los sitios de unión pueden reconstruirse sintetizando diversas combinaciones de secuencias de ácido nucleico, y luego puede usarse el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, u otro ensayo, para medir las afinidades de unión.

25 Hay muchas proteínas de unión a ADN que pueden identificarse por su capacidad para unirse a clases particulares de secuencias de ADN con menor especificidad. Por ejemplo, se conoce bien que algunos factores de transcripción se unen a una variedad de secuencias ricas en A/T con preferencia a secuencias ricas en G/C. Se sabe que las telomerasas reconocen secuencias ricas en G/C. Se sabe que las helicasas se unen a fragmentos cortos de ADN monocatenario con baja especificidad. Una biblioteca más pequeña, más genérica podría contener los siguientes componentes para detectar estas y otras proteínas de unión a ADN:

- regiones ricas en AT:

35  $d(T)_{32}/d(A)_{32}$

$d(ATAT)_8/d(TATA)_8$

40  $d(AAAT)_8/d(TTTA)_8$

$d(AAATT)_6/d(TTTAA)_6$

$d(AAATTT)_6/d(TTTAAA)_6$

45  $d(AAAATTTT)_4/d(TTTTAAAA)_4$

- regiones ricas en GC:

50  $d(C)_{32}/d(G)_{32}$

$d(GCGC)_8/d(CGCG)_8$

55  $d(GGGCCC)_6/d(CCCGGG)_6$

$d(GGGGCCCC)_4/d(CCCCGGGG)_4$

60 - otras

$d(CA)_{32}/d(GT)_{32}$

$d(CT)_{32}/d(GA)_{32}$

65  $d(AG)_{32}/d(TC)_{32}$

## ES 2 273 442 T3

- Componentes monocatenarios de las secuencias de dúplex anteriores
- d(T)<sub>40</sub>/d(A)<sub>20</sub> (un ejemplo de un fragmento que contiene tanto ADN monocatenario como dúplex)
- 5 - ADN cromosómico humano fragmentado
- “amplificación del genoma completo” aplicada a diferentes cromosomas humanos
- ADN de esperma de salmón fragmentado
- 10 - ADN microbiano fragmentado
- ADN de plásmido superenrollado
- 15 - productos de amplificación por PCR de regiones cromosómicas específicas (por ejemplo, telómeros y centrómeros)
- Otros sitios de reconocimiento conocidos para la transcripción, procesamiento de ARN, transposición.

### 20 7. Lípidos

Elementos estructurales:

25 Colina

Ácido fosfórico

Glicerol

30 Ácido palmítico

Ácido oleico

35 Colesterol

Estructuras de orden superior:

40 Fosfatidilcolina

### 8. Inhibidores enzimáticos

Inhibidores de proteasas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

45 PMSF

Leupeptina

50 Pepstatina A

Bestatina

Péptido aldehído cistatina (inhibidores de cisteína proteasas)

55 Inhibidores de proteínas tirosina cinasas (Calbiochem, San Diego, CA)

Inhibidores de proteínas fosfatasas (Calbiochem, San Diego, CA)

60 Inhibidores de proteínas cinasas (Calbiochem, San Diego, CA)

Activadores de proteínas cinasas (Calbiochem, San Diego, CA)

Inhibidores de fosfodiesterasa (Calbiochem, San Diego, CA)

65 Inhibidores de fosfolipasa

Análogos de estado de transición.

De manera similar, podrían identificarse metaloproteasas de zinc, tales como la enzima convertidora de angiotensina, y carboxipeptidasa, (a) mediante desestabilización con EDTA u ortofenantrolina (quelación de  $Zn^{2+}$ ) y (b) mediante estabilización en presencia de hidroxamatos y fosforamidatos que imitan el estado de transición para la hidrólisis de enlaces peptídicos catalizada por  $Zn^{2+}$ .

La biblioteca de sondas funcionales también puede incluir compuestos esteroideos, hormonas amínicas y compuestos alcaloides.

La biblioteca de sondas funcionales puede ser una biblioteca de fármacos genéricos. Alternativamente, la biblioteca de sondas funcionales puede ser una biblioteca de productos naturales. Por ejemplo, véase la *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs and Cosmetics* (Enciclopedia de componentes naturales comunes usados en alimentos, fármacos y cosméticos), 2ª edición, Leung y Foster, eds., Wiley Interscience (1996).

#### F. Selección de la sonda funcional

Con el fin de optimizar las condiciones que modifican la estabilidad de la proteína, otra manera para afectar a la estabilidad de una proteína plegada es unir específicamente moléculas al estado plegado o desplegado de la proteína. Dado que prácticamente todas las proteínas biológicamente activas se pliegan con estructuras tridimensionales organizadas, la mayor parte del interés acompaña a las moléculas de ligando que se unen a y estabilizan el estado plegado de una proteína.

Tal como se trató anteriormente, una selección de sonda funcional es un ensayo de la capacidad de una multiplicidad de moléculas diferentes en la biblioteca de sondas funcionales para unirse a la proteína diana y modificar la estabilidad de la proteína diana en respuesta al desplegamiento térmico. Usando la tecnología, puede medirse directamente la afinidad de unión de un ligando de molécula pequeña o grande a una proteína diana a través de su efecto sobre la temperatura del punto medio de desplegamiento  $T_m$  (o perfil de desplegamiento térmico) de la proteína. Para moléculas que se unen al estado plegado de la proteína, que incluyen la mayor parte de los ligandos de interés biológico, existe una relación cuantitativa entre la afinidad de unión del ligando y el grado hasta el que se desplaza la  $T_m$  de la proteína en el estado con ligando con respecto a la  $T_m$  de la proteína en el estado sin ligando.

La mayoría de proteínas tienen funciones que se reflejan por su capacidad para unirse a ligandos de molécula pequeña o grande con alta especificidad y alta afinidad. Muchas proteínas pertenecen a clases funcionales (por ejemplo, cinasas, fosfatasas, oxidoreductasas dependientes de piridina nucleótido, etc.) que se unen a cofactores específicos o catalizan reacciones específicas usando un conjunto limitado de mecanismos catalíticos. En consecuencia, las moléculas en una clase funcional dada como las cinasas, que usan ATP como cofactor, se unirán generalmente a un análogo de cofactor de ATP no hidrolizable como AMPNP, una propiedad que será detectable usando los métodos de la presente invención.

Además, muchas proteínas se unirán a una combinación de ligandos o producirán múltiples conjuntos de interacciones con dominios adaptadores biológicos. Hasta el grado en que estas interacciones sean independientes, generalmente producirán perturbaciones aditivas sobre la estabilidad de la forma sin ligando de la proteína.

Cuando una proteína se ha asignado provisionalmente a una clase de proteínas particular, puede volverse a seleccionar la proteína usando una biblioteca de compuestos o moléculas que se sabe que se unen a esa clase de proteínas.

#### G. Espectro de actividad

Tras realizar una prueba de estabilidad térmica (preferiblemente usando una tecnología de ensayo de desplazamiento térmico en microplaca) en la proteína en presencia de cada miembro de la biblioteca de sondas funcionales, puede determinarse qué ligandos se unirán fuerte y específicamente a la proteína diana y modificarán la estabilidad térmica de la proteína diana. La lista de compuestos (es decir, ligandos) que se unen a la proteína diana y modifican la estabilidad térmica de la proteína diana, y las respectivas afinidades de los ligandos por la proteína diana comprenden el espectro de actividad de la proteína diana.

#### H. Lista de espectro de referencia funcional

Tal como se trató anteriormente, una “lista de espectro de referencia funcional” es una lista de clases de proteína diana (incluyendo referencias a bases de datos electrónicas apropiadas), ligandos asociados, y constantes de unión correspondientes, que pueden usarse para clasificar funcionalmente una proteína diana. Alternativamente, la lista de espectro de referencia funcional puede ser un conjunto de uno o más espectros de actividad para una o más proteínas conocidas.

Tal como se trató anteriormente, una “lista de referencia funcional” es una lista de proteínas que comparten una o más características comunes, tal como la unión a un ligando particular, o que muestran una actividad común. En la tabla 1, se facilita un ejemplo de una lista de referencia funcional. Las características compartidas por las proteínas enumeradas en la tabla 1 es que se unen a NAD y muestran actividad deshidrogenasa. La lista de proteínas en la tabla 1 ilustra cómo puede discriminarse una clase funcionalmente relacionada de proteínas según su capacidad para unirse a diferentes conjuntos de ligandos. Por ejemplo, una proteína que se une a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD),

NADPH o NADH, y malato, tal como se muestra por la capacidad de estos compuestos para modificar la estabilidad térmica de la proteína, podría clasificarse como malato deshidrogenasa. Como otro ejemplo, una proteína para la que se modifica la estabilidad térmica mediante etanol y NAD podría clasificarse como una alcohol deshidrogenasa.

5

TABLA 1

10

15

20

25

30

35

40

45

50

<b>Lista de referencia funcional</b>	
	Aldehído deshidrogenasa de clase 3
	$\delta$ -alcohol deshidrogenasa humana
	$\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
	Malato deshidrogenasa
	Alcohol deshidrogenasa hepática equina
	Alcohol deshidrogenasa
	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
	$\beta$ -alcohol deshidrogenasa humana
	Dihidropteridina reductasa
	D-2-hidroxiisocaproato deshidrogenasa
	Enoil-ACP reductasa de <i>Brassica napus</i>
	7- $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
	Holo-D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
	Glutación reductasa
	D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
	Glutación reductasa
	3-isopropilmalato deshidrogenasa
	$\beta$ -3-alcohol deshidrogenasa humana
	Isocitrato deshidrogenasa
	Alcohol deshidrogenasa hepática equina
	Lactato deshidrogenasa M4
	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
	Udp-Gal 4-epimerasa
	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa
	$\chi\chi$ -alcohol deshidrogenasa hepática equina
	Alfa-20- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
	L-lactato deshidrogenasa
	NADH peroxidasa

### I. Comparador del espectro de actividad

55

Tal como se utiliza en el presente documento, un “comparador del espectro de actividad” es un medio computacional o gráfico mediante el cual puede compararse el espectro de actividad, derivado de la observación de los efectos de la biblioteca de sondas funcionales sobre la proteína diana, con la lista de espectro de referencia funcional. Por ejemplo, el comparador del espectro de actividad puede ser un software de hoja de cálculo que está fácilmente disponible para los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, puede usarse Microsoft Excel (Microsoft Inc., Redmond, WA).

60

### J. Clasificación funcional

65

En los métodos de la presente invención, la función de la proteína está indicada por el patrón de ligandos que se unen a la proteína. Usando el comparador del espectro de actividad para comparar el espectro de actividad de la diana observada con la lista de espectro de referencia funcional, la proteína diana puede clasificarse funcionalmente según los datos relacionales obtenidos para proteínas conocidas. Por ejemplo, la proteína puede clasificarse según el conjunto de ligandos que estabilizan la proteína frente al desplegamiento térmico.

Por tanto, comparando una representación del grado en el que cada una de una multiplicidad de moléculas o compuestos modifican la estabilidad térmica de una proteína (y por tanto, se unen a la proteína) con una representación del grado en el que las mismas moléculas modifican la estabilidad térmica de una proteína conocida (y por tanto, se unen a la proteína), puede deducirse la clase de proteínas a la que pertenece la proteína.

Alternativamente, la proteína puede clasificarse comparando el espectro de actividad de la proteína diana con los espectros de actividad de proteínas conocidas, clasificadas. Por ejemplo, pueden consultarse bases de datos tales como PDR en la red, Medline, SciFinder, STNExpress, bases de datos internas, NAPRALERT en la red, la *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs and Cosmetics*, 2ª edición, Leung y Foster, eds., Wiley Interscience (1996) y el *Handbook of Enzyme Inhibitors*, parte A y B, 2ª edición, Ellner, ed., ECH (1990).

#### *El ensayo de desplazamiento térmico en microplaca y aparato*

En principio, cualquier medio de medición de los efectos de incubar una proteína en presencia de un panel de ligandos sonda para determinar qué ligandos sonda pueden afectar a la estabilidad de la proteína diana bastará como medio para clasificar funcionalmente proteínas. Preferiblemente, se usa el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca para determinar el efecto de una o más moléculas o ligandos sobre la estabilidad térmica de una proteína diana. El ensayo de desplazamiento térmico en microplaca es una tecnología directa y cuantitativa para someter a ensayo el efecto de una o más moléculas sobre la estabilidad térmica de una proteína diana.

El ensayo de desplazamiento térmico se basa en el cambio dependiente de ligando en la curva de desplegamiento térmico de un receptor, tal como una proteína o un ácido nucleico. Cuando se calienta en un intervalo de temperaturas, un receptor se desplegará. Representando el grado de desplegamiento como una función de la temperatura, se obtiene una curva de desplegamiento térmico para el receptor. Un punto de referencia útil en la curva de desplegamiento térmico es el punto medio de la temperatura ( $T_m$ ), la temperatura a la cual la mitad de las moléculas del receptor están desplegadas.

Los ensayos de desplazamiento térmico se basan en el cambio dependiente de ligando en el punto medio para las curvas de desplegamiento inducido térmicamente,  $\Delta T_m$ , para el complejo ligando-receptor (con respecto al receptor no complejo) como un observable experimental que lo relaciona directamente con la afinidad de unión del ligando,  $K_d$ , debido al acoplamiento de las funciones de energía libre de desplegamiento del receptor y unión del ligado (Schellman, J. A., *Biopolymers* 15:999-1000 (1976); Brandts, J. F., *Biochemistry* 29:6927-6940 (1990)). Esta estrategia de selección física térmica utiliza la estabilidad térmica de las mezclas de ligando-receptor como un indicador de la afinidad de unión por las interacciones ligando-receptor. Estos ensayos se han llevado a cabo tradicionalmente de uno en uno en calorímetros diferenciales de barrido (DSC) que monitorizan el cambio en la capacidad calorífica a medida que las proteínas experimentan transiciones de desplegamiento inducidas por la temperatura (Brandts *et al.*, *Biochemistry* 29:6927-6940 (1990); y Weber, P. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2717-2724 (1994)). Alternativamente, pueden realizarse ensayos de desplazamiento térmico, de nuevo de uno en uno, empleando instrumentos ópticos de temperatura regulada que monitorizan los cambios de la absorbancia (Chavan, A. J. *et al.*, *Biochemistry* 33:7193-7202 (1994)); la fluorescencia (Chavan *et al.*, *Biochemistry* 33:7193-7202 (1994); o el dicroísmo circular (Bouvier, M. *et al.*, *Science* 265:398-402 (1994); Morton, A. *et al.*, *Biochemistry* 34:8564-8575 (1995)) que se producen para las transiciones de desplegamiento inducidas térmicamente de las proteínas.

Existen muchas ventajas al usar el ensayo de desplazamiento térmico puesto que no requiere compuestos marcados radiactivamente, ni marcadores fluorescentes u otros cromóforos para ayudar en la monitorización de la unión. El ensayo se aprovecha del desplegamiento térmico de las biomoléculas, un proceso fisicoquímico general intrínseco a muchas, si no todas, las biomoléculas dianas farmacológicas. La aplicabilidad general es un aspecto importante de este ensayo puesto que evita la necesidad de inventar un nuevo ensayo cada vez que se vuelve disponible una nueva proteína receptora terapéutica. El ensayo es particularmente muy adecuado para medir la unión de ligandos a dianas no enzimáticas, por ejemplo, interacciones factor de crecimiento/receptor, en las que no es posible normalmente un ensayo espectrofotométrico. Sin embargo, la configuración de ensayo único de los métodos de desplazamiento térmico, tal como se realizan convencionalmente, ha limitado la utilidad de esta técnica, especialmente para la selección de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos.

Se ha podido acelerar el procedimiento de selección de proteína/ligando desarrollando una estrategia de selección de ligando-receptor de alto rendimiento generalmente aplicable en un formato de placa de 96 pocillos (o mayor densidad) que identificará u ordenará compuestos líder basándose en la estabilización termodinámica de los complejos ligando-receptor.

La unión de ligandos estabiliza el receptor (Schellman, J., *Biopolymers* 14:999-1018 (1975)). El grado de unión y la energía libre de interacción siguen recorridos paralelos como una función de la concentración de ligando (Schellman, J., *Biophysical Chemistry* 45:273-279 (1993); Barcelo, F *et al.*, *Chem. Biol. Interactions* 74:315-324 (1990)). Como resultado de la estabilización por el ligando, se requiere más energía (calor) para desplegar el receptor. Por tanto, la unión del ligando desplaza la curva de desplegamiento térmico. Es decir, la unión del ligando aumenta la estabilidad térmica de la proteína. Esta propiedad puede aprovecharse para determinar si un ligando se une a un receptor: un cambio, o "desplazamiento" en la curva de desplegamiento térmico, y por tanto en la  $T_m$ , sugiere que un ligando se une al receptor.

## ES 2 273 442 T3

La base termodinámica para el ensayo de desplazamiento térmico se ha descrito por Schellman, J. A. (*Biopolymers* 15:999-1000 (1976)), y también por Brandts *et al* (*Biochemistry* 29:6927-6940 (1990)). Los estudios de calorimetría diferencial de barrido por Brandts *et al* (*Biochemistry* 29:6927-6940 (1990)) han mostrado que para sistemas de unión fuerte de estequiometría 1:1, en los que hay una transición de desplegamiento, puede estimarse la afinidad de unión a  $T_m$  a partir de la siguiente expresión:

$$K_L^{T_m} = \frac{\exp\left\{-\frac{\Delta H_u^{T_0}}{R}\left[\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T_0}\right] + \frac{\Delta C_{pu}}{R}\left[\ln\left(\frac{T_m}{T_0}\right) + \frac{T_0}{T_m} - 1\right]\right\}}{L_{T_m}} \quad (\text{ecuación 1})$$

en la que

$K_L^{T_m}$  = la constante de asociación del ligando a  $T_m$ ;

$T_m$  = el punto medio de la transición de desplegamiento de la proteína en presencia del ligando;

$T_0$  = el punto medio para la transición de desplegamiento en ausencia del ligando;

$\Delta H_u^{T_0}$  = la entalpía del desplegamiento de la proteína en ausencia del ligando a  $T_0$ ;  $\Delta C_{pu}$  = el cambio en la capacidad calorífica con el desplegamiento de la proteína en ausencia del ligando;

$[L_{T_m}]$  = la concentración de ligando libre a  $T_m$ ; y

$R$  = la constante de los gases.

Se encontró que esta expresión era útil para el diseño basado en la estructura de ligandos de azobenceno para estreptavidina, en el que los barridos de DSC de diversas mezclas de ligando/estreptavidina facilitaron la medición de la afinidad de unión a  $T_m$  (Weber, P. *et al.*, *J Am. Chem. Soc* 116:2717-2724 (1994)). Estas mediciones se comprobaron adicionalmente realizando experimentos de calorimetría isotérmica de titulación o mezclado que produjeron afinidades de unión que concuerdan con las determinadas mediante DSC. La facilidad y reproducibilidad de usar el desplegamiento térmico de una proteína para estimar la afinidad de unión de ligandos recalzó el potencial de extender adicionalmente este enfoque para convertirse en una herramienta de descubrimiento de fármacos más general.

Los parámetros  $\Delta H_u$  y  $\Delta C_{pu}$  se observan normalmente a partir de experimentos de DSC y son específicos para cada proteína. Las mediciones calorimétricas de  $\Delta H_u$  y  $\Delta C_{pu}$  son las estimaciones más exactas de estos parámetros porque los calorímetros recogen normalmente datos de desplegamiento cada 0,1°C. Sin embargo, los parámetros  $\Delta H_u$  y  $\Delta C_{pu}$ , también pueden estimarse en el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, en cuyo caso el  $\Delta H_u$  no será una entalpía calorimétrica sino una entalpía de van't Hoff comparable basada en los datos de desplegamiento recogidos cada 2,0°C usando el protocolo actual. Además, incluso en ausencia de datos óptimos para  $\Delta H_u$  y  $\Delta C_{pu}$ , estos parámetros son constantes específicas para la proteína implicada en la selección de compuestos y, por tanto, estarán inalterados de pocillo en pocillo, no dando como resultado una influencia en los cálculos de los valores relativos de las afinidades de unión, es decir,  $K_L$  y  $T_m$ .

