

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 267**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/13** (2006.01)

**C09K 11/06** (2006.01)

**G01N 33/542** (2006.01)

**B22F 1/00** (2012.01)

**C22C 1/05** (2013.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2020 PCT/US2020/036285**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2020 WO20247725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2020 E 20819012 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 3980205**

54 Título: **Sistemas de marcaje basados en proximidad y aplicaciones de los mismos**

30 Prioridad:

**07.06.2019 US 201962858539 P**

**27.02.2020 US 202062982576 P**

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

**07.04.2025**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY**  
**(50.00%)**

**One Nassau Hall**

**Princeton, NJ 08544, US y**

**MRL CAMBRIDGE ESC (50.00%)**

72 Inventor/es:

**MACMILLAN, DAVID, W.C.;**

**GERI, JACOB;**

**WANG, TAO;**

**OAKLEY, JAMES;**

**REYES-ROBLES, TAMARA;**

**OSLUND, ROB, C.;**

**FADEYI, OLUGBEMINIYI, O.;**

**PARKER, DANN, LEROY;**

**RODRIGUEZ-RIVERA, FRANCES, PAOLA y**

**MCCARVER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 3 011 267 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

Sistemas de marcaje basados en proximidad y aplicaciones de los mismos

**Datos de solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica prioridad según el Artículo 8 del Tratado de Cooperación de Patentes, para la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Número de Serie 62/858.539 presentada el 7 de junio de 2019 y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Número de Serie 62/982.576 presentada el 27 de febrero de 2020.

**Campo**

La presente invención se refiere a técnicas de marcaje basadas en proximidad y, en particular, a composiciones y métodos que permiten el marcaje de alta resolución de proteínas en entornos celulares.

10 **Antecedentes**

El marcaje por proximidad de proteínas ha surgido como un enfoque potente para el perfilado de redes de interacción de proteínas. La capacidad de marcar proteínas asociadas o circunstantes a través del marcaje por proximidad puede tener implicaciones importantes en la comprensión adicional del entorno celular y el papel biológico de una proteína de interés. Los métodos de marcaje por proximidad actuales implican todos, el uso de generación basada en enzimas de intermedios reactivos que marcan proteínas vecinas en unos pocos residuos de aminoácidos seleccionados a través de difusión o contacto físico. A pesar del impacto transformativo de esta tecnología, la estabilidad inherente de estos intermedios reactivos tales como radicales fenoxi ( $t_{1/2} > 100 \mu\text{s}$ ) a través de activación con peroxidasa o biotina-AMP ( $t_{1/2} > 60 \text{ s}$ ) a través de biotina ligasas pueden promover la difusión lejos de su punto de origen. Como resultado, estos intermedios reactivos generados por enzimas plantean un reto para el perfilado dentro de microentornos estrechos. Además, el gran tamaño de las enzimas, la dependencia de ciertos aminoácidos para el marcaje, y la incapacidad para controlar temporalmente estos sistemas de marcaje presentan retos adicionales para el perfilado dentro de regiones espaciales confinadas. Dadas estas limitaciones, se necesitan nuevos enfoques para el marcaje basado en proximidad.

**Compendio**

25 En un aspecto, en la presente memoria se describen composiciones y métodos para proporcionar una plataforma de mapeo del microentorno operativa para identificar selectivamente diversas características, incluyendo interacciones proteína-proteína en membranas celulares. En algunas realizaciones, una composición comprende un catalizador y un agente marcador de proteínas, en donde el catalizador activa el agente marcador de proteínas a un intermedio reactivo. El catalizador, en algunas realizaciones, puede tener una estructura electrónica para permitir la transferencia de energía al agente marcador de proteínas para formar el intermedio reactivo. El intermedio reactivo reacciona o se reticula con una proteína u otra biomolécula dentro del radio de difusión del intermedio reactivo. Si una proteína u otra biomolécula no está dentro del radio de difusión, el intermedio reactivo se inactiva por el entorno acuoso o de base acuosa circundante. Como se describe adicionalmente en la presente memoria, el radio de difusión del intermedio reactivo puede adaptarse a consideraciones de mapeo del microentorno específicas, y puede limitarse a la escala nanométrica. En algunas realizaciones, por ejemplo, el radio de difusión puede ser menor de 10 nm o menor de 5 nm. Además, en algunas realizaciones, el intermedio reactivo puede tener una semivida de menos de 5 ns. En algunas realizaciones, un agente marcador de proteínas puede funcionalizarse con un marcador, tal como biotina o marcadores luminiscentes para ayudar en el análisis. Puede emplearse cualquier catalizador operable para participar en la transferencia de energía con el agente marcador de proteínas para proporcionar el intermedio reactivo. En algunas realizaciones, se usa un catalizador de metal de transición. Alternativamente, se puede usar un órgano catalizador que no sea de metal de transición. La transferencia de energía desde el catalizador al agente marcador de proteínas puede producirse a través de una variedad de mecanismos descritos adicionalmente en la presente memoria, incluyendo la transferencia de energía Dexter.