Además de los parámetros  $\Delta H_u$  y  $\Delta C_{pu}$ , también es necesario obtener estimaciones de  $T_m$  y  $T_0$  para resolver  $\Delta H_u^{T_0}$  en la ecuación 1. esto se logra a través del uso de ajustes por ordenador de mínimos cuadrados no lineales de los datos de desplegamiento para cada pocillo individual usando la siguiente ecuación:

$$y(T) = y_u + \frac{(y_f - y_u)}{1 + \exp\left\{\left[\frac{-\Delta H_u}{R}\right]\left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right] + \left[\frac{\Delta C_{pu}}{R}\right]\left[\left(\frac{T_m}{T} - 1\right) + \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right]\right\}}$$

La ecuación 2 emplea cinco parámetros de ajuste,  $\Delta H_u$ ,  $\Delta C_{pu}$ ,  $T_m$ ,  $y_f$  e  $y_u$ , en la que  $y_f$  e  $y_u$  son los niveles de fluorescencia antes de la transición y después de la transición, respectivamente. Los ajustes por ordenador se determinan mediante la flotación de estos parámetros para alcanzar el mínimo de la suma de los cuadrados de los errores residuales empleando el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Los valores de  $T_0$  se obtienen para pocillos que no contienen ligando añadido y se fijan como referencia. Está fácilmente disponible software de ajuste de curvas disponible comercialmente para un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, puede usarse Kaleidograph 3.0 (Synergy, Reading, PA).

También es posible calcular la constante de equilibrio de la asociación del ligando a cualquier temperatura,  $K_L$  y  $T$ , la constante de equilibrio de la asociación del ligando a  $T_m$ , usando la ecuación 3, si se conocen los datos de la calorimetría de mezclado para la entalpía de unión a  $T$ ,  $\Delta H_L$ , y el cambio en la capacidad calorífica con la unión del ligando,  $\Delta C_{pL}$  (Brandts & Lin, 1990).

**Ecuación 3**

$$K_T^L = K_{L^*}^{T_m} \exp \left\{ - \frac{\Delta H_L^T}{R} \left[ \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right] + \frac{\Delta C_{pL}}{R} \left[ \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) + \frac{T}{T_m} + 1 \right] \right\}$$

5

en la que

K = la constante de asociación del ligando a cualquier temperatura, T.

10

$K_{L^*}^{T_m}$  = la constante de asociación del ligando a  $T_m$ .

$T_m$  = el punto medio para la transición de desplegamiento de la proteína en presencia del ligando.

15

$\Delta H_L^T$  = la entalpía de la unión del ligando a la temperatura, T.

$\Delta C_{pL}$  = el cambio en la capacidad calorífica con la unión del ligando.

R = constante de los gases.

20

El segundo término exponencial de la ecuación 3 es normalmente lo suficientemente pequeño para ignorarse de modo que pueden obtenerse valores aproximados de  $K_L$  y T usando sólo el primer término exponencial, y la ecuación 3 se reduce a la ecuación 4:

25

**Ecuación 4**

$$K_T^L = K_{L^*}^{T_m} \exp \left[ - \frac{\Delta H_L^T}{R} \left[ \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right] \right]$$

30

El parámetro  $\Delta H_L^T$  puede medirse usando una calorimetría isotérmica de titulación, usando un dispositivo calorimétrico tal como el Omega (MicroCal; Northampton, MA). Cuando no están disponibles datos calorimétricos, puede estimarse que  $\Delta H_L^T$  es de aproximadamente -10,0 kcal/mol, que es una entalpía de unión promedio (Wiseman *et al.*, *Anal. Biochem.* 179:131-137 (1989)).

35

Preferiblemente, se usa espectrometría de fluorescencia para monitorizar el desplegamiento térmico. La metodología de fluorescencia es más sensible que la metodología de absorción. El uso de la fluorescencia de la proteína intrínseca y moléculas de sonda de fluorescencia en experimentos de espectroscopía de fluorescencia se conoce bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bashford, C. L. *et al.*, *Spectrophotometry and Spectrofluorometry: A Practical approach*, IRL Press Ltd., pub., págs. 91-114 (1987); Bell, J.E., *Spectroscopy in Biochemistry*, Vol. I, CRC Press, pub., págs. 155-194 (1981); Brandts, L. *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 41:843 (1972).

40

El ensayo de desplazamiento térmico en microplaca se describe adicionalmente en la solicitud de patente de los EE.UU. número 08/853.464 presentada el 9 de mayo de 1997, y en la solicitud de patente internacional número PCT/US97/08154 (publicada el 13 de noviembre de 1997 como la publicación número WO 97/42500), que se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad.

45

Pueden tomarse lecturas espectrales, preferiblemente lecturas de fluorescencia, de todas las muestras en un soporte simultáneamente. Alternativamente, pueden tomarse lecturas en muestras en grupos de al menos dos cada vez.

50

Puede usarse un sistema de obtención de imágenes de fluorescencia, por ejemplo, un sistema de obtención de imágenes de emisión de fluorescencia, para monitorizar el desplegamiento térmico de una molécula diana o un receptor. Los sistemas de obtención de imágenes de fluorescencia se conocen bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el sistema de análisis y documentación de geles ALPHAIMAGER™ (Alpha Innotech, San Leandro, CA) emplea una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) de alto rendimiento con una resolución de 768 x 494 píxeles. La cámara de dispositivo de carga acoplada funciona en conjunto con un ordenador y se analizan las imágenes con software Image analysis™. El CHEMIIMAGER™ (Alpha Innotech) es un dispositivo de carga acoplada refrigerado que realiza todas las funciones del ALPHAIMAGER™ y además captura imágenes de muestras quimioluminiscentes y otras muestras de baja intensidad. El dispositivo de carga acoplada CHEMIIMAGER™ incluye un procesador Pentium (disco duro de 1,2 Gb, RAM de 16 Mb), software de análisis AlphaEase™, una cámara hermética a la luz y un transiluminador de luz blanca y UV. Por ejemplo, el sistema de obtención de imágenes confocal láser UV/visible MRC-1024 (BioRad, Richmond, CA) facilita la obtención de imágenes simultánea de más de un fluoróforo a través de un amplio intervalo de longitudes de onda de iluminación (de 350 a 700 nm). El sistema de documentación de geles fluorescente Gel Doc 1000 (BioRad, Richmond, CA) puede visualizar claramente áreas de muestra tan grandes como de 20 x 20 cm, o tan pequeñas como de 5 x 4 cm. Al menos dos microplacas de 96 pocillos pueden adaptarse a un área de 20 x 20 cm. El sistema Gel Doc 1000 también facilita la realización de experimentos basados en el tiempo.

65

## ES 2 273 442 T3

Puede usarse un sistema de obtención de imágenes de fluorescencia, por ejemplo, un sistema de obtención de imágenes de emisión de fluorescencia, para monitorizar el desplegamiento del receptor en un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca. En esta realización, se calienta simultáneamente una pluralidad de muestras entre 25 y 110°C. Se toma una lectura de emisión de fluorescencia para cada una de la pluralidad de muestras simultáneamente. Por ejemplo, puede monitorizarse simultáneamente la fluorescencia en cada pocillo de una microplaca de 96 o 384 pocillos. Alternativamente, pueden tomarse lecturas de fluorescencia continua y simultáneamente para cada muestra. A temperaturas inferiores, todas las muestras manifiestan un bajo nivel de fluorescencia. Según se aumentan las temperaturas, aumenta la fluorescencia en cada muestra. Los pocillos que contienen ligandos que se unen a la molécula diana con alta afinidad desplazan la curva de desplegamiento térmico a temperaturas superiores. Como resultado, los pocillos que contienen ligandos que se unen a la molécula diana con alta afinidad fluorescen menos, a una temperatura dada superior a la  $T_m$  de la molécula diana en ausencia de cualquier ligando, que los pocillos que no contienen ligandos de alta afinidad. Si se calientan las muestras en etapas incrementales, se obtienen imágenes de la fluorescencia de todas de la pluralidad de muestras simultáneamente en cada etapa de calentamiento. Si se calientan las muestras continuamente, se obtienen imágenes simultáneamente de la emisión de fluorescencia de todas de la pluralidad de muestras durante el calentamiento.

Puede realizarse un ensayo de desplazamiento térmico en un volumen de volúmenes de 100  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, por los siguientes motivos, es preferible realizar un ensayo de desplazamiento térmico en un volumen de 1-10  $\mu\text{L}$ . En primer lugar, se requiere aproximadamente de 10 a 100 veces menos de proteína para el ensayo miniaturizado. Por tanto, sólo se requieren  $\sim 4$  a 40 pmoles de proteína (de 0,1  $\mu\text{g}$  a 1,0  $\mu\text{g}$  para una proteína de 25 kDa) para el ensayo (es decir, un volumen de trabajo de 1 a 10  $\mu\text{L}$  con una concentración de molécula diana de aproximadamente 1 a aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ ). Por tanto, puede usarse 1 mg de proteína para llevar a cabo de 1.000 a 10.000 ensayos en el formato miniaturizado. Esto es particularmente ventajoso cuando la molécula diana está disponible en cantidades mínimas.

En segundo lugar, se requiere de 10 a 100 veces menos de ligando para el ensayo miniaturizado. Esta ventaja es muy importante para los investigadores cuando seleccionan bibliotecas combinatorias valiosas para las que se sintetizan los compuestos de la biblioteca en cantidades mínimas. En el caso de  $\alpha$ -trombina humana, la concentración de ligando ideal es de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ , que se traduce en 25-250 pmoles de ligando, o 10-100 ng (suponiendo un PM de 500 Da) de ligando por ensayo en el formato miniaturizado.

En tercer lugar, el menor volumen de trabajo permite la posibilidad de usar matrices más grandes de ensayos porque el ensayo miniaturizado puede adaptarse a un área mucho más pequeña. Por ejemplo, las placas de 384 pocillos (matriz de 16 x 24) o de 864 pocillos (matriz de 24 x 36) tienen las mismas dimensiones que las placas de 96 pocillos (8,5 x 12,5 cm). La placa de 384 pocillos y la placa de 864 pocillos permiten al usuario realizar de 4 a 9 veces más ensayos, respectivamente, de los que puede realizar usando una placa de 96 pocillos. Alternativamente, pueden usarse placas con más pocillos, tales como placas de 1536 pocillos (matrices de 32 x 48; Matrix Technologies Corp.). Una placa de 1536 pocillos facilitará dieciséis veces la producción obtenida por una placa de 96 pocillos.

Por tanto, usando la configuración de placa de 1536 pocillos, puede aumentarse la velocidad de ensayo aproximadamente 16 veces, con respecto a la velocidad a la que puede realizarse el ensayo usando el formato de 96 pocillos. La disposición de la matriz de ensayo de 8 x 12 (en una placa de 96 pocillos) facilita la realización de 96 ensayos/h o aproximadamente 2300 ensayos/24 horas. La disposición de ensayo en matriz de 32 x 48 facilita la realización de aproximadamente 1536 ensayos/h, o pueden realizarse aproximadamente 37.000 ensayos/24 horas usando una configuración de matriz de ensayo de 32 x 48.

El volumen de ensayo puede ser de 1-100  $\mu\text{L}$ . Preferiblemente, el volumen de ensayo es de 1-50  $\mu\text{L}$ . Más preferiblemente, el volumen de ensayo es de 1-25  $\mu\text{L}$ . Todavía más preferiblemente, el volumen de ensayo es de 1-10  $\mu\text{L}$ . Todavía más preferiblemente, el volumen de ensayo es de 1-5  $\mu\text{L}$ . Todavía más preferiblemente, el volumen de ensayo es de 5  $\mu\text{L}$ . Lo más preferiblemente, el volumen de ensayo es de 1  $\mu\text{L}$  o 2  $\mu\text{L}$ .

Alternativamente, el ensayo se realiza en placas de fondo en V de policarbonato, poliestireno o polipropileno o placas de cavidades ("dimple plates"). Una placa de cavidades es una placa que contiene una pluralidad de pocillos de fondo redondo que albergan un volumen total de 15  $\mu\text{L}$ .

Se realiza el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca mediante (a) poner en contacto una proteína con una o más de una multiplicidad de moléculas diferentes en cada uno de una multiplicidad de recipientes; (b) calentar la multiplicidad de recipientes de la etapa (a), preferiblemente de manera simultánea; (c) medir en cada uno de los recipientes un cambio físico asociado con el desplegamiento térmico de la molécula diana que resulta del calentamiento; (d) generar una curva de desplegamiento térmico para la molécula diana como una función de la temperatura para cada uno de los recipientes; y (e) comparar cada una de las curvas de desplegamiento de la etapa (d) con (1) cada una de las otras curvas de desplegamiento térmico y con (2) la curva de desplegamiento térmico obtenida para la proteína en ausencia de cualquiera de la multiplicidad de moléculas diferentes; y (f) determinar si cualquiera de la multiplicidad de moléculas diferentes modifica la estabilidad térmica de la proteína, en la que una modificación en la estabilidad térmica está indicada por un desplazamiento en la curva de desplegamiento térmico.

La etapa (d) puede comprender además determinar una temperatura del punto medio ( $T_m$ ) a partir de la curva de desplegamiento térmico. La etapa (e) puede comprender además comparar la  $T_m$  de cada una de las curvas de

## ES 2 273 442 T3

despliegamiento de la etapa (d) con (1) la  $T_m$  de cada una de las otras curvas de despliegamiento térmico y con (2) la  $T_m$  de la curva de despliegamiento térmico obtenida para la proteína diana en ausencia de cualquiera de las moléculas diferentes.

5 Para practicar los métodos de la presente invención usando obtención de imágenes o espectroscopía de fluorescencia, la etapa (a) comprende poner en contacto la proteína diana con una molécula de sonda de fluorescencia presente en cada uno de la multiplicidad de recipientes y la etapa (c) comprende (c1): excitar la molécula de sonda de fluorescencia, en cada uno de la multiplicidad de recipientes, con luz; y (c2) medir la fluorescencia de cada uno de la multiplicidad de recipientes. Puede medirse la fluorescencia, por ejemplo, la emisión de fluorescencia, de cada uno de la multiplicidad de recipientes, en un recipiente cada vez, de un subconjunto de la multiplicidad de recipientes simultáneamente, o de cada uno de la multiplicidad de recipientes simultáneamente.

10 Para generar un espectro de actividad, se ordenan las moléculas según el grado en el que estabilizan la proteína diana frente al despliegamiento térmico. Tras ordenarse las moléculas, se compara el espectro de actividad de la proteína diana para las moléculas en la biblioteca de sondas funcionales con una o más listas de espectro de referencia funcional.

15 Se conocen bien los aparatos de calentamiento adecuados para practicar los métodos de la presente invención por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, puede usarse el ciclador con temperatura en gradiente ROBOCYCLER® (Stratagene, La Jolla, CA) (véase la patente de los EE.UU. número 5.525.300). Alternativamente, puede usarse un bloque térmico con gradiente de temperatura (véase la patente de los EE.UU. número 5.255.976). Puede leerse la fluorescencia usando cualquier dispositivo de espectroscopía de fluorescencia adecuado. Por ejemplo, puede usarse el aparato CytoFluor II (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA).

20 El elemento con el que se calienta el soporte de muestra puede ser cualquier elemento que puede calentar muestras rápidamente y de manera reproducible. En la presente invención, se calienta simultáneamente una pluralidad de muestras. La pluralidad de muestras puede calentarse en un único elemento calefactor. Alternativamente, la pluralidad de muestras puede calentarse hasta una temperatura dada en un elemento calefactor, y luego trasladarse a otro elemento calefactor para calentarse hasta otra temperatura. El calentamiento puede lograrse en intervalos regulares o irregulares. Para generar una curva de despliegamiento suave, las muestras deben calentarse uniformemente, en intervalos de 1 o 2°C. El intervalo de temperatura a través del cual pueden calentarse las muestras es de desde 4 hasta 110°C. Se toman lecturas espectrales, y particularmente lecturas de fluorescencia, tras cada etapa de calentamiento. Las muestras pueden calentarse y leerse mediante el dispositivo espectral, por ejemplo, una cámara de obtención de imágenes de fluorescencia, de manera continua. Alternativamente, tras cada etapa de calentamiento, pueden enfriarse las muestras hasta una temperatura inferior antes de tomar las lecturas espectrales. Preferiblemente, se calientan las muestras continuamente y se toman las lecturas espectrales cuando las muestras se están calentando.

25 Pueden tomarse lecturas espectrales, por ejemplo de fluorescencia, en todas las muestras en el soporte simultáneamente. Alternativamente, pueden tomarse lecturas en las muestras en grupos de al menos de dos cada vez. Finalmente, pueden tomarse las lecturas de una muestra cada vez.

30 Preferiblemente, el instrumento usado para realizar el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca consiste en un dispositivo de barrido y un sistema de software de control. Puede detectarse la fluorescencia, por ejemplo la emisión de fluorescencia, mediante un tubo fotomultiplicador en una cámara de detección opaca. El software se ejecuta en un ordenador personal y la acción del dispositivo de barrido se controla mediante el software.

35 En la figura 2, se muestra un aparato 200 a modo de ejemplo. Un mecanismo X-Y de precisión barre la microplaca con una sonda de fibra óptica sensible para cuantificar la fluorescencia en cada pocillo. La microplaca y las muestras pueden permanecer inmóviles durante el barrido de cada fila de las muestras, y entonces se mueve la sonda de fibra óptica a la siguiente fila. Alternativamente, la microplaca y las muestras pueden moverse a la posición de una nueva fila de muestras bajo la sonda de fibra óptica. El sistema de barrido puede barrer 96 muestras en menos de un minuto. El dispositivo de barrido puede contener una pluralidad de filtros de excitación y una pluralidad de filtros de emisión para medir los fluoróforos más comunes. Por tanto, pueden tomarse lecturas de emisión de fluorescencia en una muestra cada vez, o en un subconjunto de muestras simultáneamente.

40 El elemento o bloque conductor de calor en el que se calienta el soporte de muestra puede ser cualquier elemento que puede calentar muestras rápidamente y de manera reproducible. Puede calentarse la pluralidad de muestras en un único elemento calefactor. Alternativamente, puede calentarse la pluralidad de muestras hasta una temperatura dada en un elemento calefactor, y luego trasladarse a otro elemento calefactor para calentarse hasta otra temperatura. El calentamiento puede lograrse en intervalos regulares o irregulares. Para generar una curva de despliegamiento suave, las muestras deben calentarse uniformemente, en intervalos de 1 o 2°C. El intervalo de temperatura a través del cual pueden calentarse las muestras es de desde 4 hasta 110°C.

45 Preferiblemente, se calienta simultáneamente una pluralidad de muestras. Si se calientan las muestras en intervalos de temperatura diferenciados, de manera escalonada, se toman lecturas espectrales tras cada etapa de calentamiento. Alternativamente, tras cada etapa de calentamiento, pueden enfriarse las muestras hasta una temperatura inferior antes de tomar las lecturas espectrales. Alternativamente, las muestras pueden calentarse de manera continua y se toman las lecturas espectrales durante el calentamiento.

## ES 2 273 442 T3

El aparato de ensayo puede configurarse de modo que contenga un único bloque conductor de calor. Alternativamente, el aparato de ensayo puede configurarse de modo que contenga una pluralidad de bloques conductores de calor sobre una plataforma móvil. La plataforma puede ser una plataforma trasladable que puede trasladarse, por ejemplo, mediante un dispositivo de deslizamiento lineal accionado por un servomotor. Un dispositivo de deslizamiento lineal a modo de ejemplo es el modelo SA A5M400 (IAI America, Torrance, CA). En esta realización, el sensor recibe emisiones espectrales de cada una de las muestras en un bloque conductor de calor dado. La plataforma se traslada entonces para situar otro bloque conductor de calor y sus muestras acompañantes bajo el sensor de modo que reciba las emisiones espectrales de cada una de las muestras en ese bloque calefactor. La plataforma se traslada hasta que se reciben las emisiones espectrales de las muestras en todos los bloques conductores de calor.