45 En otro aspecto, en la presente memoria se describen conjugados para marcaje basado en proximidad. Un conjugado comprende un catalizador acoplado a un agente de unión biomolecular. El catalizador puede tener una estructura electrónica para la transferencia de energía a un agente marcador de proteínas para la generación de un intermedio reactivo como se ha descrito anteriormente. El agente de unión biomolecular, en algunas realizaciones, se puede usar para localizar selectivamente o dirigir el catalizador a un entorno específico para el mapeo. El agente de unión biomolecular, por ejemplo, localiza el catalizador en el entorno celular deseado para el marcaje por proximidad y el análisis asociado. El agente de unión biomolecular puede comprender una proteína, polisacárido, ácido nucleico o lípido, en algunas realizaciones. En algunos casos, el agente de unión biomolecular puede comprender un sistema de visualización multivalente que comprende una proteína, polisacárido, ácido nucleico o lípido. Además, el agente de unión biomolecular también puede ser un ligando de molécula pequeña con una afinidad de unión específica por una proteína diana.

55 En otro aspecto, en la presente memoria se describen sistemas para marcaje basado en proximidad. Un sistema, en algunas realizaciones, comprende un conjugado que incluye un catalizador acoplado a un agente de unión biomolecular, y un agente de marcaje de proteínas activado por el catalizador para unirse a una proteína. El conjugado

y el agente marcador de proteínas pueden tener cualquier composición y/o propiedades descritas anteriormente y en la siguiente descripción detallada.

En un aspecto adicional, en la presente memoria se describen métodos de marcaje basado en proximidad. Un método de marcaje basado en proximidad comprende proporcionar un catalizador y activar un agente de marcaje de proteínas a un intermedio reactivo con el catalizador. El intermedio reactivo se acopla o se une a una proteína. En algunas realizaciones, el catalizador se acopla a un agente de unión biomolecular para localizar selectivamente o dirigir el catalizador a un entorno específico para el mapeo de proteínas junto con el agente marcador de proteínas. El catalizador, conjugado y agente marcador de proteínas pueden tener la composición y/o propiedades descritas anteriormente y en la siguiente descripción detallada.

Estas y otras realizaciones se describen adicionalmente en la siguiente descripción detallada.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra la transferencia de energía entre un fotocatalizador de iridio de Fórmula (I) y un agente marcador de proteínas de diazirina, según algunas realizaciones descritas en la presente memoria.

La FIG. 2 ilustra diversas diazirinas que pueden funcionar para formar intermedios reactivos a través de la transferencia de energía desde un fotocatalizador de metal de transición para marcaje de proteínas u otras biomoléculas, según algunas realizaciones.

La FIG. 3 ilustra un mecanismo de reacción para el marcaje de proteínas basado en flavina según algunas realizaciones.

La FIG. 4 ilustra varios fotocatalizadores de metales de transición de Fórmula (I) que tienen una funcionalidad reactiva para acoplar un agente de unión biomolecular.

La FIG. 5 ilustra varios fotocatalizadores de metales de transición de Fórmula (I) que forman un conjugado con un agente de unión biomolecular según algunas realizaciones.

La FIG. 6A ilustra el funcionamiento de los sistemas y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria según algunas realizaciones.

La FIG. 6B ilustra el funcionamiento de los sistemas y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria para la identificación y validación de receptores acoplados a proteína G de membrana (GPCR) según algunas realizaciones.

La FIG. 7A ilustra el marcaje de proteínas con carbenos generados mediante sensibilización con diazirina con fotocatalizador según algunas realizaciones.

La FIG. 7B ilustra el fotocatalizador de Ir empleado en el esquema de reacción de la FIG. 7A.

La FIG. 8A ilustra el marcaje basado en proximidad dirigido a conjugado de VEGFR2-Fc o EGFR-Fc en perlas de agarosa que muestran el marcaje de proteínas espacialmente selectivo de VEGFR2-Fc o EGFR-Fc.

La FIG. 8B ilustra la no selectividad del marcaje dirigido por anticuerpos primarios de VEGFR2 o EGFR unidos a perlas de agarosa con conjugados de HRP-anticuerpo secundario.

La FIG. 9A ilustra el  $\mu$ mapeo dirigido a CD45 en células Jurkat y análisis de transferencia Western asociado.

La FIG. 9B ilustra  $\mu$ mapeo de CD45, CD29 o CD47 en células Jurkat que dan como resultado el enriquecimiento de conjuntos únicos de proteínas, que incluían agentes que interactúan tanto conocidos (CD29:CD49D, CD45:CD45AP:CD2) como previamente desconocidos.

La FIG. 9C ilustra los resultados de los métodos de marcaje basados en proximidad con peroxidasa del estado de la técnica donde CD45 de la superficie celular y las proteínas asociadas no se resolvieron de CD29 o CD47.

La FIG. 10A ilustra el uso de conjugados y agentes de marcaje de proteínas descritos en la presente memoria para el  $\mu$ mapeo de del microentorno de PD-L1 según algunas realizaciones.

La FIG. 10B ilustra el análisis de secuencias de proteínas enriquecidas de manera convergente resultantes del  $\mu$ -mapeo del microentorno de PD-L1, según algunas realizaciones.

La FIG. 11A ilustra el marcaje *trans* o *cis* con composiciones y métodos descritos en la presente memoria mediante direccionamiento intra/extrasináptico según algunas realizaciones.

La FIG. 11B es un análisis de citometría de flujo del direccionamiento de anticuerpos de PD-L1 en células B JY-PD-L1 con composiciones de  $\mu$ mapeo descritas en la presente memoria usando irradiación de luz de 10 minutos

en relación con el marcaje dirigido basado en peroxidasa según algunas realizaciones.