Alternativamente, la plataforma puede ser una plataforma rotatoria, tal como se muestra en la figura 2, que puede rotarse, por ejemplo, mediante un eje accionado por un servomotor. En esta última realización, el sensor recibe las emisiones espectrales de cada una de las muestras en un bloque conductor de calor dado. La plataforma se rota entonces para situar otro bloque conductor de calor y sus muestras acompañantes bajo el sensor de modo que reciba las emisiones espectrales de cada una de las muestras en ese bloque calefactor. La plataforma se rota hasta que se reciben las emisiones espectrales de las muestras en todos los bloques conductores de calor.

En el aparato 200, se monta una pluralidad de bloques 204 conductores de calor, cada uno de los cuales incluye una pluralidad de pocillos para una pluralidad de muestras 210, sobre una plataforma o carrusel 206 rotatorio. La plataforma o carrusel 206 puede componerse de un material conductor de calor, tal como el material del que se compone el bloque 204 conductor de calor. El eje 208 está conectado de manera que puede rotar a una base 202. La plataforma 206 rotatoria está montada axialmente para rotar alrededor del eje 208. La rotación del eje 208 está controlada por un servocontrolador 210. El servocontrolador 210 está controlado por un controlador 250 informático de manera bien conocida por el experto en las técnicas pertinentes. El controlador 250 informático hace que el servocontrolador 210 rote el eje 208 rotando así la plataforma 206 rotatoria. De esta manera, los bloques 204 conductores de calor se sitúan consecutivamente bajo la sonda 212 de fibra óptica.

Cada uno de la pluralidad de bloques 204 conductores de calor puede controlarse independientemente mediante el controlador 214 de temperatura. Por tanto, la temperatura de un primer bloque 204 conductor de calor puede ser superior o inferior a la temperatura de un segundo bloque 204 conductor de calor. De manera similar, la temperatura de un tercer bloque 204 conductor de calor puede ser superior o inferior que la temperatura de un primer o segundo bloque 204 conductor de calor.

El controlador 214 de temperatura está conectado a un bloque 204 conductor de calor mediante una conexión 230 termoelectrónica. Bajo la acción del controlador 214 de temperatura, puede aumentarse, disminuirse o mantenerse constante la temperatura del bloque 204 conductor de calor. El controlador 214 de temperatura puede configurarse para ajustar la temperatura de la plataforma 206 rotatoria. En tal configuración, cuando se calienta la plataforma 206 rotatoria, también se calientan los bloques 204 conductores de calor. Alternativamente, la temperatura de cada uno de los bloques 204 conductores de calor puede controlarse mediante un sistema de agua circulante tal como el indicado anteriormente. Particularmente, la temperatura del bloque 204 conductor de calor puede cambiarse por el controlador 214 de temperatura según un perfil de temperatura predeterminado. Preferiblemente, el controlador 214 informático de temperatura se pone en práctica usando un sistema informático.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “perfil de temperatura” se refiere a un cambio en la temperatura con el tiempo. El término “perfil de temperatura” engloba los cambios continuos, ascendentes o descendentes, en la temperatura, tanto cambios lineales como no lineales. El término también engloba cualquier protocolo de cambio de temperatura gradual, incluyendo protocolos caracterizados por aumentos o disminuciones incrementales en la temperatura, aumentos o disminuciones de la temperatura durante los cuales los aumentos o disminuciones están interrumpidos por periodos durante los cuales la temperatura se mantiene constante. En el aparato mostrado en la figura 2, el perfil de temperatura puede predeterminarse programando el controlador 214 informático de temperatura. Por ejemplo, los perfiles de temperatura pueden almacenarse en un dispositivo de memoria del controlador 214 de temperatura, o introducirse en el controlador 214 de temperatura por un operario.

El aparato 200 de ensayo incluye también una fuente 218 luminosa para emitir una longitud de onda de luz de excitación. La luz de excitación procedente de la fuente 218 luminosa excita las muestras 216 con la luz de excitación. Puede usarse cualquier fuente luminosa adecuada. La luz de excitación produce una emisión espectral por parte de las muestras 216. La emisión espectral puede ser radiación electromagnética de cualquier longitud de onda en el espectro electromagnético. Preferiblemente, la emisión espectral es luz fluorescente, ultravioleta o visible. Lo más preferiblemente, la emisión espectral es emisión de fluorescencia.

Un sensor está unido de manera que puede separarse a una armadura 226 de sensor. Un sensor a modo de ejemplo es una sonda 212 de fibra óptica. La sonda 212 de fibra óptica incluye un cable de fibra óptica que puede transmitir luz de excitación a las muestras 216, y un cable de fibra óptica que puede recibir la emisión espectral procedente de las muestras 216. La radiación electromagnética se transmite desde la fuente 218 de luz de excitación hasta la sonda 212 de fibra óptica mediante el cable 228 de fibra óptica de entrada de luz de excitación.

Un servocontrolador 258 de filtro de luz de excitación controla la apertura del filtro 256 de luz de excitación. La fuente 218 de luz de excitación y el servocontrolador 258 de filtro de luz de excitación están conectados operativamente

## ES 2 273 442 T3

y de manera comunicada al controlador 254 informático de luz de excitación. El controlador 254 informático controla la longitud de onda de la luz de excitación transmitida a las muestras 216 controlando el servocontrolador 258 de filtro de luz de excitación. La luz de excitación se transmite a través del cable 228 de fibra óptica de entrada de luz de excitación hasta la sonda 212 de fibra óptica para la transmisión a las muestras 216.

La sonda 212 de fibra óptica recibe la emisión espectral de las muestras 216 y se transmite hasta un filtro 238 de emisión espectral mediante el cable 250 de fibra óptica de salida. Un servocontrolador 240 de emisión espectral controla la apertura del filtro 238 de emisión espectral, controlando así la longitud de onda de la emisión espectral que se transmite al tubo 220 fotomultiplicador. El servocontrolador 240 de emisión espectral está controlado por un controlador 242 informático.

La emisión espectral de las muestras 216 se transmite desde el tubo 220 fotomultiplicador. La salida 244 de energía eléctrica conecta el tubo 220 fotomultiplicador a la conexión 224 eléctrica. La conexión 224 eléctrica conecta la salida 244 de energía eléctrica al ordenador 222. Accionado por un software adecuado, el ordenador 222 procesa la señal de emisión espectral de las muestras 216. Un software a modo de ejemplo es una interfaz gráfica que analiza automáticamente los datos de fluorescencia obtenidos de las muestras 216. Tal software se conoce bien por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, el lector de placas de múltiples pocillos de fluorescencia CytoFluor™ II (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) utiliza el sistema de análisis de datos Cytocalc™ (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Otro software adecuado incluye MicroSoft Excel o cualquier software comparable.

Un medio 260 de movimiento relativo de la armadura de sensor mueve la armadura 226 de sensor en direcciones 234 y 236. Un segundo medio 232 de movimiento relativo mueve la armadura 226 de sensor en direcciones 246 y 248 de modo que la sonda 212 de fibra óptica puede moverse para detectar las emisiones espectrales de las muestras 216.

Tal como se trató anteriormente, el medio de recepción espectral o sensor del aparato de ensayo de la presente invención puede comprender un tubo fotomultiplicador. Alternativamente, el medio de recepción espectral o sensor puede incluir un dispositivo de carga acoplada (CCD). Todavía en otra realización, el medio de recepción espectral o sensor puede incluir una red de diodos. Un CCD se compone de silicio semiconductor. Cuando caen sobre él fotones de luz, se liberan electrones libres.

Además, puede usarse una cámara de CCD para obtener imágenes de fluorescencia, tal como de emisión de fluorescencia. Las cámaras de CCD de alta resolución pueden detectar cantidades muy pequeñas de energía electromagnética, ya se origine a partir de estrellas lejanas, se difracte por cristales o se emita por fluoróforos. Como dispositivo electrónico de obtención de imágenes, una cámara de CCD es particularmente adecuada para la obtención de imágenes de emisión de fluorescencia dado que puede detectar objetos muy tenues, proporciona una detección sensible en un intervalo de amplio espectro, proporciona niveles bajos de ruido electromagnético y detecta señales en un amplio intervalo dinámico, es decir, un dispositivo de carga acoplada puede detectar simultáneamente objetos brillantes y objetos tenues. Además, la salida es lineal de modo que la cantidad de electrones recogidos es directamente proporcional al número de fotones recibidos. Esto significa que el brillo de la imagen es una medida del brillo real del objeto, una propiedad no proporcionada, por ejemplo, por las emulsiones fotográficas. Están disponibles cámaras de CCD adecuadas de Alpha-Innotech (San Leandro, CA), Stratagene (La Jolla, CA) y BioRad (Richmond, CA).

Se describen adicionalmente aparatos útiles para practicar el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca en la solicitud de patente de los EE.UU. número 08/853.459, presentada el 9 de mayo de 1997, y en la solicitud de patente internacional número PCT/US97/08154 (publicada el 13 de noviembre de 1997 como la publicación número WO 97/42500), que se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad.

Habiendo descrito ahora de manera general la invención, la misma se llegará a entender más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos específicos que se incluyen en el presente documento con fines de ilustración solamente y no pretenden ser limitativos, a menos que se especifique lo contrario.

### Ejemplo 1

#### *Utilidad de diana cruzada amplia del ensayo de desplazamiento térmico en microplaca*

Se han probado varias dianas proteicas terapéuticas diferentes en el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, hasta la fecha, y se enumeran en la tabla 2. Incluyen una variedad de proteínas diferentes, con una amplia diversidad de función *in vivo*. Aquí se incluyen diversas serina proteasas, una proteína de unión a ADN (represor *lac*), dos factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb) y factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGFa)) y un receptor de factor de crecimiento (dominio II del receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (D(II)FGFR1)).

TABLA 2

<b>Dianas terapéuticas analizadas mediante el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca</b>		
<b>Dianas</b>	<b>PM</b>	<b>Ensayos / mg (en formato de 10 <math>\mu</math>L)</b>
$\alpha$ -trombina	37,0 kDa	1430 0,7 $\mu$ g/ensayo (20 pmol)
Factor D	25,0 kDa	1000 1,0 $\mu$ g/ensayo (40 pmol)
Factor Xa	45,0 kDa	1667 0,6 $\mu$ g/ensayo (7 pmol)
FGFb	17,5 kDa	2000 0,5 $\mu$ g/ensayo (29 pmol)
D(II)FGFR1	13,5 kDa	588 1,7 $\mu$ g/ensayo 126 pmol)
Represor <i>lac</i>	77,0 kDa	1200 0,8 $\mu$ g/ensayo (10 pmol)
Urocinasa	28,0 kDa	714 1,4 $\mu$ g/ensayo (50 pmol)
Proteína NFkB	65,0 kDa	3030 0,33 $\mu$ g/ensayo (5 pmol)
Receptor de GLP1	26,0 kDa	
CHM II	45,0 kDa	
Factor de von Willebrand	500 kDa	
FGFa	18,0 kDa	400 2,5 $\mu$ g/ensayo

Los pesos moleculares de las proteínas diana oscilan desde 13,5 kDa hasta aproximadamente 500 kDa. En promedio, fue posible llevar a cabo 1322 ensayos por 1,0 mg de proteína usando un volumen de ensayo de 10  $\mu$ L. Puede doblarse el número de ensayos que pueden llevarse a cabo si se emplea el formato de ensayo de 5  $\mu$ L.

Todos los ensayos de desplazamiento térmico en microplaca se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo en V de policarbonato usando 1,8-ANS 200  $\mu$ M como la sonda fluorescente para monitorizar las transiciones de desplegamiento térmico para las mezclas de proteína/ligando. Se monitorizaron los cambios en la emisión de fluorescencia a 460 nm con un lector de placas de fluorescencia CytoFluor II (PerSeptive Biosystems) (excitación a 360 nm) y se elevó la temperatura en incrementos de 2°C con el ciclador con temperatura en gradiente RoboCycler® (Stratagene, la Jolla, CA).

Se han sometido a ensayo otras proteínas varias usando el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, incluyendo las siguientes proteínas de las siguientes clases: serina proteasas (trombina, factor Xa, factor D, urocinasa, tripsina, quimotripsina, subtilisina); receptores de la superficie celular (receptor 1 de FGF, CHM de clase II, receptor de GLP 1, receptor  $\beta$ -2-adrenérgico, receptor de fibronectina (IIbIIIa)); factores de crecimiento (FGFa, FGFb); proteínas de unión a ADN (represor *lac*, NF- $\kappa$ -B, helicasa); proteínas motoras (miosina, helicasa); oxidorreductasas (peroxidasa del rábano, citocromo c, lactato deshidrogenasa, lactoperoxidasa, malato deshidrogenasa, colestero oxidasa, gliceroldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, dihidrofolato reductasa); modificaciones de hidratos de carbono (celulasa,  $\alpha$ -amilasa, hialuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa, invertasa); inmunoglobulinas (Fab de IgG, Fc de IgG); ADNasas (ADNasa I, ADNasa II); ARNasas (ARNasa A); receptores de calcio intracelular (calmodulina, proteína S100); hidrolasa de neurotransmisores (acetilcolinesterasa); eliminadores de radicales libres (superóxido dismutasa); proteína de unión a biotina (estreptavidina); proteína de unión a oxígeno (mioglobina); e inhibidor de proteasas (inhibidor de tripsina).

## Ejemplo 2

### *Interacciones de unión a múltiples ligandos con una única proteína diana*

La utilidad casi universal de la tecnología de ensayo de desplazamiento térmico en microplaca también se ilustra para interacciones de unión a múltiples ligandos que se producen muchas veces dentro de una única molécula de proteína. La capacidad para evaluar la unión de muchas clases diferentes de ligandos a una única proteína sin rediseñar el ensayo es una gran ventaja de esta tecnología y se presta ella misma fácilmente para la tarea de asignar función a una proteína para la que no se conoce nada más que la secuencia primaria. El conocimiento de la unión de diferentes ligandos ayudará en la evaluación de la función de una proteína de muestra derivada de la información genómica.

Tal como se demostró previamente, puede usarse el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca para seleccionar ligandos por su unión a sitios únicos en las proteínas diana. Sin embargo, basándose en la aditividad próxima de la energía libre de unión al ligando y el desplegamiento de la proteína, también es posible emplear el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca para analizar interacciones de unión a múltiples ligandos en una proteína diana. En principio, si la energía libre de la unión de diferentes ligandos que se unen a la misma proteína son casi aditivas, entonces pueden analizarse sistemas de unión a múltiples ligandos, o bien no cooperativos o bien cooperativos (positivos o negativos).

## ES 2 273 442 T3

A este respecto, la trombina humana es un sistema ideal para probar la utilidad del ensayo para el análisis de interacciones de unión a múltiples ligandos porque tiene cuatro sitios de unión diferentes: (1) el sitio de unión catalítico; (2) el sitio de unión a fibrina (exosito I); (3) el sitio de unión a heparina (exosito II); (4) el sitio de unión a  $\text{Na}^+$ , ubicado a aproximadamente 15 Å desde el sitio catalítico.

En primer lugar, se determinó la unión de ligandos individuales. 3DP-4660, hirugen (hirudina 53-64) (Sigma) y heparina 5000 (CalBiochem) se unieron al sitio catalítico, el sitio de unión a fibrina y el sitio de unión a heparina, respectivamente, de trombina.

Se diluyó una solución madre de trombina hasta 1  $\mu\text{M}$  en Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,1 M,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y 1,8-ANS 100  $\mu\text{M}$ . Se incluyó individualmente cada ligando de trombina y en diversas combinaciones en soluciones de trombina 1  $\mu\text{M}$  a concentraciones finales de 50  $\mu\text{M}$  cada uno, excepto para heparina 5000, que fue de 200  $\mu\text{M}$ . Se dispensaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de trombina o trombina/ligando(s) en pocillos de una placa de microtitulación de poliacarbonato de fondo en V de 96 pocillos. El contenido se mezcló mediante captación y descarga en una punta de pipeta de 100  $\mu\text{L}$ . Finalmente, se añadió una gota de aceite mineral (Sigma, St. Lois, MO) en la parte superior de cada pocillo de reacción para reducir la evaporación de las muestras a temperaturas elevadas. La placa se sometió a 3 minutos de calentamiento en un bloque térmico de un ciclador con temperatura en gradiente RoboCycler® (Stratagene, La Jolla, CA), con el que se creó un gradiente de temperatura a través de la microplaca, seguido por enfriamiento durante 30 segundos a 25°C, y posterior lectura en un lector de placas de fluorescencia. Se analizaron los datos mediante ajuste por mínimos cuadrados no lineales.

Los resultados de estas reacciones de unión individuales se muestran en la figura 3. El orden jerárquico de afinidad de unión fue 3DP-4660 > hirugen > heparina 5000, correspondiente a una  $K_d$  de 15 nM, 185 nM y 3434 nM, respectivamente, para los ligandos que se unen a cada  $T_m$  (véase la ecuación (1)).

A continuación, se estudió la unión de combinaciones de dos ligandos. Los datos se muestran en la figura 4. Los resultados de la figura 4 revelan desplazamientos del desplegamiento térmico que son ligeramente menores que las esperadas para la aditividad total. Por ejemplo, hirugen solo dio un  $\Delta T_m$  de 5,8°C y 3DP-4660 solo dio un  $\Delta T_m$  de 7,7°C, pero juntos dieron un  $\Delta T_m$  de 12,2°C, y no el desplazamiento de 13,5°C que se esperaría si las energías de unión fueran totalmente aditivas. Este resultado podría significar que la afinidad de unión de uno o ambos ligandos disminuye cuando ambos ligandos se unen a trombina, y sería un ejemplo de cooperatividad negativa entre el sitio de unión a fibrina y el sitio de unión catalítico. Tal resultado concuerda con la bibliografía sobre la trombina, en la que se ha encontrado que la cinética de la hidrólisis de diversos sustratos cromogénicos depende de los ligandos que se unen al exosito I. De hecho, se observó una disminución del 60% en la  $K_m$  para la hidrólisis de D-fenilalanilpípecolil-arginil-p-nitroanilida cuando estaba presente hirugen (Dennis *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 188:61-66 (1990)). Además, también hay evidencia estructural de cooperatividad entre el sitio catalítico y el exosito I. Una comparación de las estructuras isomorfas de trombina unida a PPACK (PPACK es un inhibidor del sitio catalítico de trombina) y trombina unida a hirugen reveló cambios conformacionales que se producen en el sitio activo como resultado de la unión de hirugen en el sitio activo (Vijayalakshmi *et al.*, *Protein Science* 3:2254-2271 (1994)). Por tanto, la cooperatividad aparente observada entre el centro catalítico y el exosito I concuerda con los datos funcionales y estructurales de la bibliografía.

Se esperaría que si las energías de unión de los tres ligandos fueran totalmente aditivas, se observara un  $\Delta T_m$  de 17,7°C. Sin embargo, cuando los tres ligandos estaban presentes juntos, el  $\Delta T_m$  fue de 12,9°C. Este resultado implica cooperatividad negativa adicional que supone la unión de ligandos en los tres sitios de unión a proteína. Existe cierta evidencia en la bibliografía que concuerda con esta suposición. Por ejemplo, la trombina, en un complejo ternario con monómero de fibrina y heparina, tiene una actividad disminuida hacia sustratos cromogénicos de tripéptido y protrombina (Hogg & Jackson, *J Biol. Chem.* 265:248-255 (1990)), y una reactividad notablemente reducida con antitrombina (Hogg & Jackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3619-3623 (1989)). Además, recientes observaciones de Hotchkiss *et al.* (*Blood* 84:498-503 (1994)) indican que también se forman complejos ternarios en plasma y comprometen notablemente la actividad anticoagulante de la heparina.

En la tabla 3, se muestra un resumen de los resultados de unión de múltiples ligandos a trombina. A partir de los resultados de la figuras 3 y 4 y de la tabla 3, se hicieron las siguientes consideraciones. En primer lugar, en presencia de heparina 5000, hirudina 53-65 se unió a trombina aproximadamente 21 veces menos fuertemente que en ausencia de heparina; y en presencia de heparina 5000, 3DP-4660 se unió a trombina aproximadamente 10 veces menos fuertemente que en ausencia de heparina.

En segundo lugar, en presencia de hirudina 53-65, heparina se unió a trombina aproximadamente 18 veces menos fuertemente que en ausencia de hirudina 53-65; y en presencia de hirudina 53-65, 3DP-4660 se unió a trombina aproximadamente 3 veces menos fuertemente que en ausencia de hirudina 53-65.

En tercer lugar, en presencia de 3DP-4660, heparina 5000 se unió a trombina aproximadamente un 25% menos fuertemente que en ausencia de 3DP-4660; y en presencia de 3DP-4660, hirudina se unió a trombina aproximadamente 2,3 veces menos fuertemente que en ausencia de 3DP-4660.

TABLA 3

**Ensayo para determinar la unión de ligandos al sitio activo, exosito y sitio de unión a heparina de trombina**

Proteína/ligando	[Ligando] ( $\mu\text{M}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{K}$ )	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{K}$ )	$K_d$ a $T_m^a$ (nM)	$K_d$ a $298^{\circ}\text{K}^b$ (nM)
Trombina (TH)	Ninguno	323,75	0,0		
TH/heparina 5000	200	327,95	4,2	3434	470
TH/hirudina 53-65	50	329,52	5,8	185	23
TH/3dp-4660	50	331,40	7,7	29	3
TH/heparina 5000	200	327,95			
TH/hep./hir.	50	330,57	2,6	4254	478
TH/heparina 5000	200	327,95			
TH/hep./3dp-4660	50	333,20	5,3	350	32
TH/hirudina 53-65	50	329,52			
TH/Hin/Hep.	200	330,57	1,1	75422	8467
TH/hirudina 53-65	50	329,52			
TH/hir./3dp-4660	50	335,97	6,5	117	9
TH/3dp-4660	50	331,40			
TH/3dp-4660/hep.	200	333,20	1,8	38205	351
TH/dp-4660	50	331,40			
TH/3dp-4660/hir.	50	335,97	4,6	731	54

a: Los cálculos para  $K_d$  a  $T_m$  se realizaron usando la ecuación (1) con  $\Delta H_u^{T_0} = 200,0$  kcal/mol, según se observó para pretrombina 1 por Leintz *et al.*, *Biochemistry* 33:5460-5468 (1994) y un  $\Delta C_p$  estimado = 2,0 kcal/mol -  $^{\circ}\text{K}$ ; y  $K_d = 1/La$ .

b: Las estimaciones para  $K_d$  a  $T = 298^{\circ}\text{K}$  se realizaron usando la ecuación (3), en la que se estima que  $\Delta H_L^T$  es  $\sim 10,0$  kcal/mol.

Por tanto, el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca ofrece muchas ventajas para analizar las interacciones de unión de múltiples ligandos en estudios de clasificación de genómica funcional. Por ejemplo, el mismo ensayo puede detectar simultáneamente la unión de diferentes clases de ligandos que se unen a múltiples sitios de unión en una proteína diana. Cada interacción de unión de ligando identificada ayuda al usuario en la asignación de una función a una proteína. Cuando se resumen las funciones, se obtiene una curva de respuesta que es característica de una clase particular de proteínas.

Por ejemplo, si se considera la información obtenida en el presente documento para trombina, y se olvida de momento lo que se sabe sobre esta proteína, los datos de unión a heparina sugieren un papel extracelular para esta proteína dado que la heparina y otros oligosacáridos sulfatados son componentes importantes de la matriz extracelular de los tejidos de los organismos superiores. El ligando del sitio de unión catalítico, 3DP-4660, es un mimético no peptídico de un péptido que tiene una cadena lateral de arginilo en la posición P1, característica de sustratos e inhibidores de serina proteasas similares a tripsina. De manera similar, se encontró que los análogos de estado de transición de boroarginina, que tiene un grupo arginina en la posición P1 para este peptidomimético sintético, eran inhibidores específicos para las serina proteasas, trombina, tripsina y plasmina (Tapparelli *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:4734-4741 (1993)) con la especificidad observada:  $K_d \sim 10$  nM (trombina),  $K_d \sim 1.000$  nM (tripsina),  $K_d \sim 10.000$  nM (plasmina). Por tanto, el conocimiento combinado de la unión a heparina con la unión observada a los análogos de estado de transición de boroarginina centraría rápidamente la asignación de esta proteína a una función proteolítica extracelular en ausencia de cualquier otra información.

Además, puede usarse el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca, de manera con alto rendimiento, para detectar cooperatividad en la unión de ligandos. La información sobre la cooperatividad de la unión de ligandos puede recogerse y analizarse muy rápidamente, durante unas cuantas horas, en lugar de durante varios meses, tal como se requiere cuando se usan métodos convencionales para clasificar la función de una proteína.

## Ejemplo 3

*Selección de la biblioteca de sondas funcionales frente al factor Xa humano*

5 En la figura 5 se muestra una biblioteca de sondas funcionales. Una placa de 96 pocillos (placa 1) contenía 94 compuestos (y dos pocillos de control) e incluía muchos compuestos que se consideran útiles para proporcionar información sobre las preferencias de unión a ligandos, y por tanto, la función probable de las proteínas. Por ejemplo, se encuentran cofactores tales como NAD y ATP en los pocillos A4 y A5, respectivamente. Esta placa particular contenía muchísimas condiciones de unión a iones metálicos para ayudar a detectar con sonda una proteína diana para cofactores de ion metálico.

10 Con el fin de validar la selección de sondas funcionales, se incubaron dos proteínas con los compuestos de la placa 1 y se sometieron luego a ensayo usando el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca. Por ejemplo, se muestra el espectro de actividad obtenido para el factor Xa (Enzyme Research Labs) en la figura 6.

15 El factor Xa se adquirió de Enzyme Research Labs (South Bend, IN). Se prepararon las reacciones en pocillos con fondo en V de placas de microtitulación de policarbonato de 96 pocillos. La concentración final del factor Xa fue de 1,4  $\mu$ M (55 ng/mL) en Tris-HCl 200 mM, pH 8. La concentración final de 1,8-ANS fue de 100  $\mu$ M. La concentración final de cada una de las moléculas probadas para determinar su unión se muestra en la figura 6. Se mezcló el contenido mediante captación y descarga repetidas en una punta de pipeta de 100  $\mu$ L. Finalmente, se añadió una gota de aceite mineral (Sigma, St. Lois, MO) en la parte superior de cada pocillo de reacción para reducir la evaporación de las muestras a temperaturas elevadas.

20 Se calentaron simultáneamente las reacciones de las microplacas, en incrementos de dos grados, desde 40 hasta 70°C, usando un ciclador con temperatura en gradiente RoboCycler® (Stratagene, La Jolla, CA). Tras cada etapa de calentamiento, antes del barrido de fluorescencia, se enfrió la muestra hasta 25°C. Se midió la fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia CytoFluor II (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Se excitó 1,8-ANS con luz a una longitud de onda de 360 nm. Se midió la emisión de fluorescencia a 460 nm.

30 Se encontró que había seis condiciones que estabilizaban esta enzima con un  $\Delta T_m$  superior a 1,0°C: (1)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 M, (2)  $\text{MgSO}_4$  0,5, (3)  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  0,5 M, (4) KCl 0,5 M, (5) tripolifosfato 0,1 M y (6)  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Las últimas dos condiciones son probablemente las más significativas, puesto que el tripolifosfato es un polielectrolito que imita a la heparina y otros oligosacáridos sulfatados, y su unión a proteínas sugiere la presencia de un sitio de unión a heparina, algo que se conoce bien para el factor Xa. De manera similar, se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  se une al dominio Gla del factor Xa, lo que concuerda con el efecto de estabilización observado para  $\text{CaCl}_2$  0,1 M.

35 Se encontró que algunos de los iones metálicos tienen un fuerte efecto de desestabilización sobre el factor Xa. Por ejemplo, se observó que  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{YCl}_3$  y  $\text{NiSO}_4$  desestabilizaban el factor Xa en desde 6 hasta 17°C. El motivo para este efecto de desestabilización es desconocido. Es posible que estos iones metálicos se unan preferentemente a la forma desplegada del factor Xa. También es posible cierta interferencia con la sonda de fluorescencia.

## Ejemplo 4

*Selección de la biblioteca de sondas funcionales frente a D(II)FGFR1 humano*

45 También se emplearon los compuestos de la placa 1 de biblioteca de sondas funcionales para generar un espectro de actividad para D(II)FGFR1. Se clonó D(II)FGFR1 y se expresó en *E. coli*. Se renaturalizó D(II)FGFR1 recombinante procedente de cuerpos de inclusión esencialmente tal como se han descrito (Wetmore, D. R. *et al.*, *Proc. Soc. Mtg.*, San Diego, CA (1994)), excepto porque se incluyó una cola de hexahistidina en el extremo N-terminal para facilitar la recuperación mediante cromatografía por afinidad en una columna de quelación de  $\text{Ni}^{2+}$  (Janknecht, R. *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-8976 (1991)). Se purificó D(II)FGFR1 adicionalmente en una columna de heparina-Sepharose (Kan, M. *et al.*, *Science* 259:1918-1921 (1993); Pantoliano, M. W. *et al.*, *Biochemistry* 33:10229-10248 (1994)). La pureza fue > 95%, evaluado mediante SDS-PAGE. Se concentró la proteína D(II)FGFR1 hasta 12 mg/mL (~ 1 mM) y se almacenó a 4°C.

50 Se prepararon las reacciones en pocillos con fondo en V de placas de microtitulación de policarbonato de 96 pocillos. La concentración final de D(II)FGFR1 fue de 50  $\mu$ M en Tris-HCl 200 mM, pH 8, en cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. La concentración final de 1,8-ANS fue de 100  $\mu$ M. La concentración final de cada una de las moléculas probadas para determinar su unión se muestra en la figura 7. Se mezcló el contenido mediante captación y descarga repetidas en una punta de pipeta de 100  $\mu$ L. Finalmente, se añadió una gota de aceite mineral (Sigma, St. Lois, MO) en la parte superior de cada pocillo de reacción para reducir la evaporación de las muestras a temperaturas elevadas.

65 Se calentaron simultáneamente las reacciones de las microplacas, en incrementos de dos grados, desde 25 hasta 60°C, usando un ciclador con temperatura en gradiente RoboCycler® (Stratagene, La Jolla, CA). Tras cada etapa de calentamiento, antes del barrido de fluorescencia, se enfrió la muestra hasta 25°C. Se midió la fluorescencia usando un

## ES 2 273 442 T3

lector de microplacas de fluorescencia CytoFluor II (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Se excitó 1,8-ANS con luz a una longitud de onda de 360 nm. Se midió la emisión de fluorescencia a 460 nm.

El espectro de actividad resultante se muestra en la figura 7. Se encontró que un gran número de compuestos estabilizaba D(II)FGFR1. Por ejemplo, se encontró que todos los azúcares, D(+)-glucosa, D(+)-sacarosa, xilitol y sorbitol estabilizaban todos (y se supone que se unían a) D(II)FGFR1. Este resultado puede concordar con las propiedades conocidas de unión a heparina de esta proteína. El tripolifosfato, un mimético de heparina de polielectrolito conocido, produjo el mayor desplazamiento: aproximadamente 11°C. Este resultado concuerda con las propiedades de unión a heparina de esta proteína (Pantoliano, M. W. *et al.*, *Biochemistry* 33:10229-10248 (1994)).

Por tanto, en una situación en la que un usuario no sabe nada sobre esta proteína (como es el caso normalmente cuando se clona un gen nuevo y se desconoce la función de la proteína codificada), la información obtenida seleccionando sólo los compuestos de la placa 1 habría proporcionado al usuario cierta evidencia de que D(II)FGFR1 podría clasificarse como una proteína de unión a heparina.

### Ejemplo 5

#### *Identificación de dianas proteicas que contienen sitios de unión a ADN*

El represor *lac* es normalmente una proteína tetramérica, un dímero de dímeros. Sin embargo, esta proteína ha demostrado unirse a ADN en su estado dímérico. Lewis *et al.* resolvieron la estructura cristalina del represor *Lac* unido a su ligando de ADN relacionado (Lewis *et al.*, 1996, *Science* 271:1247-1254). Se obtuvieron un dímero alterado genéticamente, uno que puede formar un tetrámero y un oligonucleótido 21-merico sintético, la secuencia palindrómica del operador *lac* nativo, del Dr. Mitch Lewis en la Universidad de Pennsylvania. Se sometió a ensayo la unión del operador *lac* sintético al represor *lac* mutante usando el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca.

La concentración final del represor *lac* fue de 60  $\mu\text{M}$  en Tris·HCl 200 mM, pH 8. Se prepararon las reacciones en pocillos con fondo en V de placas de microtitulación de policarbonato de 96 pocillos. La concentración final de 1,8-ANS fue de 100  $\mu\text{M}$ . La concentración final de cada una de las moléculas probadas para determinar su unión se muestra en la figura 7. Se mezcló el contenido mediante captación y descarga repetidas en una punta de pipeta de 100  $\mu\text{L}$ . Finalmente, se añadió una gota de aceite mineral (Sigma, St. Lois, MO) en la parte superior de cada pocillo de reacción para reducir la evaporación de las muestras a temperaturas elevadas.

Se calentaron simultáneamente las reacciones de las microplacas, en incrementos de dos grados, desde 25°C hasta 75°C, usando un ciclador con temperatura en gradiente RoboCycler® (Stratagene, La Jolla, CA). Tras cada etapa de calentamiento, antes del barrido de fluorescencia, se enfrió la muestra hasta 25°C. Se midió la fluorescencia usando un lector de microplacas de fluorescencia CytoFluor II (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Se excitó ANS con luz a una longitud de onda de 360 nm. Se midió la emisión de fluorescencia a 460 nm.

En presencia de ADN de operador sintético 80  $\mu\text{M}$ , la  $T_m$  de la transición de desplegamiento del represor *lac* se desplazó 5,6°C (figura 8). La  $K_d$  calculada a  $T_m$  es de 6  $\mu\text{M}$ . Usando conjeturas con cierta base para  $\Delta H_L$  (-10,0 kcal/mol), la  $K_d$  calculada a 25°C es de 1,2  $\mu\text{M}$  y la  $K_d$  calculada a la temperatura fisiológica (37°C) es de 3,4  $\mu\text{M}$ . La sonda de fluorescencia, 1,8-ANS, no se unió a ADN solo (es decir, no hubo señal de fluorescencia para la reacción de control en la que no se incluyó represor *lac*).

Estos resultados muestran que puede usarse el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca para someter a ensayo interacciones de ADN/proteína.

### Ejemplo 6

#### *Ensayos de unión a ATP*

Puede someterse a ensayo la unión a adenosina trifosfato (ATP) y análogos de ATP usando el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca. Se disolvieron miosina muscular bovina (Sigma), proteína cinasa dependiente de 3',5'-AMPc de corazón bovina (Sigma) y piruvato cinasa muscular de pollo (Sigma) cada una en tampón A para generar soluciones madre a una concentración final de 2 mg/mL. Se disolvieron cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), adenosina trifosfato, adenosina trifosfato- $\gamma$ -S (ATP- $\gamma$ -S), trifluoruro de aluminio ( $\text{AlF}_3$ ) y fluoruro de sodio (NaF) en tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM) hasta las concentraciones madre usadas en cada experimento. Se preparó solución de Dapoxyl™ 12800 diluyendo una solución madre de Dapoxyl™ 12800 (sal sódica del ácido 5-4''-dimetilaminofenil)-2-(4'-fenil)oxazolsulfónico, Molecular Probes, Inc.) 20 mM en dimetilsulfóxido hasta la concentración apropiada en tampón A.

En las reacciones con ATP y ATP- $\gamma$ -S, cada muestra contenía 12  $\mu\text{L}$  de solución madre de proteína (2 mg/mL), 9,6  $\mu\text{L}$  de o bien ATP o bien ATP- $\gamma$ -S (50 mM), 4,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (100 mM) y 21,6  $\mu\text{L}$  de una solución de 222  $\mu\text{M}$  de Dapoxyl 12800 en tampón A. En las reacciones con ATP, trifluoruro de aluminio y fluoruro de sodio, cada muestra contenía 12  $\mu\text{L}$  de solución madre de proteína (2 mg/mL), 9,6  $\mu\text{L}$  de ATP (50 mM), 9,6  $\mu\text{L}$  de trifluoruro de aluminio (50 mM) + fluoruro de sodio (50 mM), 4,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  100 mM y 12  $\mu\text{L}$  de una solución de Dapoxyl 12800 400  $\mu\text{M}$  en tampón A.

## ES 2 273 442 T3

Para el ensayo de desplazamiento térmico, se dispensaron cuatro alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada mezcla de ensayo en cuatro pocillos situados en diferentes cuadrantes de una placa de termociclador de 384 pocillos de MJ Research. Entonces, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de aceite mineral a cada uno de los cuatro pocillos para evitar la evaporación. Se recogió cada punto de dato mostrado calentando la placa a las temperaturas mostradas durante tres minutos. Por ejemplo, se calentó la placa hasta una temperatura dada, y luego se dejó enfriar hasta 25°C durante un minuto, seguido por iluminación UV y recogida de los datos. Entonces, se calentó la placa hasta la siguiente temperatura superior, etcétera. La iluminación UV se realizó usando una iluminación de longitud de onda larga a 200-420 nm, que tiene un pico a 365 nm. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia usando una cámara de CCD que tiene un filtro de paso de banda centrado a 550 nm.

La figura 9 muestra los resultados de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de ATP con respecto a miosina muscular bovina. Los datos se representan como la intensidad de fluorescencia como una función de la temperatura. La  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico de control (sin ATP) fue de 49,3°C (pocillo K2 de la microplaca). La  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico para miosina muscular bovina unida a ATP ((+) ATP) fue de 51,4°C (pocillo K16 de la microplaca). Por tanto, el  $\Delta T_m$  para la unión a ATP fue de 2,1°C. La  $K_d$  fue de 440  $\mu\text{M}$ .

La figura 10 muestra los resultados de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de ATP- $\gamma$ -S con respecto a proteína cinasa dependiente de 3',5'-AMPc. Los datos se representan como la intensidad de fluorescencia como una función de la temperatura. La  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico de control (sin ATP- $\gamma$ -S) fue de 46,2°C (pocillo E14 de la microplaca). La  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico para proteína cinasa dependiente de 3',5'-AMPc unida a ATP- $\gamma$ -S ((+) ATP- $\gamma$ -S) fue de 51,8°C (pocillo M15 de la microplaca). Por tanto, el  $\Delta T_m$  para la unión a ATP- $\gamma$ -S fue de 5,6°C. La  $K_d$  fue de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados, incluyendo los resultados para piruvato cinasa, se resumen en la tabla 4.

TABLA 4

*Resumen de los resultados para enzimas que se unen a ATP. El valor entre paréntesis es la desviación estándar*

	Referencia	ATP- $\gamma$ -S (10 mM)	ATP (10 mM)	ATP + $\text{AlF}_3$ (10 mM)
	$T_m$	$\Delta T_m$	$\Delta T_m$	$\Delta T_m$
Miosina	49,4	0,0 ( $\pm$ 0,2)	2,2 ( $\pm$ 0,4)	2,8 ( $\pm$ 0,4)
3',5'-AMPc-proteína cinasa	44,7	5,6 ( $\pm$ 1,7)	7,5 ( $\pm$ 0,7)	8,2 ( $\pm$ 1,4)
Piruvato cinasa	54,5	0,8 ( $\pm$ 0,11)	-0,44 ( $\pm$ 0,1)	-0,27 ( $\pm$ 0,2)

### Ejemplo 7

#### *Ensayo de unión a ácido fólico*

Puede someterse a ensayo la unión a ácido fólico usando el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca. Se disolvieron dihidrofolato reductasa hepática bovina (DHFR, Sigma), dihidrofolato reductasa hepática de pollo (DHFR, Sigma), arilamina acetiltransferasa hepática de paloma (ArAcT, Sigma) y ácido formimino-glutámico transferasa hepática porcina (FGT, Sigma) cada una en tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM) para generar soluciones madre a una concentración final de 2 mg/mL. Se prepararon soluciones de ácido hidrofólico ( $\text{FAH}_2$ ), metotrexato, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) disolviendo material sólido en tampón A inmediatamente antes de su uso. Se preparó una solución de Dapoxyl™ 12800 diluyendo una solución madre de Dapoxyl™ 12800 20 mM en dimetilsulfóxido hasta la concentración apropiada en tampón A.