La FIG. 11C es un análisis de citometría de flujo del direccionamiento de anticuerpos de CD45RO en células T Jurkat con composiciones de  $\mu$ mapeo descritas en la presente memoria usando irradiación de luz de 10 minutos en relación con el marcaje dirigido basado en peroxidasa según algunas realizaciones.

5 La FIG. 11D proporciona imágenes de microscopía confocal de sistema de dos células que ilustran el marcaje selectivo por composiciones de  $\mu$ mapeo descritas en la presente memoria en relación con el marcaje dirigido no selectivo basado en peroxidasa según algunas realizaciones.

La FIG. 12A ilustra el marcaje de proteínas basado en perlas empleando un conjugado de flavina de anticuerpo secundario según algunas realizaciones.

10 La FIG. 12B es un análisis de transferencia Western de biotilación de CD45 dependiente de luz para los puntos de tiempo indicados, según algunas realizaciones.

La FIG. 12C es un esquema del marcaje de células dirigidas a CD45RO o CD45RA en poblaciones de células T mixtas según algunas realizaciones.

15 La FIG. 12D es un análisis de citometría de flujo del curso temporal de fotomarcaje de biotilación de células T CD45RA+ o CD45RO+, según algunas realizaciones.

La FIG. 13A es un esquema que representa el marcaje por fotoproximidad de CD45 en células Jurkat con conjugado de flavina de anticuerpo secundario (AFC) según algunas realizaciones.

La FIG. 13B es un análisis de transferencia Western del marcaje dirigido a CD45 de las células Jurkat de la FIG. 13A.

20 La FIG. 13C es una imagen confocal de células con marcaje dirigido a CD45 que indica que la biotilación está confinada a la superficie celular y depende del tiempo de exposición a la luz.

La FIG. 13D proporciona gráficos de volcán de significancia frente a veces de enriquecimiento para biotilación dirigida frente a dirigida al isotipo de CD45 en células Jurkat.

25 La FIG. 14A es un esquema que representa el marcaje por fotoproximidad de PDL1 en células JY-PDL1 con conjugado de flavina de anticuerpo secundario (AFC) según algunas realizaciones.

La FIG. 14B proporciona gráficos de volcán de significación frente a veces de enriquecimiento para biotilación dirigida frente a dirigida al isotipo de PDL1 en células Raji que expresan PDL1.

La FIG. 14C es un diagrama de Venn de proteínas significativamente enriquecidas identificadas a partir del marcaje dirigido a PDL1 en células JY y Raji que expresan PDL1.

30 La FIG. 14D es una lista de proteínas significativamente enriquecidas identificadas a partir de direccionamiento a PDL1 en células JY y Raji con función relacionada con PDL1 conocida.

La FIG. 14E es una red de interacción de proteínas de cadena y análisis de términos GO de proteínas significativamente enriquecidas para experimentos dirigidos a PDL1.

35 La FIG. 15A es un esquema que representa un sistema de dos células que consiste en células Jurkat y Raji modificadas por ingeniería según algunas realizaciones.

La FIG. 15B es un análisis de citometría de flujo en donde la biotilación se detecta tanto en células Raji como Jurkat con direccionamiento a PDL1 usando el conjugado de anticuerpo flavina (AFC), pero no se detecta usando direccionamiento de isotipo o en ausencia de irradiación de luz visible.

40 La FIG. 15C es la imagen de microscopía confocal del sistema de dos células Raji-Jurkat con direccionamiento a PDL1 en células Raji que revela el marcaje en células Raji como en puntos de contacto celular en células Jurkat usando el AFC.

La FIG. 15D es un esquema que representa un sistema de dos células que consiste en células Jurkat y Raji modificadas por ingeniería según algunas realizaciones.

45 La FIG. 15E es un análisis de citometría de flujo en donde el marcaje dirigido de CD45RO en células Jurkat (que se sabe que se excluyen de la sinapsis) dio como resultado bajos niveles de marcaje transcelular Raji usando un AFC y marcaje casi cuantitativo cuando se usó HRP.

La FIG. 16 ilustra la configuración experimental y los resultados, incluyendo el conjugado sulfonamida-iridio y diazirina etiquetada con biotina, para el marcaje selectivo de anhidrasa carbónica con conjugados basados en moléculas pequeñas según algunas realizaciones.

La FIG. 17 detalla la capacidad de los conjugados ligando-iridio para marcar sus dianas proteicas correspondientes por su selectividad frente a BSA según algunas realizaciones.

La FIG. 18 ilustra la identificación de la interacción proteína-proteína con composiciones y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria, según algunas realizaciones.

5 La FIG. 19 ilustra la identificación de la interacción proteína-proteína con composiciones y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria, según algunas realizaciones.

La FIG. 20 ilustra la identificación de la interacción proteína-proteína con composiciones y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria, según algunas realizaciones.

La FIG. 21 ilustra un conjugado A<sub>2aR</sub>-Ir y conjugado A<sub>2aR</sub>-diazirina según algunas realizaciones.

10 La FIG. 22 ilustra un método de marcaje fotocatalítico descrito en la presente memoria que muestra un enriquecimiento de 3 log<sub>2</sub> veces de cambio para ADORA2A y ausencia de enriquecimiento estadístico cuando se usa la diazirina estequiométrica, ADORA2A.