Cada muestra de ensayo contenía 12  $\mu\text{L}$  de solución madre de proteína (2 mg/mL), 4,8  $\mu\text{L}$  de solución madre de bien o ácido hidrofólico ( $\text{FAH}_2$ ) o bien metotrexato (1 mM), y 31,2  $\mu\text{L}$  de una solución de Dapoxyl™ 12800 154  $\mu\text{M}$  en tampón A. Cada muestra contenía 12  $\mu\text{L}$  de solución madre de proteína (2 mg/mL), 4,8  $\mu\text{L}$  de solución madre de NADP (50 mM), y 31,2  $\mu\text{L}$  de una solución de Dapoxyl™ 12800 154  $\mu\text{M}$  en tampón A.

Para el ensayo de desplazamiento térmico, se dispensaron cuatro alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada mezcla de ensayo en cuatro pocillos situados en diferentes cuadrantes de una placa de termociclador de 384 pocillos de MJ Research. Entonces, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de aceite mineral a cada uno de los cuatro pocillos para evitar la evaporación. Se recogió cada punto de dato mostrado calentando la placa a la temperatura mostrada durante tres minutos, seguido por incubación a 25°C durante un minuto, seguido por iluminación UV y recogida de los datos. Los resultados se muestran en la tabla 5.

TABLA 5

Resultados para proteínas que se unen a metotrexato, FAH<sub>2</sub> y NADP. El valor entre paréntesis es la desviación estándar

Proteína	Referencia T <sub>m</sub>	Metotrexato (100 μM)	FAH <sub>2</sub> (100 μM)	NADP (5 mM)
		ΔT <sub>m</sub>	ΔT <sub>m</sub>	ΔT <sub>m</sub>
DHFR	52,47	7,0 (± 0,1)	-0,64 (± 0,2)	3,2 (± 0,13)
DHFR	56,6	8,6 (± 0,2)	2,5 (± 0,2)	3,8 (± 0,4)
Arilamina acetiltransferasa	49,8	1,0 (± 0,4)	-1,8 (± 0,5)	2,8 (± 0,4)
Ácido formimino-L-glutámico transferasa	47,2	0,9 (± 0,5)	3,62 (± 0,4)	0,0 (± 0,2)

## Ejemplo 8

*Ensayo de la unión de metotrexato/NADP(H)*

La capacidad para medir desplazamientos de temperatura para la unión de metotrexato y NADPH, tanto por separado como simultáneamente, es otro ejemplo de la utilidad de la presente invención en la medición de interacciones de unión de múltiples ligandos. En este caso, los sitios de unión de los dos ligandos están próximos, y existe cooperatividad positiva en la unión de los dos ligandos, tal como se muestra por el hecho de que el desplazamiento térmico para ambos ligandos que se unen simultáneamente es de 2-4 grados más que el total de los desplazamientos para cada unión de ligando por separado (tabla 6).

Puede someterse a ensayo la unión a metotrexato (MTX) y NADPH usando el ensayo de desplazamiento térmico en microplaca. Se disolvieron dihidrofolato reductasa hepática bovina (DHFR, Sigma) y dihidrofolato reductasa hepática de pollo (DHFR, Sigma) cada una en tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM) para generar soluciones madre a una concentración final de 2 mg/mL. Se prepararon todas las soluciones madre de ligandos disolviendo material sólido en tampón A inmediatamente antes de su uso. Se diluyeron adicionalmente las soluciones madre de la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, 100 mM), NADP (100 mM) y metotrexato (1 mM) en tampón A hasta el doble de la concentración de ensayo final (soluciones madre 2x): metotrexato (200 μM), NADP (20 mM), NADPH (20 mM), metotrexato + NADP (200 μM + 20 mM), metotrexato + NADPH (200 μM + 20 mM). Se preparó una solución de Dapoxyl™ 12800 diluyendo una solución madre de Dapoxyl™ 12800 20 mM en dimetilsulfóxido hasta la concentración apropiada en tampón A. Se añadieron 5 μL de cada solución madre de proteína a 25 μL de solución madre de ligando 2x mezclados con 20 μL de una solución de Dapoxyl™ 12800 250 μM en tampón A.

Las concentraciones de ligando finales fueron NADP 10 mM, NADPH 10 mM y MTX 100 μM.

Para el ensayo de desplazamiento térmico, se dispensaron cuatro alícuotas de 10 μL de cada mezcla de ensayo en cuatro pocillos situados en diferentes cuadrantes de una placa de termociclador de 384 pocillos de MJ Research. Entonces, se añadieron 10 μL de aceite mineral a cada uno de los cuatro pocillos para evitar la evaporación. Se recogió cada punto de dato mostrado calentando la placa a la temperatura mostrada durante tres minutos, seguido por incubación a 25°C durante un minuto, seguido por iluminación UV y recogida de los datos.

La figura 11 muestra los resultados de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de metotrexato con respecto a dihidrofolato reductasa. Los datos se representan como la intensidad de fluorescencia como una función de la temperatura. La T<sub>m</sub> de la curva de desplegamiento térmico de control (sin MTX) fue de 47,2°C (pocillo M1 de la microplaca). La T<sub>m</sub> de la curva de desplegamiento térmico para DHFR unida a metotrexato ((+) MTX) fue de 56,4°C (pocillo G6 de la microplaca). Por tanto, el ΔT<sub>m</sub> para la unión a metotrexato fue de 9,2°C. La K<sub>d</sub> fue de 24 nM.

La figura 12 muestra los resultados de un ensayo de desplazamiento térmico en microplaca de NADPH con respecto a dihidrofolato reductasa. Los datos se representan como la intensidad de fluorescencia como una función de la temperatura. La T<sub>m</sub> de la curva de desplegamiento térmico de control (sin NADPH) fue de 50,8°C (pocillo G8 de la microplaca). La T<sub>m</sub> de la curva de desplegamiento térmico para DHFR unida a NADPH ((+) NADPH) fue de 53,8°C (pocillo B20 de la microplaca). Por tanto, el ΔT<sub>m</sub> para la unión a NADPH fue de 3°C. La K<sub>d</sub> fue de 0,7 μM.

## ES 2 273 442 T3

TABLA 6

$\Delta T_m$  de ligando complejado a DHFR. El valor entre paréntesis es la desviación estándar

Proteína	NADP	MTX	Suma <sup>a</sup>	NADP + MTX <sup>b</sup>	NADPH	MTX	Suma <sup>a</sup>	NADP + MTX <sup>b</sup>
DHFR (pollo)	7,5 (± 0,38)	10,1 (± 0,32)	17,6	20,9 (± 0,4)	11,9 (± 1,3)	10,1 (± 0,32)	22	23,8 (± 0,4)
DHFR (vaca)	6,3 (± 0,1)	7,7 (± 0,3)	14	18,1 (± 0,4)	9,7 (± 0,2)	7,7 (± 0,3)	17,4	24,6 (± 0,6)

<sup>a</sup> El valor mostrado es la suma de los  $\Delta T_m$  observados a partir de la proteína incubada por separado con cada ligando.

<sup>b</sup> El valor mostrado es el  $\Delta T_m$  observado cuando se incubó la proteína simultáneamente con ambos ligandos.

### Ejemplo 9

El ácido dihidrofólico es un sustrato de dihidrofolato reductasa (DHFR). El metotrexato es un análogo del ácido fólico que se une a DHFR. Como evidencia de que el método de la presente invención es fiable, se demostró que el método puede usarse para detectar la unión de ácido dihidrofólico a DHFR. Se combinó DHFR hepática bovina con 80 compuestos para seleccionar la función de la proteína, y se detectó la unión a metotrexato, pero no a otros compuestos varios.

Cada pocillo de la placa de compuestos de microfuelle n° 198104 contenía uno de 80 compuestos diferentes a una concentración 10 mM en dimetilsulfóxido. Cada solución de compuesto se diluyó en tampón A (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM) hasta una concentración final de 200  $\mu$ M en pocillos separados de una placa de poliestireno de 384 pocillos. Se transfirieron 5  $\mu$ L de la solución contenida en cada pocillo a una placa de polipropileno de MJ Research que contenía 5  $\mu$ L de DHFR hepática bovina (a una concentración de 0,5 mg/mL y colorante Dapoxyl™ 12800 a una concentración de 200  $\mu$ M, produciendo concentraciones finales de ligando 100  $\mu$ M, DHFR 0,25 mg/mL y Dapoxyl 100  $\mu$ M en el volumen de 10 L de cada pocillo.

Se añadieron 10  $\mu$ L de aceite mineral a cada pocillo para evitar la evaporación. Entonces, se midieron los perfiles de desplegamiento para cada pocillo desde 25 hasta 70°C, recogiendo puntos de datos a cada temperatura, separadas por incrementos de un grado. Cada punto de datos se recogió calentando la placa a la temperatura mostrada durante 3 minutos, seguido por incubación a 25°C durante un minuto, seguido por iluminación UV y recogida de los datos usando una cámara de CCD.

Se recogieron los datos como cuatro réplicas de 80 compuestos en los cuadrantes de una placa de 384 pocillos. Los cuatro cuadrantes consistieron en: pocillos A2 a H11 (primer cuadrante), pocillos A14 a H23 (segundo cuadrante), pocillos I2 a P11 (tercer cuadrante) y pocillos I14 a 123 (cuarto cuadrante). Las columnas 1, 12, 13 y 24 consisten en pocillos de referencia que contienen sólo DHFR y dimetilsulfóxido.

Los pocillos F2, F14, N2 y N14 contenían metotrexato. Se reveló la unión mediante software de ajuste como un pocillo rojo. El metotrexato desplazó la  $T_m$  en  $5,13 \pm 0,19$  grados (promedio de 4 cuadrantes) y los otros compuestos en la placa tuvieron un efecto pequeño o ninguno (mostrado como pocillos casi blancos). Estos resultados indicaron que DHFR se une a metotrexato.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de al menos una función biológica de una proteína diana, comprendiendo dicho método:

(a) seleccionar una multiplicidad de moléculas diferentes por su capacidad para modificar la estabilidad de dicha proteína diana, en el que la modificación de la curva de desplegamiento de dicha proteína diana por una molécula indica que la molécula se une a dicha proteína diana, comprendiendo dicha etapa de selección:

(a1) poner en contacto dicha proteína diana con una o más de dicha multiplicidad de moléculas diferentes en cada uno de una multiplicidad de recipientes;

(a2) tratar dicha proteína diana en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes para hacer que la proteína se despliegue;

(a3) medir en cada uno de dichos recipientes un cambio físico asociado con el desplegamiento de dicha proteína diana;

(a4) generar una curva de desplegamiento para dicha proteína diana para cada uno de dichos recipientes;

(a5) comparar cada una de dichas curvas de desplegamiento en la etapa (a4) con la curva de desplegamiento obtenida para dicha proteína en ausencia de cualquiera de dicha multiplicidad de moléculas diferentes; y

(a6) determinar si cualquiera de dicha multiplicidad de moléculas diferentes modifica la estabilidad de dicha proteína, en el que una modificación en la estabilidad está indicada por un desplazamiento en la curva de desplegamiento;

y

(b) en el que una modificación en la estabilidad está indicada en la etapa (a6), determinando al menos una función biológica de dicha proteína diana mediante:

(b1) la generación de una primera lista de moléculas que modifican la curva de desplegamiento de dicha proteína diana; y

(b2) la comparación de dicha primera lista de moléculas con al menos una segunda lista de moléculas, en la que las moléculas en dicha segunda lista se sabe que modifican la curva de desplegamiento de un grupo de proteínas que comparten función biológica; y

(b3) la determinación de si alguna molécula en dicha primera lista está incluida en dicha segunda lista, determinando así al menos una función biológica de la proteína diana.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína diana puede desplegarse debido a un cambio térmico y se calienta en la etapa (a2) para generar una curva de desplegamiento térmico para dicha proteína diana como una función de la temperatura para cada uno de dichos recipientes; y determinándose al menos una función biológica de dicha proteína diana si las moléculas que desplazan la curva de desplegamiento térmico de dicha proteína diana desplazan las curvas de desplegamiento térmico de proteínas con las que comparten función biológica.

3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que, en dicha etapa (a) de selección, la multiplicidad de moléculas diferentes son las moléculas en dicha segunda lista.

4. Método según la reivindicación 2, o la reivindicación 3 cuando está adjunta a la reivindicación 2, en el que dicha etapa (a5) de comparación comprende ordenar dichas moléculas en dicha multiplicidad de moléculas diferentes por su unión a dicha proteína diana según la capacidad de cada una de dicha multiplicidad de moléculas diferentes para desplazar la curva de desplegamiento térmico de dicha proteína diana.

5. Método según la reivindicación 2, o la reivindicación 3 o 4 cuando están adjuntas a la reivindicación 2, en el que, en dicha etapa (a2) de calentamiento, dicha multiplicidad de recipientes se calienta simultáneamente.

6. Método según la reivindicación 2, o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 cuando están adjuntas a la reivindicación 2, en el que dicha etapa (a4) comprende además determinar una temperatura del punto medio ( $T_m$ ) de la curva de desplegamiento térmico; y en el que dicha etapa (a5) comprende además comparar la  $T_m$  de cada una de dichas curvas de desplegamiento en la etapa (a4) con (1) la  $T_m$  de cada una de dichas otras curvas de desplegamiento térmico y con (2) la  $T_m$  de la curva de desplegamiento térmico obtenida para dicha proteína diana en ausencia de cualquiera de dichas moléculas diferentes.

## ES 2 273 442 T3

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa (a3) comprende medir la absorbancia de luz por el contenido de cada uno de dichos recipientes.

5 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que dicha etapa (a1) comprende poner en contacto dicha proteína diana con una molécula de sonda de fluorescencia en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes y en el que dicha etapa (a3) comprende:

10 (i) excitar dicha molécula de sonda de fluorescencia, en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes, con luz; y

(ii) medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes.

15 9. Método según reivindicación 8, en el que dicha etapa (a3)(ii) comprende además medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes en un recipiente cada vez.

10. Método según reivindicación 8, en el que dicha etapa (a3)(ii) comprende además medir la fluorescencia de un subconjunto de dicha multiplicidad de recipientes simultáneamente.

20 11. Método según reivindicación 8, en el que dicha etapa (a3)(ii) comprende además medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes simultáneamente.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que dicha etapa (a3) comprende:

25 (i) excitar residuos de triptófano en dicha proteína diana, en cada uno de dicha multiplicidad de recipientes, con luz; y

(ii) medir la fluorescencia de cada uno de dicha multiplicidad de recipientes.

30 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que dicha multiplicidad de recipientes en la etapa (a1) comprende una multiplicidad de pocillos en una microplaca.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, llevado a cabo en un aparato que comprende:

35 un primer bloque conductor de calor en contacto con una primera pluralidad de muestras proporcionadas en pocillos separados de una placa de microtitulación, comprendiendo cada una de dichas muestras dicha proteína diana y uno o más de una multiplicidad de compuestos diferenciados de una biblioteca de sondas funcionales;

40 un controlador de temperatura acoplado a dicho primer bloque conductor de calor;

una fuente luminosa dispuesta adyacente a dicho primer bloque conductor de calor;

un sensor de emisión de fluorescencia dispuesto adyacente a dicho primer bloque conductor del calor; y

45 medios para procesar una señal de emisión espectral obtenida a partir de dicho sensor de emisión de fluorescencia;

50 en el que la multiplicidad de compuestos diferenciados de la biblioteca de sondas funcionales se compone de una pluralidad de vitaminas, una pluralidad de coenzimas, una pluralidad de compuestos que tienen grupos funcionales de residuos de aminoácidos y miméticos de los mismos, una pluralidad de quelantes de metales, una pluralidad de iones metálicos, una pluralidad de hidratos de carbono, una pluralidad de ácidos nucleicos, una pluralidad de lípidos, una pluralidad de enzimas, una pluralidad de esteroides, una pluralidad de hormonas amínicas, una pluralidad de alcaloides, una pluralidad de moléculas de fármacos genéricos y una pluralidad de productos naturales; y

55 en el que dicha biblioteca de sondas funcionales tiene una diversidad suficiente de compuestos para determinar al menos una función biológica de la proteína diana cuando se prueba la multiplicidad de compuestos de la biblioteca de sondas funcionales usando dicho aparato para determinar su capacidad para desplazar la curva de desplegamiento térmico de la proteína diana y se comparan con una lista de compuestos que se sabe que modifican la estabilidad de un grupo de proteínas con las que comparten la función biológica.

60

65

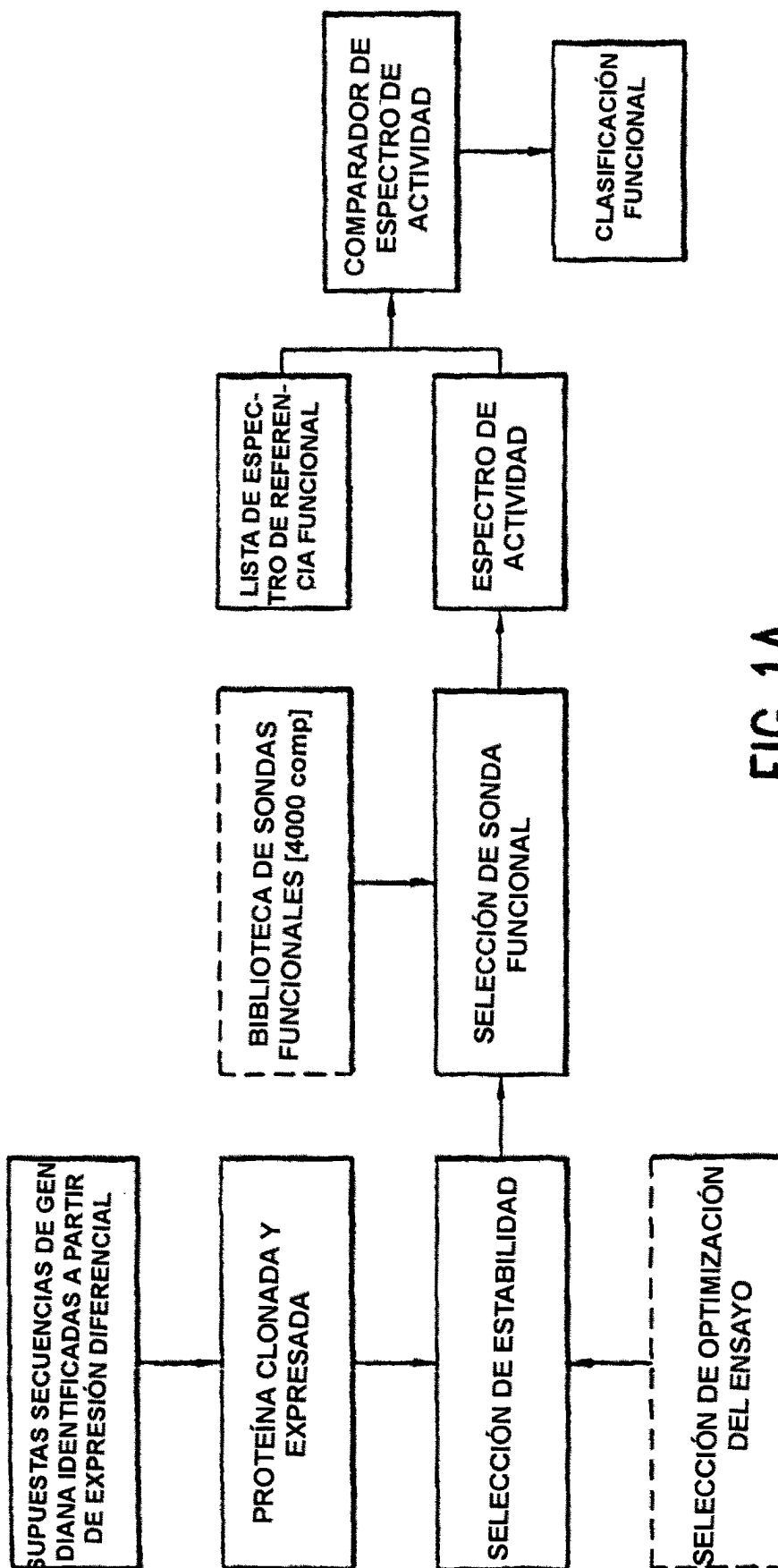


FIG. 1A

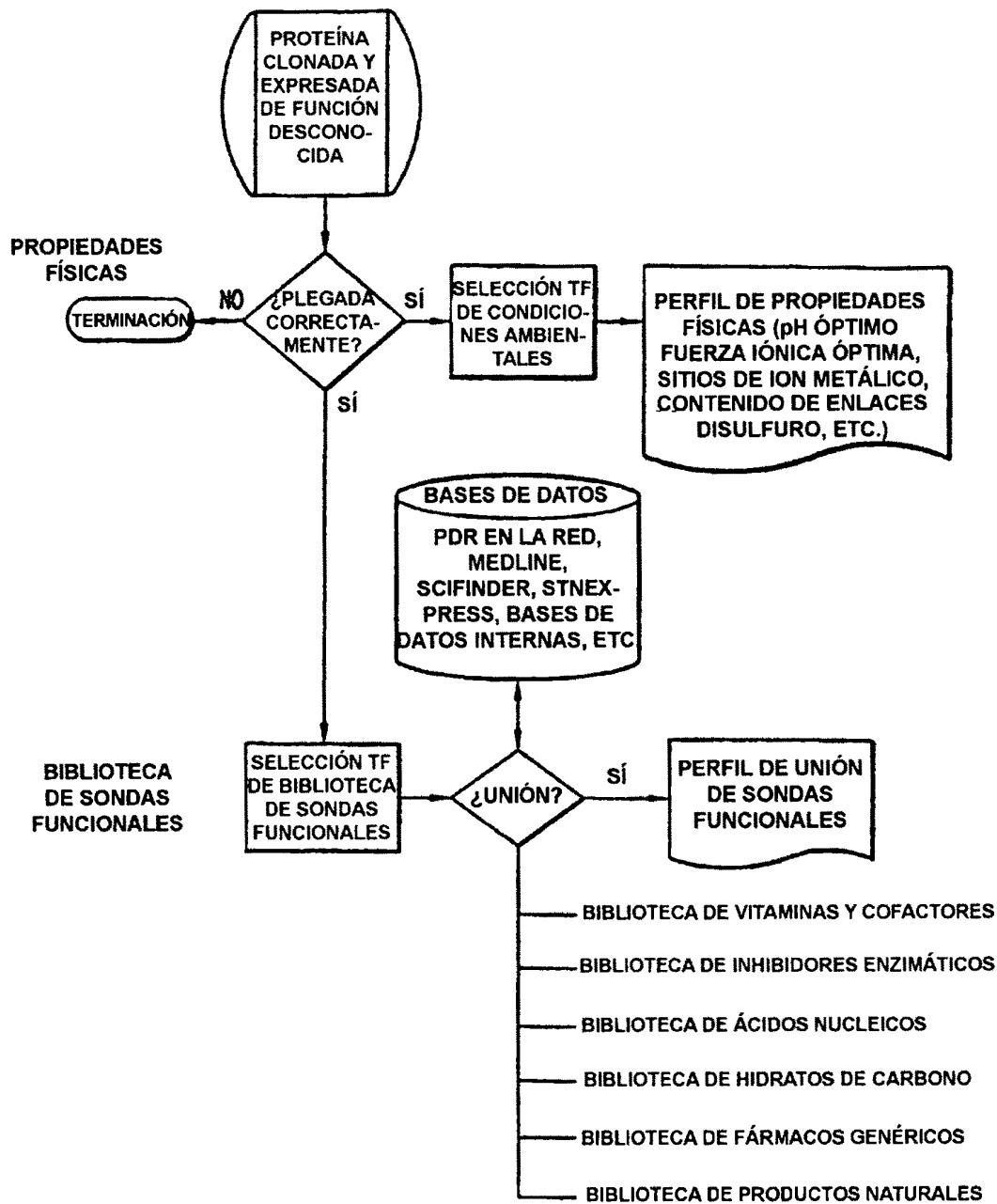


FIG. 1B

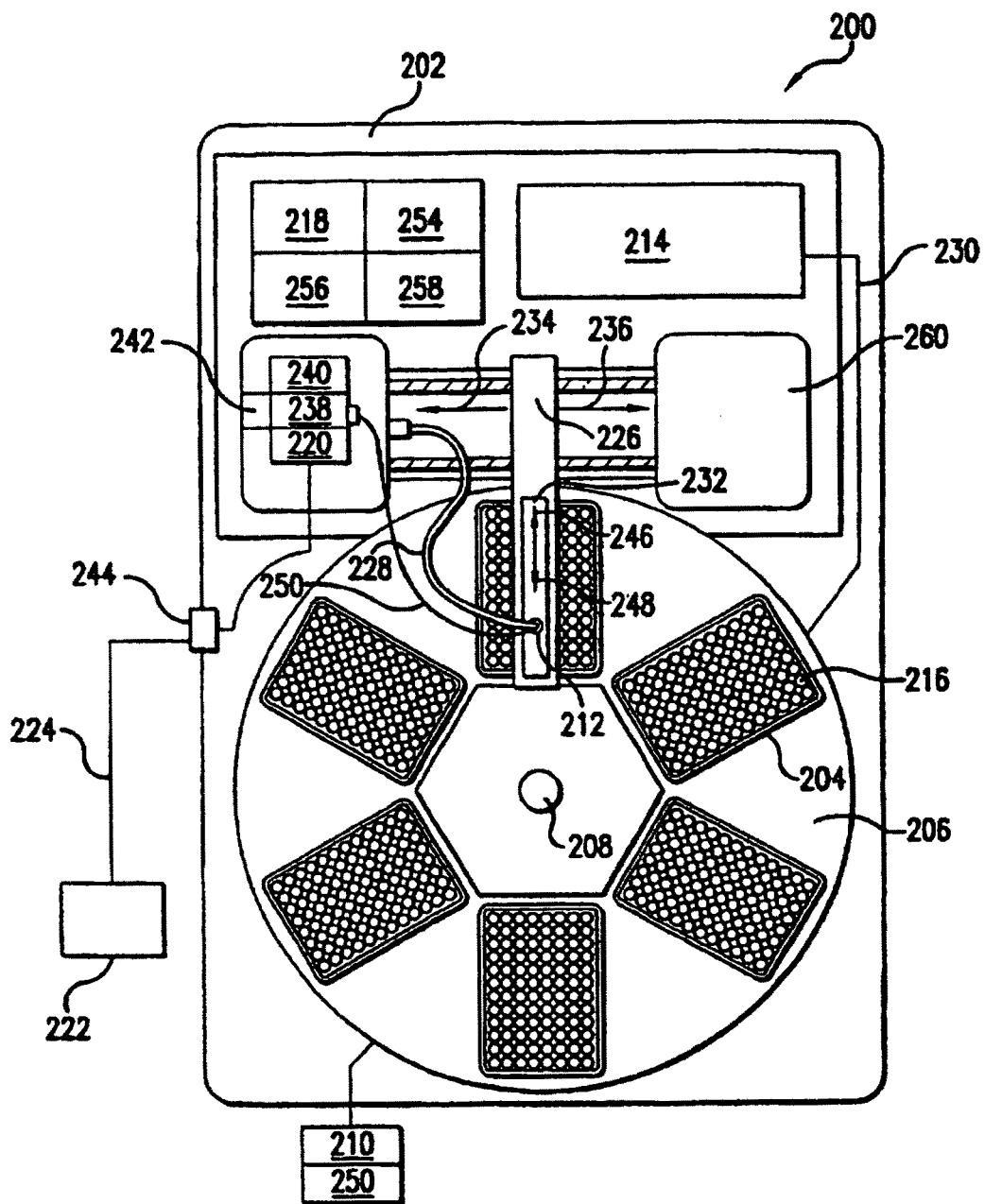


FIG.2

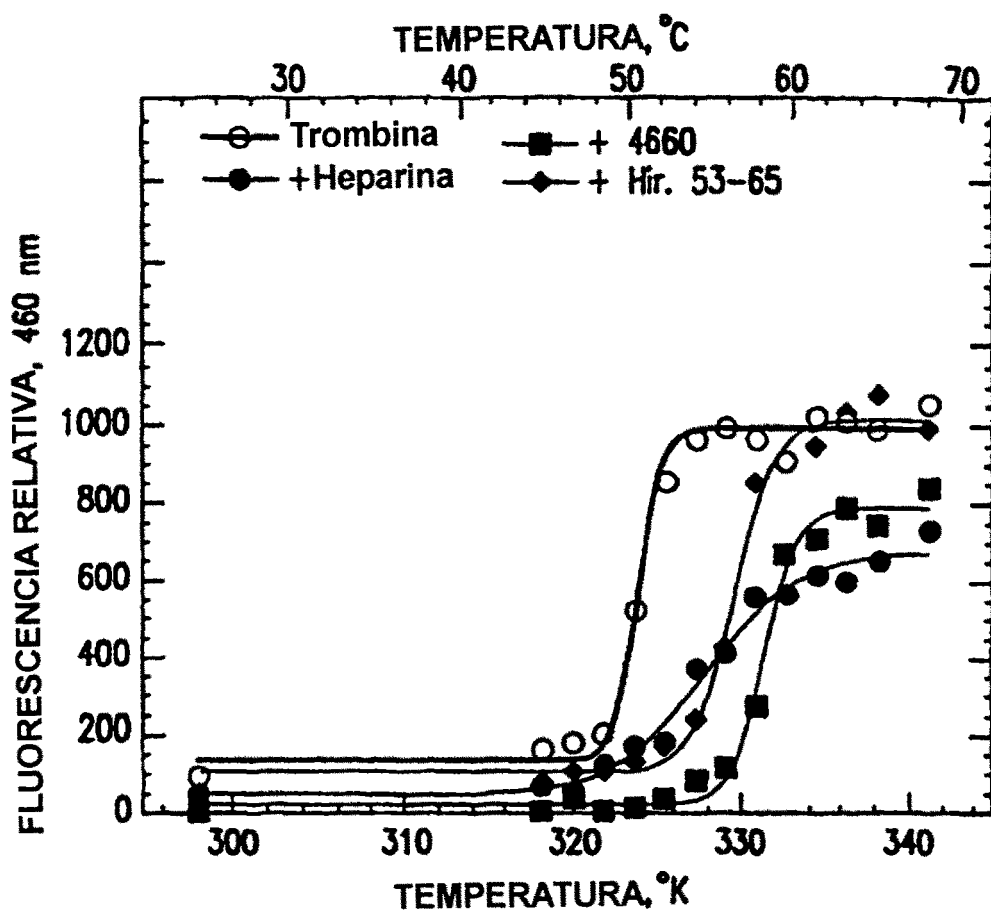


FIG.3

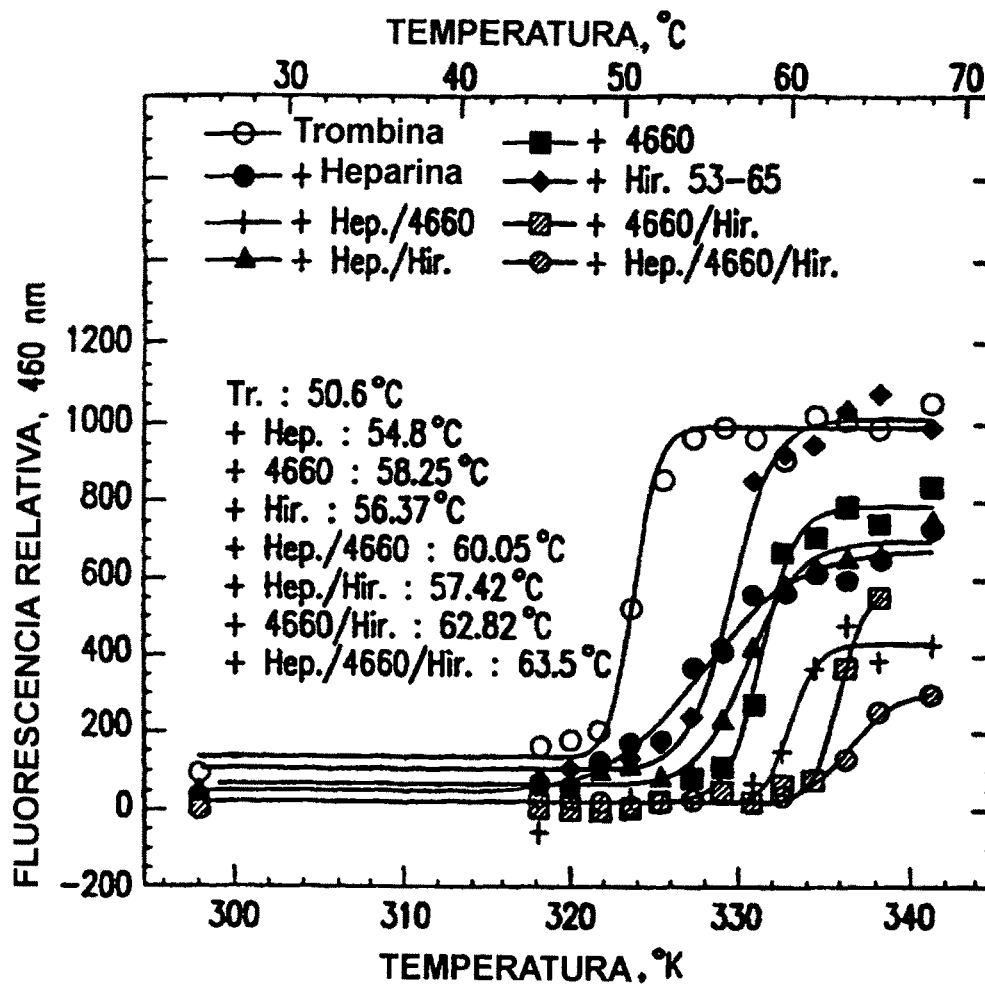


FIG.4

CONTINÚA  
EN LA  
FIG. 5B

	1	2	3	4	5	6
A	1. YODURO DE Na 0,1 M?	2. L-CISTEÍNA 0,01 M	3. EDTA 0,01 M	4. BETA-NICOTINAMIDA ADENOSINA DINUCLEÓTIDO 0,01 M	5. SAL DISÓDICA DE ADENOSINA-5'-TRIFOSFATO 0,01 M	6. D(+)-GLUCOSA MONOHIDRATADA AL 3%
B	13. 1,6-DIAMINO-HEXANO AL 3%	14. 1,8-DIAMINO-OCTANO AL 3%	15 GLICINA 0,1 M	16. Glicil-glicil-glicina 0,01 M	17. TRICLORURO DE HEXAAMINOCBALTO 0,01 M	18. TAURINA 0,01 M
C	25. CLORURO DE Ba 0,01 M	26. CLORURO DE Cd 0,01 M	27. CLORURO DE CA DIHIDRATADO 0,01 M	28. CLORURO COBALTOSO 0,01 M	29. CLORURO CÚPRICO DIHIDRATADO 0,01 M	30. CLORURO DE Mg HEXAHIDRATADO 0,01 M
D	37. ETILENGLICOL AL 3%	38. GLICEROL AL 3%	39. 1,6-HEXANODIOL AL 3%	40. ISOPROPANOL AL 3%	41. METANOL AL 3%	42. MPD AL 3%

CONTINÚA EN LA FIG. 5C

FIG. 5A

	7	8	9	10	11	12
A	7. D(+)-SACAROSA AL 3%	8. XILITOL AL 3%	9. ESPERMIDINA 0,01 M	10. ESPERMINA TETRA-HCI 0,01 M	11. ÁCIDO 6-AMI- NOCAPROICO AL 3%	12. 1,5-DIAMINO- PENTANO di-HCI AL 3%
B	19. BETAÍNA MONOHIDRATADA 0,01 M	20. POLIVINILPIRRO- LIDONA AL 0,5%	21. SULFO-BETAÍNA 195 NO DETERGEN- TE 0,3 M	22. SULFO-BETAÍ- NA 195 NO DETER- GENTE 0,2 M	23. DIMETIL- SULFÓXIDO AL 3%	24. FENOL 0,01 M
C	31. CLORURO DE Mn (II) TETRAHIDRA- TADO 0,01 M	32. CLORURO DE ESTRONCIO I 0,01 M	33. CLORURO DE ITRIO HE; 0,01 M	34. ¿CLORURO DE ZINC 0,01 M?	35. DIOXANO AL 3%	36. ETANOL AL 3%
D	43. PEG 400 AL 5%	44. TRIETILAMINA HCI 0,01 M	45. GUANIDINA HCI 0,1 M	46. UREA 0,01 M	47. 1,2,3-HEPTA- NOTRIOL AL 1,5%	48. BENZAMIDINA HCI AL 2%

CONTINÚA  
DESDE  
LA FIG. 5A

CONTINÚA EN LA FIG. 5D

FIG.5B

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

CONTINÚA DESDE LA FIG. 5A

E	49. EGTA 0,1 M	50. SULFATO DE NH4 0,1 M	51. SULFATO DE NH4 0,5 M	52. FOSFATO DE NH4 0,1 M	53. ACETATO DE NH4 0,1 M	54. SULFATO DE MG 0,1 M
F	61. SULFATO DE Li 0,5 M	62. SULFATO DE Ni 0,1 M	63. TARTRATO DE K 0,1 M	64. CLORURO DE K 0,1 M	65. CLORURO DE K 0,5 M	66. FOSFATO DE K 0,1 M
G	73. FOSFATO DE Na 0,1 M	74. FOSFATO DE Na 0,5 M	75. CACODILATO DE Na 0,1 M	76. PIROFOSFATO DE di-Na 0,01 M	77. TRI-META-FOS-FATO DE Na 0,1 M	78. TRI-POLIFOS-FATO DE Na 0,1 M
H	85. ARGININA 0,1 M	86. GLUTATIÓN 0,01 M	87. ÁCIDO 3-NITRO-BENCENOSULF. 0,1 M	88. DHDТ 0,01 M	89. CICLOHEXIL-AMINA 0,01 M	90. PIPERIDINA 0,01 M

FIG.5C

	7	8	9	10	11	12
E						
F	55. SULFATO DE Mg 0,5 M	56. CLORURO DE Mg 0,1 M	57. ACETATO DE Mg 0,1 M	58. CLORURO DE Li 0,1 M	59. CLORURO DE Li 0,5 M	60. SULFATO DE Li 0,1 M
G	67. SULFATO DE K 0,2 M	68. SULFATO DE K 0,05 M	69. FORMIATO DE Na 0,1 M	70. ACETATO DE Na 0,1 M	71. CLORURO DE Na 0,1 M	72. CITRATO DE Na 0,1 M
H	79. OXALATO 0,1 M	80. MALONATO 0,1 M	81. SUCCINATO 0,1 M	82. ACETATO DE Zn 0,1 M	83. SORBITOL 0,1 M	84. CLORURO DE Ca 0,1 M
	91 MORFOLINA 0,01 M	92 ÁCIDO BENZOICO 0,005 M	93. ÁCIDO BENZOICOSULFÓNICO 0,01 M	94. ÁCIDO BENZOISULFÓNICO 0,01 M	95. ¿CONTROL?	96. ¿CONTROL?