La FIG. 23 ilustra un conjugado hGPR40-Ir y Díaz-PEG3-Bt según algunas realizaciones.

15 Las FIG. 24A y 24B son resultados de transferencia Westen del marcaje de hGPR40 mediante composiciones y métodos descritos en la presente memoria, según algunas realizaciones.

### Descripción detallada

20 Las realizaciones descritas en la presente memoria pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada y ejemplos y sus descripciones anteriores y siguientes. Sin embargo, los elementos, aparatos y métodos descritos en la presente memoria no se limitan a las realizaciones específicas presentadas en la descripción detallada y los ejemplos. Debe reconocerse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios de la presente invención. Numerosas modificaciones y adaptaciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance de la invención reivindicada.

#### Definiciones

25 El término "alquilo", como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado lineal o ramificado opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes. Por ejemplo, un alquilo puede ser C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub> o C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>.

El término "arilo", como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes del anillo.

30 El término "heteroarilo", como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o multicíclico en donde uno o más de los átomos del anillo es un elemento distinto del carbono, tal como nitrógeno, boro, oxígeno y/o azufre.

35 El término "heterociclo", como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a un sistema de anillo mono o multicíclico en donde uno o más átomos del sistema de anillo es un elemento distinto del carbono, tal como boro, nitrógeno, oxígeno y/o azufre o fósforo y en donde el sistema de anillo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes del anillo. El sistema de anillo heterocíclico puede incluir anillos aromáticos y/o no aromáticos.

El término "alcoxi", como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere al resto RO-, donde R es alquilo, alquenilo o arilo definido anteriormente.

El término "halo", como se usa en la presente memoria, solo o en combinación, se refiere a elementos del Grupo VIIA de la Tabla Periódica (halógenos). Dependiendo del entorno químico, el halo puede estar en un estado neutro o aniónico.

40 A los términos no definidos específicamente en la presente memoria se les da su significado normal en la técnica.

#### I. Composiciones de marcaje basadas en proximidad

45 En la presente memoria se describen composiciones para proporcionar plataformas de mapeo de microentornos que pueden hacerse funcionar para identificar selectivamente diversas características, incluyendo interacciones proteína-proteína en membranas celulares. En algunas realizaciones, una composición comprende un catalizador y un agente marcador de proteínas, en donde el catalizador activa el agente marcador de proteínas a un intermedio reactivo. El catalizador, en algunas realizaciones, puede tener una estructura electrónica para permitir la transferencia de energía al agente marcador de proteínas para formar el intermedio reactivo. En algunas realizaciones, por ejemplo, el catalizador se acopla en la transferencia de energía Dexter con el agente marcador de proteínas. La transferencia de energía puede proceder a través de transferencia de electrones únicos, en algunas realizaciones.

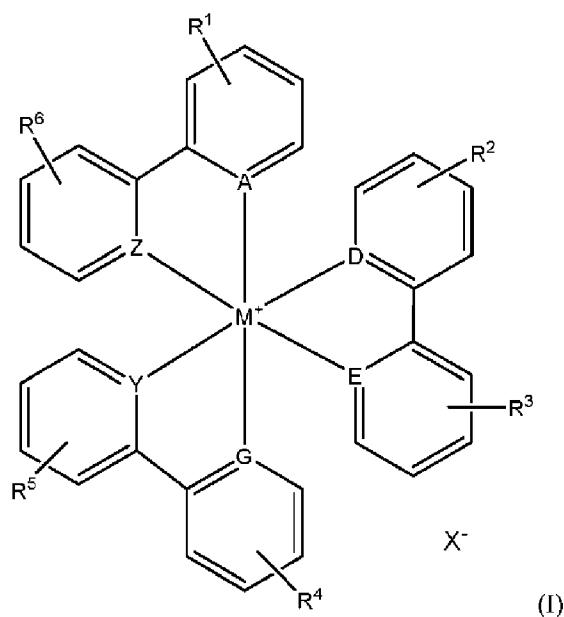
50 La transferencia de energía al agente marcador de proteínas puede originarse a partir de un estado excitado de la

estructura electrónica del catalizador, en algunas realizaciones. El estado excitado del catalizador, por ejemplo, puede ser un estado excitado singlete o un estado excitado triplete. El estado excitado del catalizador puede generarse mediante uno o más mecanismos, incluyendo la absorción de energía por el catalizador. En algunas realizaciones, el catalizador es un fotocatalizador, en donde el estado excitado se induce por absorción de uno o más fotones. En otras realizaciones, el catalizador puede colocarse en un estado excitado por interacción con una o más especies químicas en el entorno circundante. Alternativamente, la transferencia de energía al agente marcador de proteínas, incluyendo la transferencia de electrones, puede originarse a partir de un estado fundamental de la estructura electrónica del catalizador.