FIG.5D

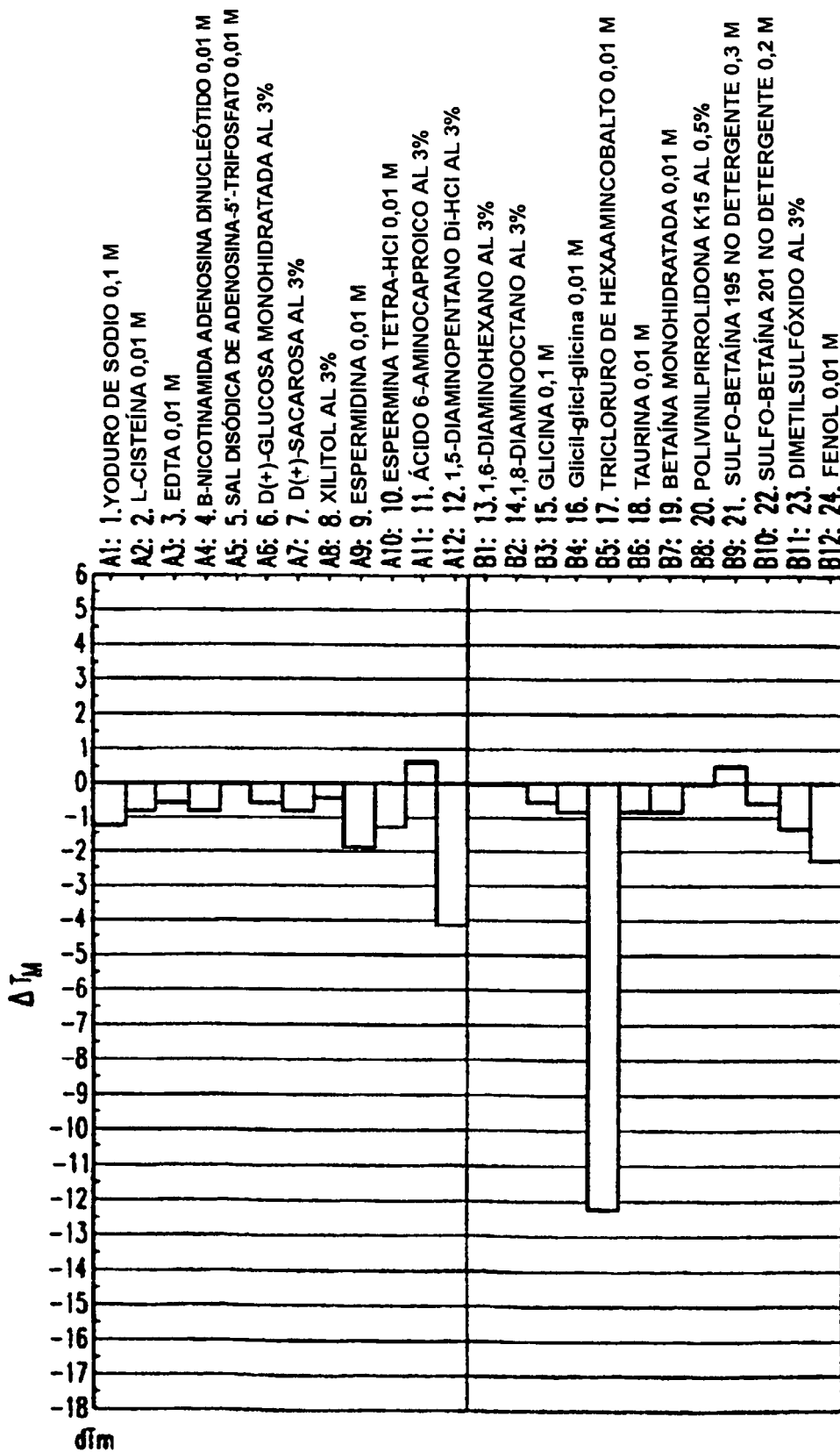


FIG. 6A

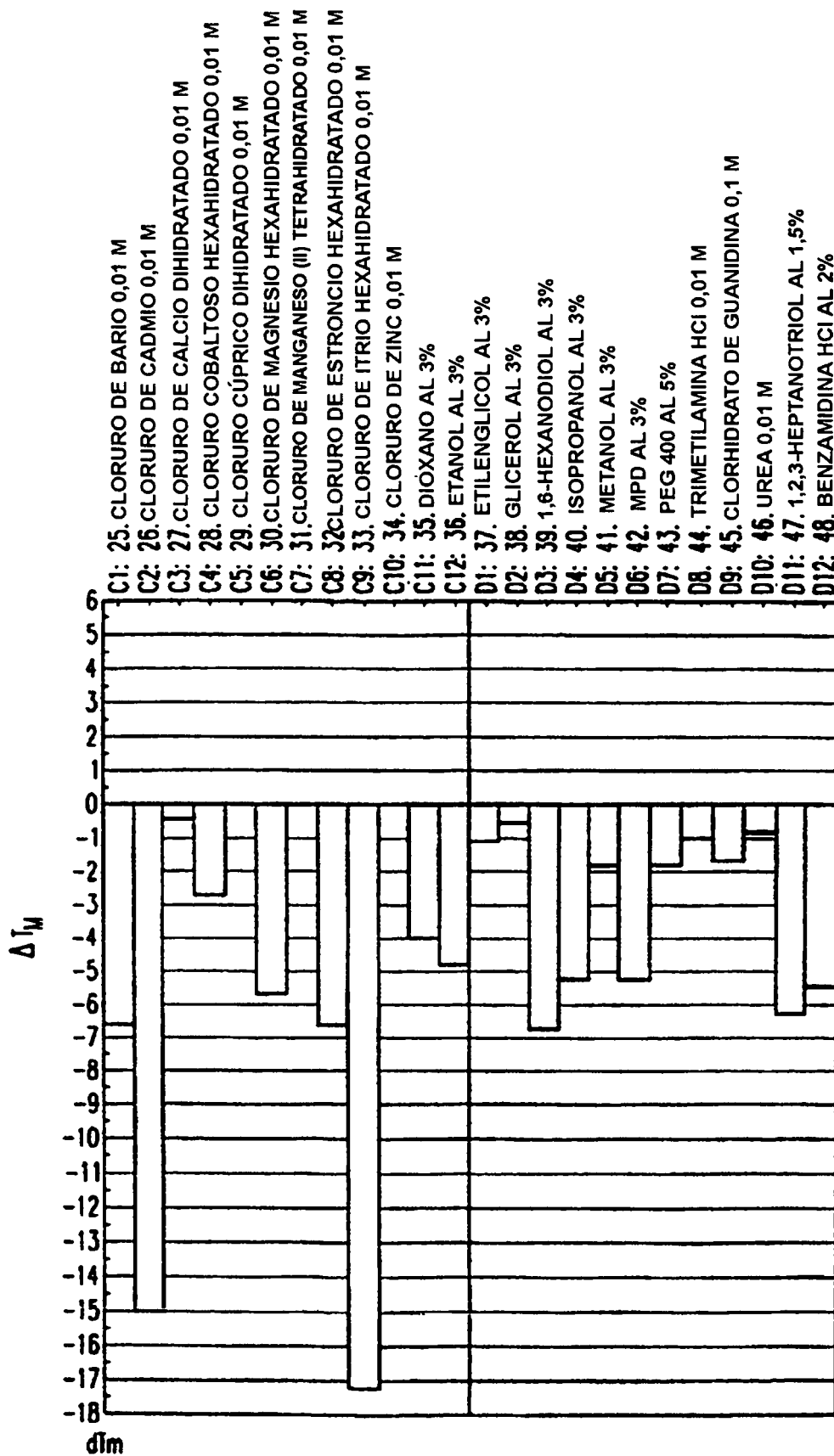


FIG.6B

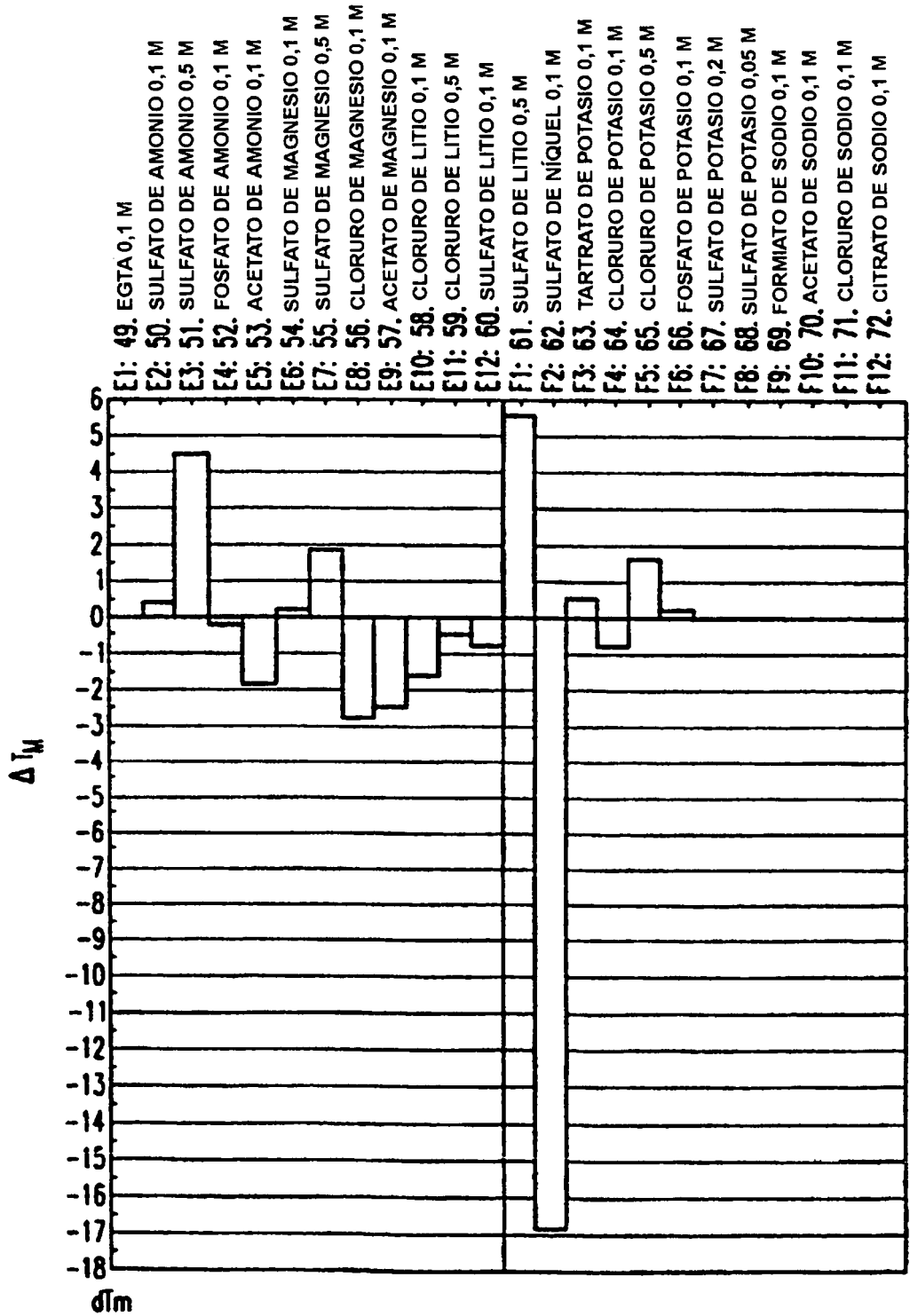


FIG.6C

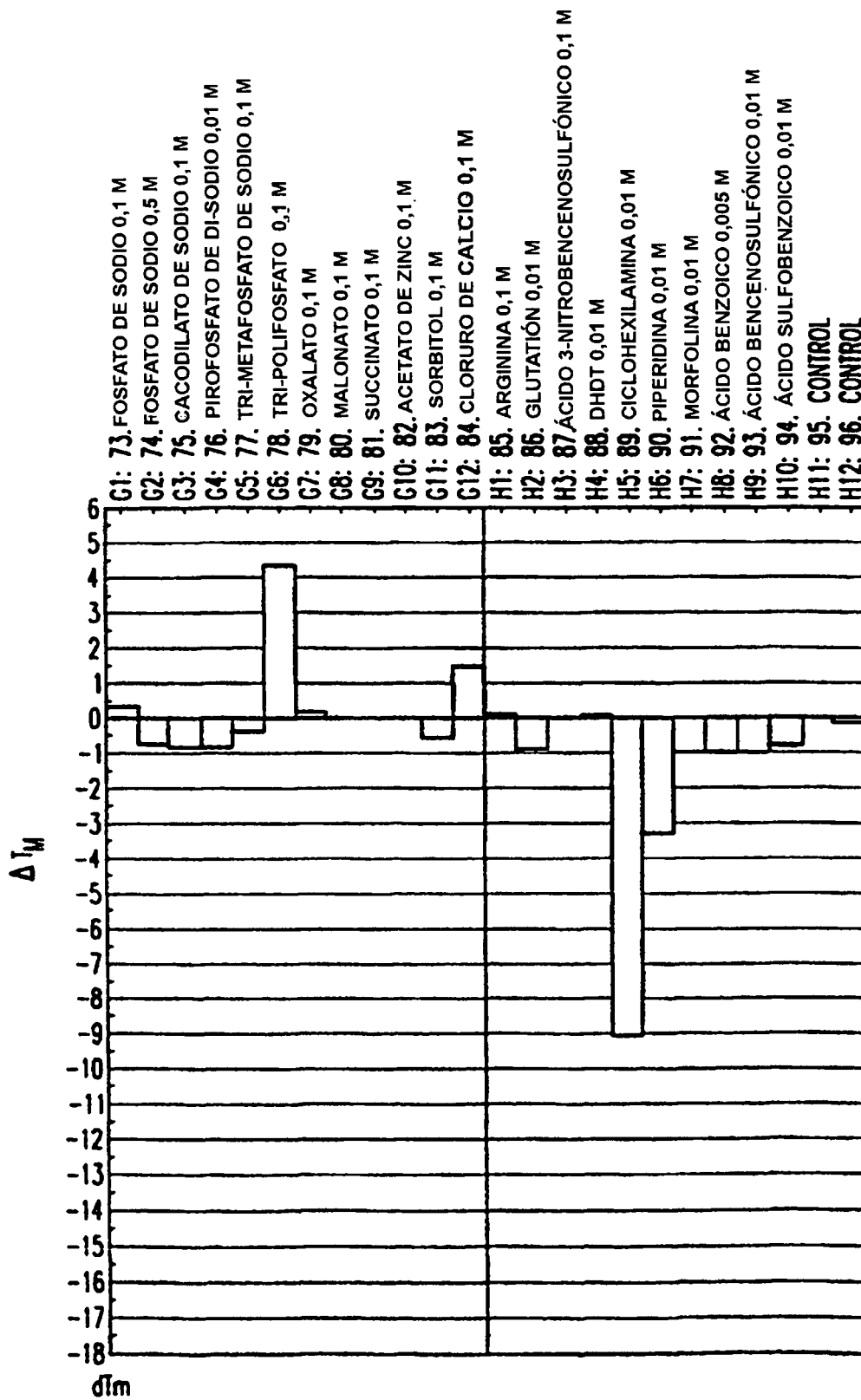


FIG.6D

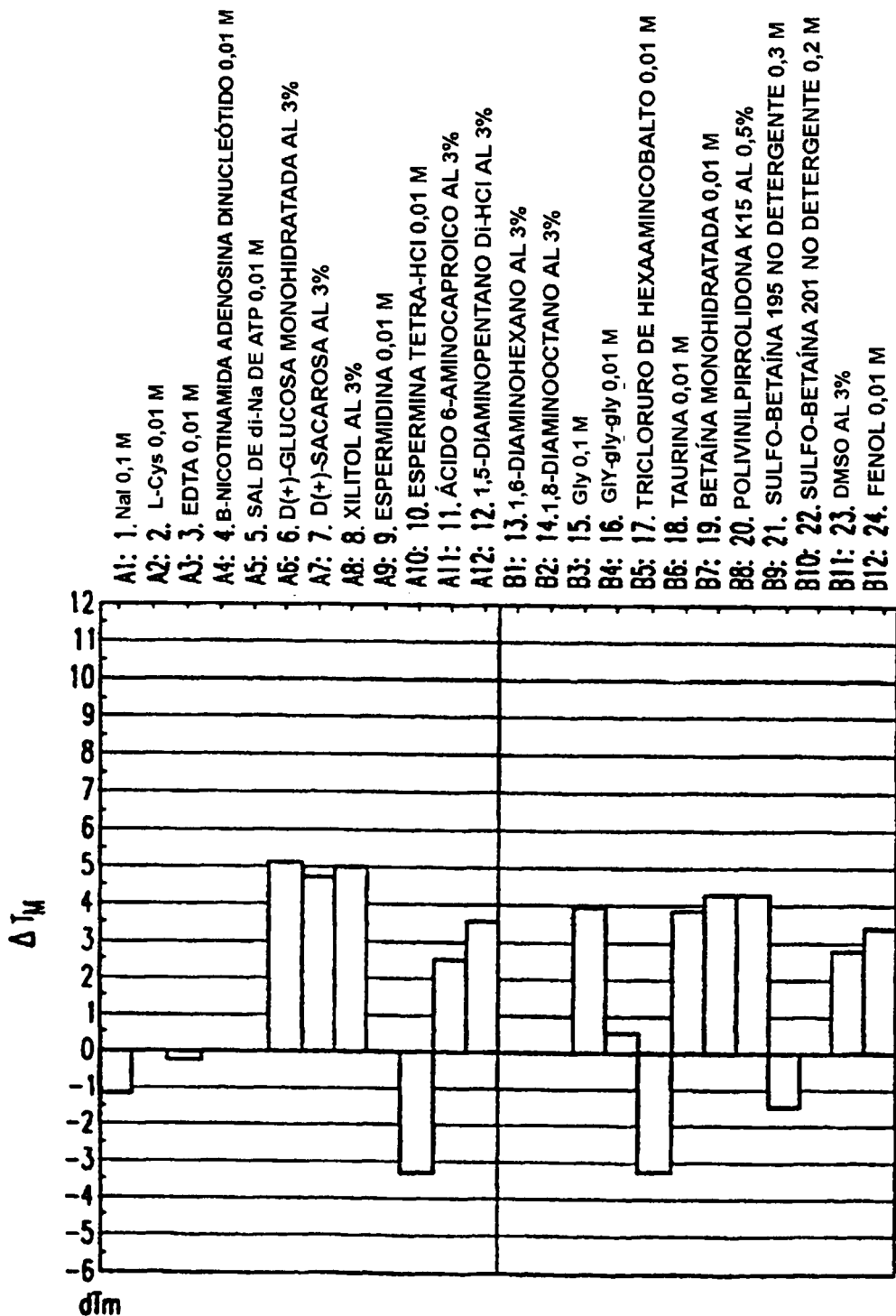


FIG. 7A

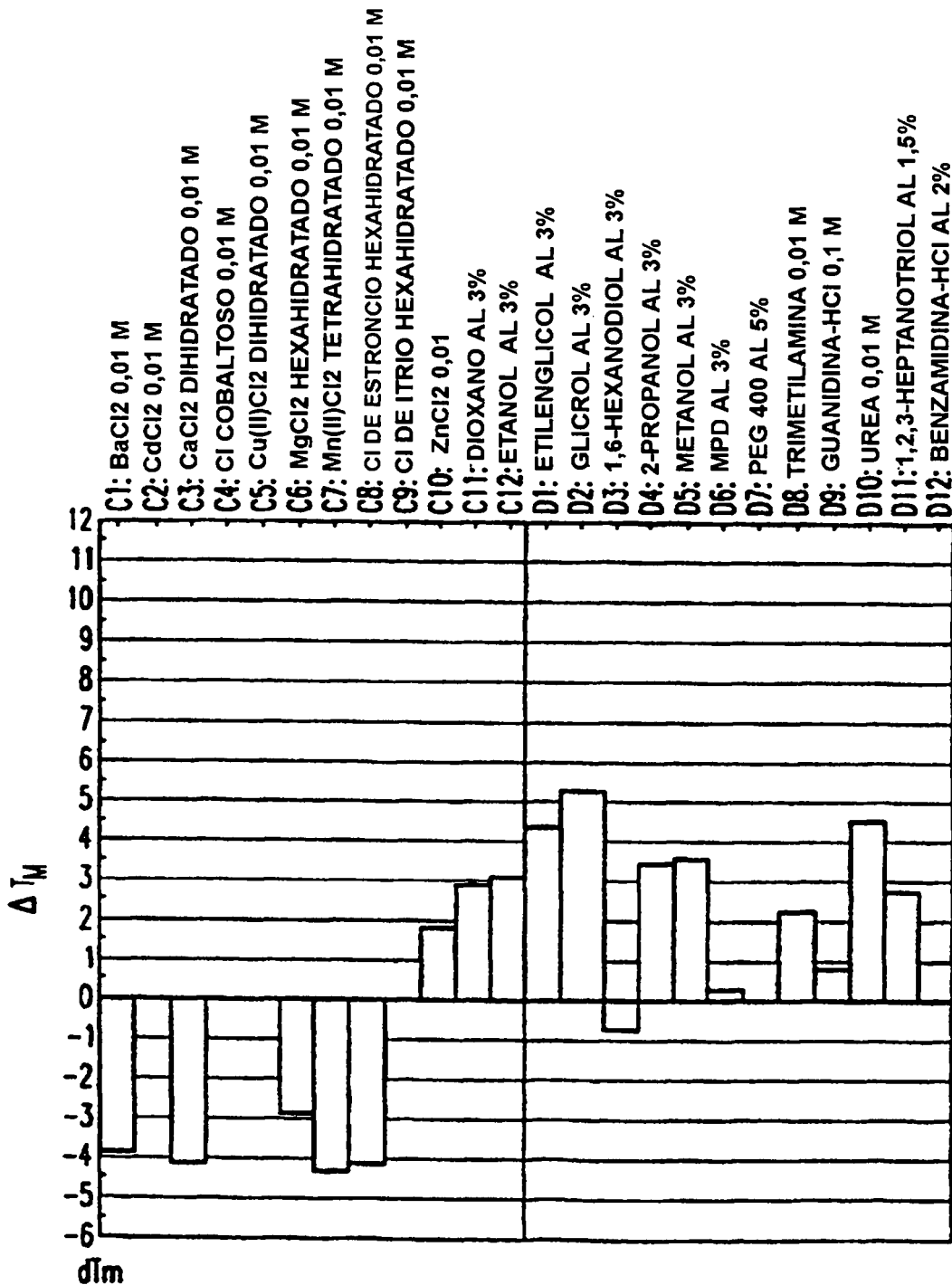


FIG.7B