La transferencia de energía, incluyendo la transferencia de electrones, al agente marcador de proteínas forma un intermedio reactivo del agente marcador de proteínas. El intermedio reactivo reacciona o se reticula con una proteína u otra biomolécula dentro del radio de difusión del intermedio reactivo. Si una proteína u otra biomolécula no está dentro del radio de difusión, el intermedio reactivo se inactiva por el entorno acuoso o de base acuosa circundante. El radio de difusión del intermedio reactivo puede adaptarse a consideraciones de mapeo del microentorno específico (marcaje basado en proximidad), y puede limitarse a la escala nanométrica. En algunas realizaciones, por ejemplo, el radio de difusión del intermedio reactivo puede ser menor de 10 nm, menor de 5 nm, menor de 4 nm, menor de 3 nm o menor de 2 nm antes de la inactivación en un entorno acuoso. Por consiguiente, el intermedio reactivo reaccionará o se reticulará con una proteína u otra biomolécula dentro del radio de difusión o será inactivado por el entorno acuoso si no está presente ninguna proteína o biomolécula. De esta manera, se puede mapear con una alta resolución el entorno local mediante un esfuerzo coordinado entre el catalizador y el agente marcador de proteínas. Adicionalmente, el intermedio reactivo puede presentar un  $t_{1/2}$  menor de 5 ns, menor de 4 ns o menor de 2 ns antes de la inactivación, en algunas realizaciones. En realizaciones adicionales, el radio de difusión puede extenderse a entre 5-500 nm a través de la extensión de la semivida del intermedio reactivo.

Cualquier combinación de catalizador-agente marcador de proteínas que presente las propiedades de estructura electrónica anteriores para la transferencia de energía y la generación de intermedios reactivos y la unión de proteínas o biomoléculas asociadas puede emplearse para el mapeo del microentorno. En algunas realizaciones, el catalizador es un complejo de metal de transición. El complejo de metal de transición, en algunas realizaciones, puede exhibir un estado excitado triplete ( $T_1$ ) de larga vida, facilitando la transferencia de energía al agente marcador de proteínas. El estado  $T_1$  puede tener  $t_{1/2}$  de 0,2-2  $\mu$ s, por ejemplo. Los complejos de metales de transición descritos en la presente memoria pueden ser fotocatalíticos y, en algunas realizaciones, absorber luz en la región visible del espectro electromagnético. La absorción de radiación electromagnética puede excitar el complejo de metal de transición al estado  $S_1$  seguido de cruzamiento entre sistemas cuantitativos al estado  $T_1$ . El catalizador de metal de transición puede someterse posteriormente a transferencia de energía Dexter de corto alcance a un agente de marcaje de proteínas, y volver al estado fundamental,  $S_0$ . La transferencia de energía al agente marcador activa el agente marcador para la reacción con una proteína u otra biomolécula. El estado  $T_1$  del complejo de metal de transición puede ser mayor de 60 kcal/mol, en algunas realizaciones. El centro metálico puede seleccionarse, por ejemplo, de metales de transición del grupo del platino. El centro metálico puede ser iridio, en algunas realizaciones.

El complejo de metal de transición puede tener cualquier composición y estructura consistente con los principios anteriores de excitación y transferencia de energía a un agente marcador de proteínas. En algunas realizaciones, un complejo de metal de transición fotocatalítico está hexacoordinado. Los fotocatalizadores de metal de transición de composiciones de marcaje basado en proximidad descritos en la presente memoria, en algunas realizaciones, tienen la Fórmula (I):



en donde M es un metal de transición;

en donde A, D, E, G, Y y Z se seleccionan independientemente de C y N;

5 en donde R<sup>1</sup> - R<sup>6</sup> representa cada uno de uno a cuatro sustituyentes de anillo opcionales, cada uno de los uno a cuatro sustituyentes de anillo opcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, heteroalquilo, haloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxi, amina, amida, éter, -C(O)O<sup>-</sup>, -C(O)OR<sup>7</sup>, y -R<sup>8</sup>OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, y R<sup>8</sup> es alquilo; y

10 en donde X<sup>-</sup> es un contraión. Se entiende que el hidrógeno ocupa posiciones en los anillos arilo de Fórmula (I) en ausencia de sustituyentes opcionales R<sup>1</sup>-R<sup>6</sup>. En algunas realizaciones, el contraión (X<sup>-</sup>) se puede seleccionar de tetraalquilborato, tetrafluoroborato, tetrafenilborato, PF<sub>6</sub><sup>-</sup> y cloruro. En algunas realizaciones, M se selecciona de metales de transición del grupo del platino. El centro metálico puede ser iridio.

15 Los ligandos del complejo de metal de transición de Fórmula (I) pueden comprender uno o más restos de piridina, en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, uno o más ligandos comprenden bipyridina o derivados de la misma. Los ligandos del complejo de metal de transición también se pueden seleccionar de las especies proporcionadas en la Tabla I.

Tabla I - Ligandos del complejo de metal de transición fotocatalítico

dtbbpy
dF(CF <sub>3</sub> )ppy
diPh-bpy
diOMe-bpy

En algunas realizaciones, el complejo de metal de transición fotocatalítico de Fórmula (I) es [Ir(dF(CF<sub>3</sub>)ppy)<sub>2</sub>(dtbbpy)](PF<sub>6</sub>), [Ir(dF(CF<sub>3</sub>)ppy)<sub>2</sub>(bpy)](PF<sub>6</sub>), o derivados de los mismos.

20 Adicionalmente, los ligandos de los complejos de metales de transición fotocatalíticos descritos en la presente memoria, incluyendo complejos de Fórmula (I), pueden modificarse con uno o más restos polares o hidrófilos para potenciar la solubilidad de los complejos de metales de transición en entornos acuosos o de base acuosa. Los restos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, restos carboxilo, hidroxilo y/u óxido de alqueno, tales como polietilenglicol.

25 Como se describe adicionalmente en la presente memoria, los complejos de metales de transición pueden incorporar una funcionalidad reactiva para acoplar un agente de unión biomolecular. En algunas realizaciones, por ejemplo, un catalizador de metal de transición, incluyendo el fotocatalizador de metal de transición de Fórmula (I), puede comprender uno o más restos de química clic incluyendo, pero sin limitarse a, BCN (biciclononino, biciclo[6.1.0]nonino), DBCO (dibenzo-biciclo-octino), TCO (trans-cicloocteno), tetrazina, alquino y azida.

El catalizador operable para la transferencia de energía a un agente marcador de proteínas para producir un intermedio reactivo puede comprender un catalizador de metal no de transición, en algunas realizaciones. Diversos organocatalizadores para su uso en compuestos y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria pueden incluir un grupo tioxantona, fenotiazina, flavina, fenoxazina, benzofenotiazina, cumarina, acetofenona o benzofenona, en algunas realizaciones. En algunos casos, un organocatalizador comprende un grupo triarilmetano, rosa de bengala, porfirina, clorina, bacterioclorina, azul de metileno, un tinte de acridina, un tinte de xanteno o un tinte de arilmetano. El organocatalizador de metal no de transición puede tener cualquier estructura electrónica y/u otras propiedades de complejos de metal de transición descritas en la presente memoria, incluyendo estados excitados singlete y/o triplete para la transferencia de energía al agente marcador de proteínas. La transferencia de energía desde el organocatalizador al agente marcador de proteínas puede ocurrir a través de cualquier mecanismo descrito en la presente memoria, tal como transferencia de energía Dexter o transferencia de electrones individuales. En algunas realizaciones, un organocatalizador es un fotocatalizador, en donde el estado excitado para la transferencia de energía al agente marcador de proteínas se genera por absorción de uno o más fotones por el organocatalizador. El organocatalizador, por ejemplo, puede absorber luz en la región visible del espectro electromagnético.

Los agentes marcadores de proteínas reciben transferencia de energía desde el catalizador para formar un intermedio reactivo. El intermedio reactivo reacciona o se reticula con una proteína u otra biomolécula dentro del radio de difusión del intermedio reactivo. Los radios de difusión de los intermedios reactivos se han descrito anteriormente. La identidad específica de un agente marcador de proteínas puede seleccionarse según varias consideraciones, incluyendo la identidad del catalizador, la naturaleza del intermedio reactivo formado, la vida útil y el radio de difusión del intermedio reactivo.

Por ejemplo, en realizaciones en donde el catalizador es un fotocatalizador de metal de transición, el agente marcador de proteínas puede ser una diazirina. La transferencia de energía de tripletes desde el fotocatalizador en estado excitado puede promover la diazirina a su estado de triplete ( $T_1$ ). El triplete de diazirina experimenta la eliminación de  $N_2$  para liberar un carbeno triplete libre, que experimenta equilibrio de espín en escala temporal de picosegundos a su estado singlete reactivo ( $t_{1/2} < 1$  ns) que se reticula con una proteína cercana o se inactiva en el entorno acuoso. La FIG. 1 ilustra la transferencia de energía entre un fotocatalizador de iridio de Fórmula (I) y un agente marcador de proteínas de diazirina, según algunas realizaciones descritas en la presente memoria. Notablemente, la radiación electromagnética empleada para generar el estado excitado del catalizador de metal de transición no activa la diazirina a un carbeno reactivo. En algunas realizaciones, el coeficiente de extinción del complejo de metal de transición es de 3 a 5 órdenes de magnitud mayor que el de la diazirina.

Puede usarse cualquier diazirina consistente con los principios técnicos analizados en la presente memoria, incluyendo el mecanismo de reacción de la FIG. 1. La sensibilización con diazirina, por ejemplo, puede extenderse a una variedad de ariltrifluorometil diazirinas sustituidas en  $p$  y  $m$  que tienen cargas útiles valiosas para aplicaciones de microscopía y proteómica, incluyendo grupos de ácido carboxílico libre, fenol, amina, alquino, carbohidrato y biotina. La FIG. 2 ilustra diversas diazirinas que pueden funcionar para formar intermedios reactivos a través de la transferencia de energía desde un fotocatalizador de metal de transición para marcaje de proteínas u otras biomoléculas, según algunas realizaciones. Como se ilustra en la FIG. 2, la diazirina puede funcionalizarse con un marcador, tal como biotina. En algunas realizaciones, el marcador es destiobiotina. El marcador puede ayudar en la identificación de proteínas marcadas por el agente marcador de proteínas. El marcador, por ejemplo, puede ser útil en resultados de ensayo mediante transferencia Western y/u otras técnicas analíticas. Los marcadores pueden incluir funcionalidades alquino, azida, etiqueta FLAG, fluoróforo y cloroalcano, además de biotina y destiobiotina.

En algunas realizaciones en donde el catalizador es un fotocatalizador de metal de transición, el agente marcador de proteínas puede ser una azida. La transferencia de energía de tripletes desde el fotocatalizador en estado excitado puede promover la formación de nitreno a partir de la azida. El nitreno reactivo se reticula con una proteína cercana o se inactiva en el entorno acuoso. Puede emplearse cualquier azida que pueda hacerse funcionar para experimentar transferencia de energía con fotocatalizador de metal de transición para la formación de nitreno. En algunas realizaciones, una azida es una arilazida.