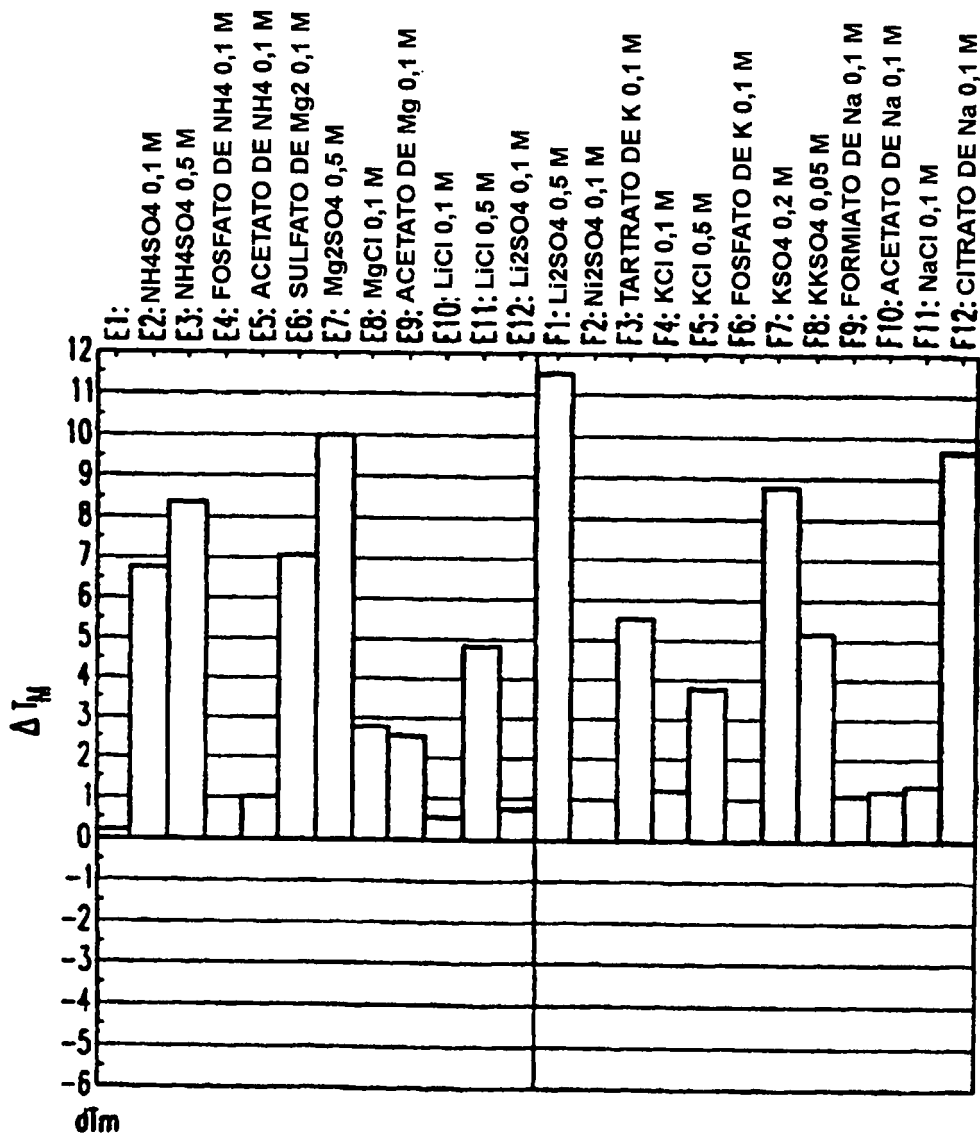
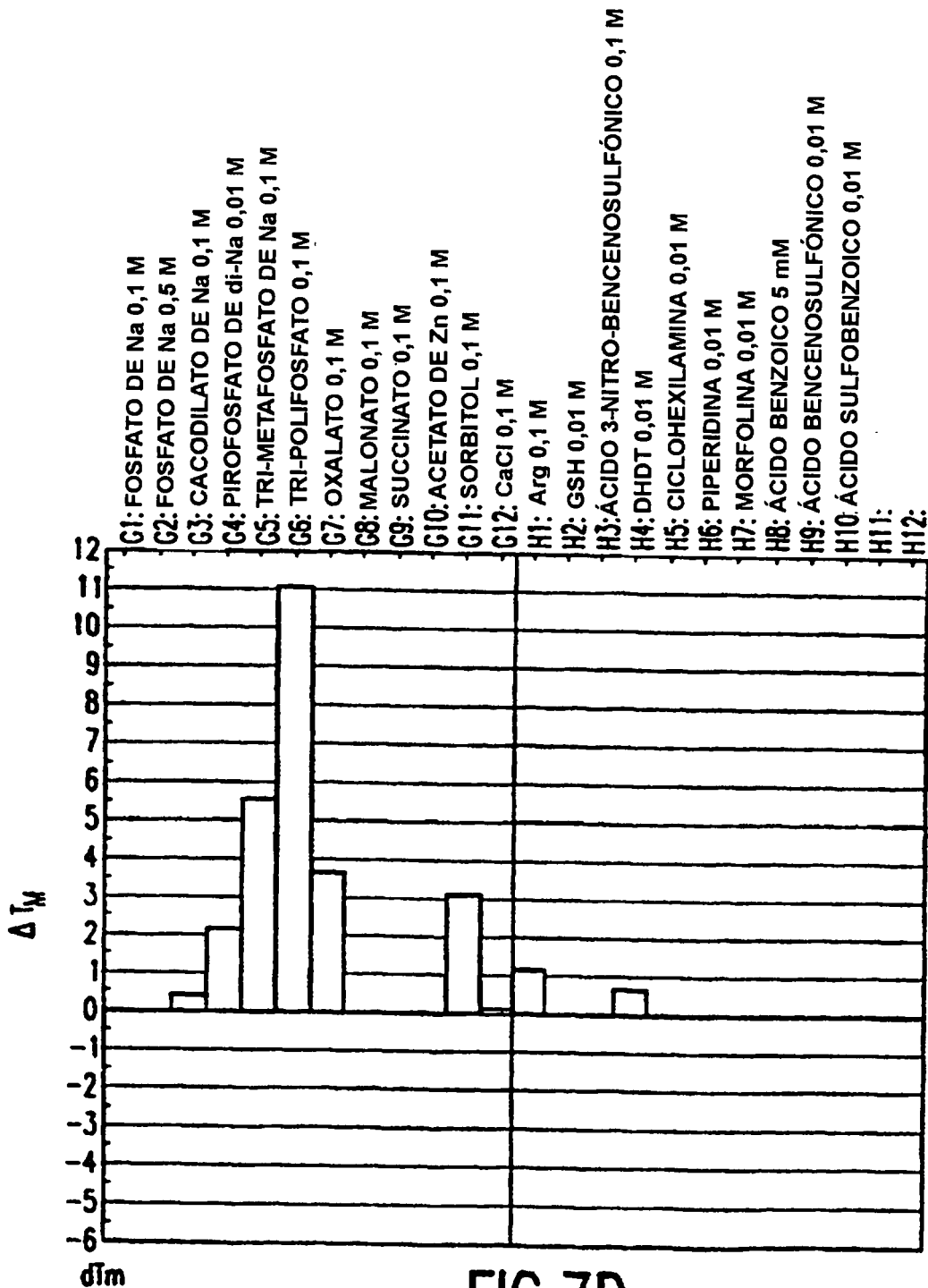


FIG.7C



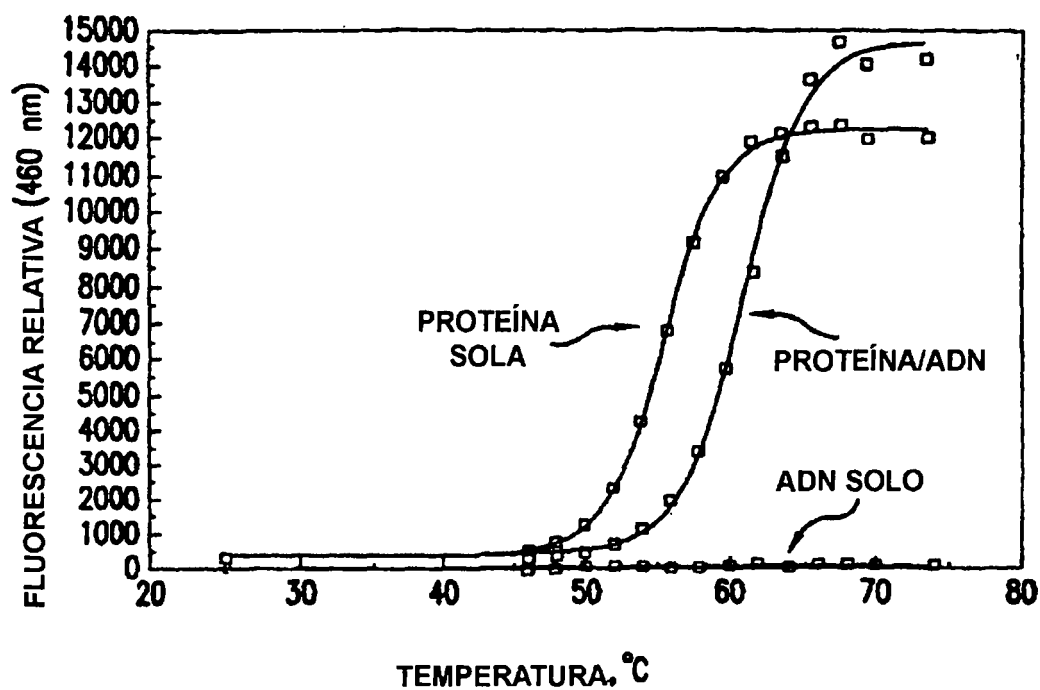


FIG.8

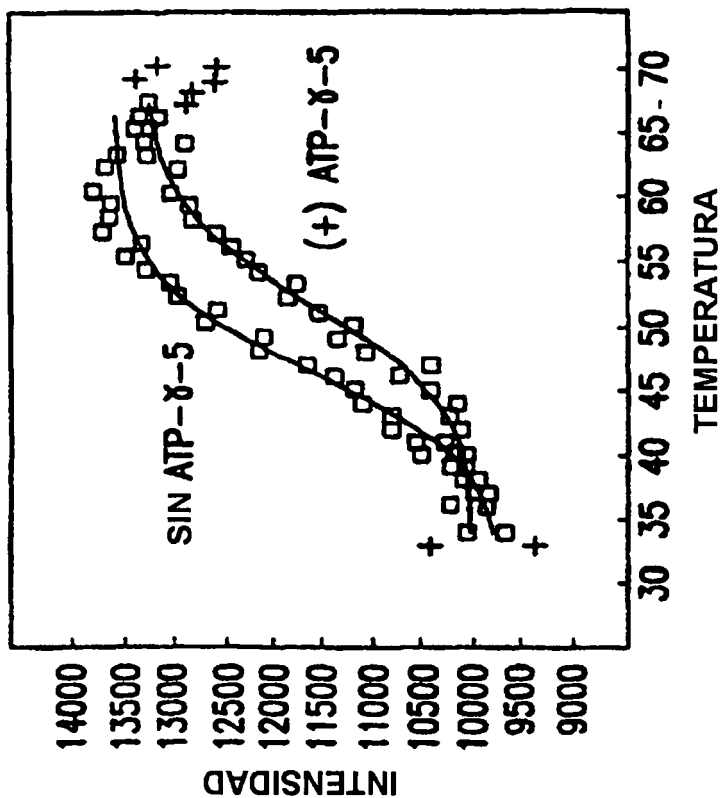


FIG.10

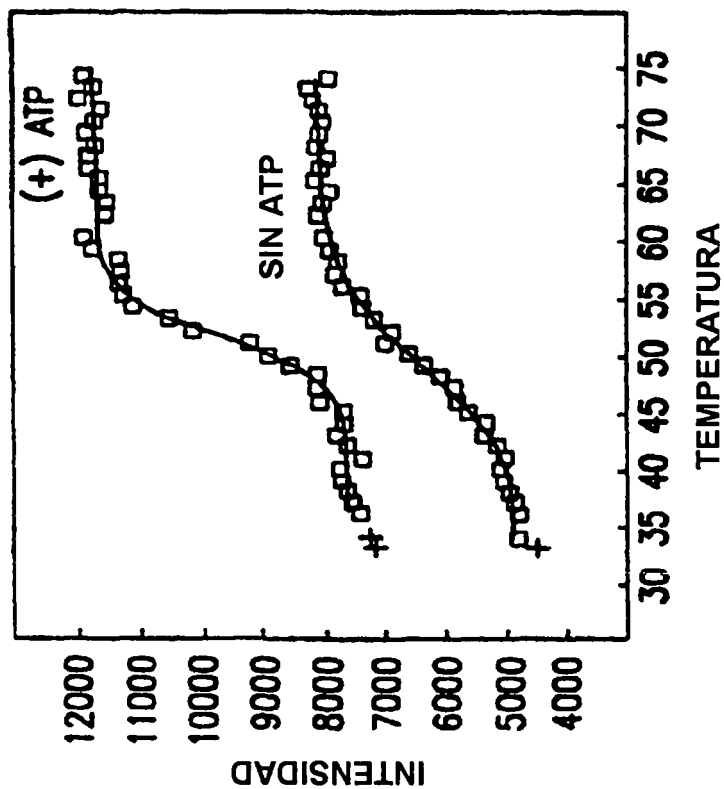


FIG.9

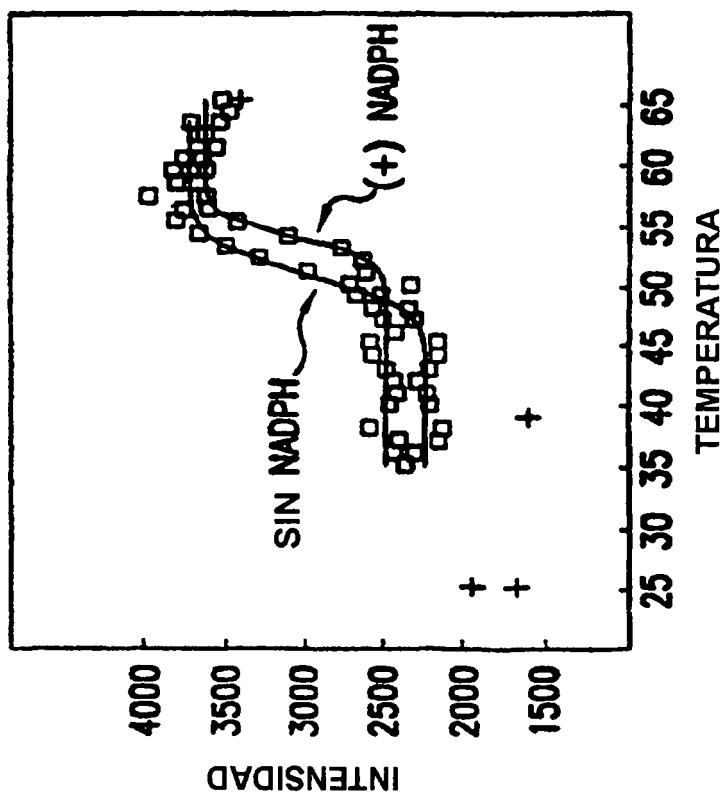


FIG.12

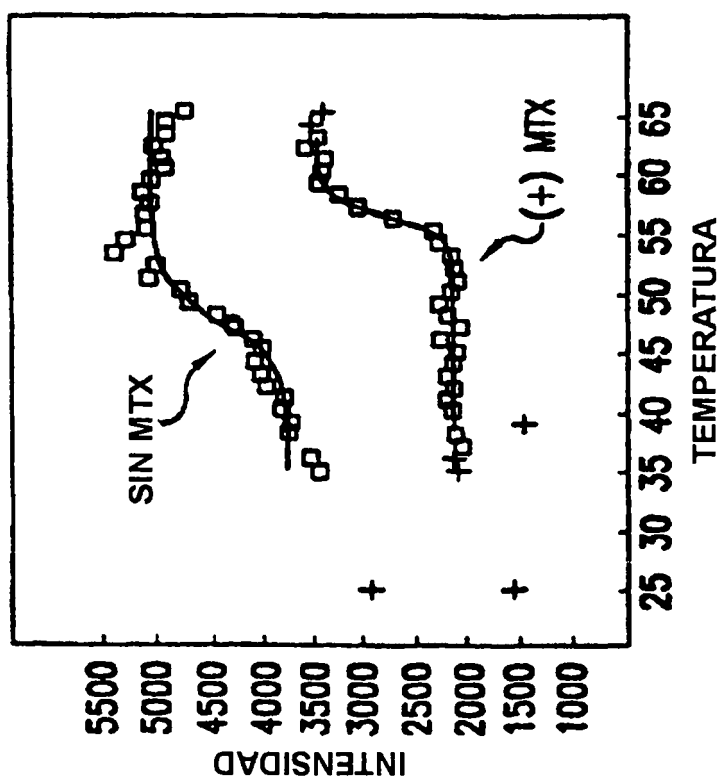


FIG.11