En algunas realizaciones en donde el catalizador es un organocatalizador, el agente marcador de proteínas puede comprender uno o más restos para recibir transferencia de electrones individuales desde el organocatalizador. La transferencia de electrones individuales al agente marcador de proteínas puede generar un radical reactivo que tiene radio de difusión y/o vida útil descritos en la presente memoria para reaccionar con una proteína en el entorno local del organocatalizador. Por ejemplo, un organocatalizador puede ser un fotocatalizador de flavina. El fotocatalizador de flavina excitado puede experimentar una transferencia de electrones individuales con restos fenol para generar un radical fenoxi reactivo. La FIG. 3 ilustra un mecanismo de reacción para el marcaje de proteínas basado en flavina según algunas realizaciones. Como se ilustra en la FIG. 3, el agente marcador de proteínas fenólico se funcionaliza con una etiqueta o marcador para ayudar en la identificación de proteínas marcadas por el agente marcador de proteínas.

## II. Conjugados

En otro aspecto, en la presente memoria se describen conjugados para marcaje basado en proximidad. Un conjugado comprende un catalizador acoplado a un agente de unión biomolecular. El catalizador acoplado al agente de unión biomolecular puede comprender cualquier catalizador descrito en la presente memoria, incluyendo los catalizadores de metales de transición y organocatalizadores detallados en la Sección I anterior. Además, el agente de unión biomolecular puede comprender una proteína, polisacárido, ácido nucleico o lípido, en algunas realizaciones. En algunos casos, el agente de unión biomolecular puede comprender un sistema de visualización multivalente que comprende una proteína, polisacárido, ácido nucleico o lípido. En algunas realizaciones, el agente de unión biomolecular puede ser un ligando de molécula pequeña con una afinidad de unión específica por una proteína diana. El agente de unión biomolecular puede emplearse para localizar el catalizador en el entorno extracelular deseado para el marcaje por proximidad y el análisis asociado. Por consiguiente, la identidad específica del agente de unión biomolecular se puede seleccionar según los requisitos químicos y/o estéricos del sitio diana deseado para la colocación del catalizador en el proceso de marcaje basado en proximidad. Se puede elegir cualquier sitio diana biomolecular, y los sitios diana no están limitados en la presente divulgación. En algunas realizaciones, los sitios diana pueden ser proteínas para estudiar interacciones proteína-proteína, incluyendo la interacción con receptores de membrana celular. En algunas realizaciones, por ejemplo, el agente de unión biomolecular es un anticuerpo, tal como un anticuerpo secundario para interactuar con un anticuerpo primario unido al antígeno deseado. En otras realizaciones, el agente de unión biomolecular es un ligando con especificidad por un receptor de proteína de la membrana celular, tal como un receptor acoplado a proteína G.

El agente de unión biomolecular puede unirse al catalizador. En algunas realizaciones, el catalizador comprende un mango reactivo o funcionalidad para acoplar el agente de unión biomolecular. En algunas realizaciones, por ejemplo, un catalizador puede comprender uno o más restos de química clic que incluyen, pero no se limitan a, BCN, DBCO, TCO, tetrazina, alquino y azida. La FIG. 4 ilustra varios fotocatalizadores de metales de transición de Fórmula (I) que tienen una funcionalidad reactiva para acoplar un agente de unión biomolecular. Como se ilustra en la FIG. 4, se puede emplear un enlazador de óxido de alqueno de longitud variable entre la funcionalidad reactiva y el ligando de coordinación. La longitud del enlazador de óxido de alqueno, tal como óxido de etileno, se puede elegir según varias consideraciones, incluyendo el estado estérico del sitio diana. La FIG. 5 ilustra varios fotocatalizadores de metales de transición de Fórmula (I) que forman un conjugado con un agente de unión biomolecular según algunas realizaciones.

## III. Sistemas para marcaje basado en proximidad

En otro aspecto, en la presente memoria se describen sistemas para marcaje basado en proximidad. Un sistema, por ejemplo, comprende un conjugado que incluye un catalizador acoplado a un agente de unión biomolecular, y un agente marcador de proteínas activado por el catalizador para unirse a una proteína. El conjugado puede comprender cualquier catalizador y agente de unión biomolecular descrito en la presente memoria, incluyendo las realizaciones detalladas en la Sección II anterior. El catalizador, por ejemplo, puede tener una estructura electrónica para activar el agente marcador de proteínas a un intermedio reactivo a través de transferencia de energía. Además, el agente marcador de proteínas puede comprender cualquiera de los agentes marcadores descritos en la presente memoria, incluyendo los agentes marcadores de proteínas expuestos en la Sección I anterior. La identidad específica del conjugado y el agente marcador de proteínas asociado se puede seleccionar según varias consideraciones, tales como la naturaleza química y/o los requisitos estéricos del entorno biológico que se va a mapear con el sistema marcador basado en proximidad.

Los sistemas para el marcaje basado en proximidad descritos en la presente memoria pueden emplearse en diversas aplicaciones. En algunas realizaciones, los sistemas permiten la identificación de la diana, en donde el conjugado y el agente marcador de proteínas asociado permiten la identificación de una o más moléculas en un contexto biológico por proteómica. Adicionalmente, los sistemas que comprenden el conjugado y el agente marcador de proteínas facilitan el mapeo del interactoma. El direccionamiento de un conjugado y agente marcador de proteínas permite la detección e identificación de una o más moléculas y agentes de interacción vecinos en un contexto biológico por proteómica. La identificación de tales moléculas mediante los sistemas descritos en la presente memoria puede permitir el enriquecimiento y/o la purificación de tales moléculas y agentes de interacción vecinos. Adicionalmente, los sistemas que comprenden un conjugado y un agente marcador de proteínas permiten además la detección e identificación de una o más moléculas en un contexto biológico mediante microscopía.

## IV. Métodos de marcaje basado en proximidad

En otro aspecto, en la presente memoria se describen métodos de marcaje basado en proximidad. Un método de marcaje basado en proximidad comprende proporcionar un conjugado que comprende un catalizador acoplado a un agente de unión biomolecular, activar un agente marcador de proteínas a un intermedio reactivo con el catalizador y acoplar el intermedio reactivo a una proteína. El conjugado puede comprender cualquier catalizador y agente de unión biomolecular descrito en la presente memoria, incluyendo las realizaciones detalladas en la Sección II anterior. Además, el agente marcador de proteínas puede comprender cualquiera de los agentes marcadores descritos en la presente memoria, incluyendo los agentes marcadores de proteínas expuestos en la Sección I anterior. La identidad específica del conjugado y el agente marcador de proteínas asociado se puede seleccionar según varias consideraciones, tales como la naturaleza química y/o los requisitos estéricos del entorno biológico que se va a mapear

con el sistema marcador basado en proximidad. En algunas realizaciones de marcaje basado en proximidad, el catalizador puede proporcionarse en ausencia de un agente de unión biomolecular.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden emplearse para mapear diversos entornos biológicos, incluyendo áreas locales de membranas celulares y/o el entorno extracelular local. El conjugado que comprende el catalizador y el agente de unión biomolecular puede dirigirse a una región local específica de una membrana celular, tal como un receptor de interés. La activación del agente marcador de proteínas puede identificar proteína(s) y/u otras moléculas en la región local diana. Notablemente, el agente marcador de proteínas activado también puede identificar o marcar moléculas asociadas con otra célula en contacto con la región celular diana. Por lo tanto, las interacciones intercelulares y los entornos intercelulares pueden aclararse y mapearse con los sistemas y métodos descritos en la presente memoria. Los métodos anteriores permiten el mapeo de interactomas, y la identificación de una o más moléculas y agentes de interacción vecinos en un contexto biológico por proteómica. La identificación de tales moléculas mediante los métodos descritos en la presente memoria puede permitir el enriquecimiento y/o la purificación de tales moléculas y agentes de interacción vecinos.

La FIG. 6A ilustra el funcionamiento de los sistemas y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria según algunas realizaciones. Como se ilustra en la FIG. 6A, un conjugado que comprende un fotocatalizador y un anticuerpo se dirige a un área local específica de la membrana celular. El fotocatalizador se irradia para producir el estado excitado seguido de transferencia de energía al agente marcador de proteínas de diazirina. El agente marcador de proteínas de diazirina comprende una etiqueta para fines de identificación en el análisis. La transferencia de energía activa el agente marcador de proteínas al carbeno reactivo. El carbeno reactivo se une a proteínas y/u otras biomoléculas dentro del radio de difusión estrecho, como se describe en la presente memoria. El agente marcador de diazirina fuera del radio de activación o transferencia de energía del fotocatalizador no está activado. Adicionalmente, las proteínas y/u otras biomoléculas fuera del radio de difusión del carbeno reactivo no están marcadas. De esta manera, se puede lograr un marcaje basado en proximidad de alta resolución.

La FIG. 6B ilustra el funcionamiento de los sistemas y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria para la identificación y validación de receptores acoplados a proteína G de membrana (GPCR) según algunas realizaciones. Como se proporciona en la FIG. 6B, un conjugado comprende un fotocatalizador acoplado a un agente de unión biomolecular que tiene especificidad por el GPCR. El conjugado se une a un sitio local del GPCR. El fotocatalizador se irradia con luz azul para proporcionar un estado excitado seguido de transferencia de energía al agente marcador de proteínas de diazirina. El agente marcador de proteína de diazirina comprende un asa o etiqueta de afinidad para fines de identificación en el análisis. La transferencia de energía activa el agente marcador de proteínas al carbeno reactivo. El carbeno reactivo se une a proteínas y/u otras biomoléculas dentro del radio de difusión estrecho, como se describe en la presente memoria. Pueden producirse múltiples eventos de marcaje en el sitio del GPCR local que conducen a la amplificación de la señal.

Estas y otras realizaciones se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1 - Sensibilización fotocatalítica con diazirina para el marcaje de proteínas

Se demostró que los carbenos generados a través de sensibilización fotocatalítica con diazirina podían marcar proteínas. Como se ilustra en la FIG. 7A, el fotocatalizador **3** se combinó con diazirina **4** y BSA en DPBS para proporcionar mezclas de reacción con 100  $\mu$ l de volumen de solución total y concentraciones de componentes deseadas. El fotocatalizador **3** se ilustra en la FIG. 7B, y la Tabla I resume las condiciones de la muestra. Estas muestras se colocaron entonces bien en la oscuridad, se irradiaron con luz UV (375 nm) o se irradiaron con luz visible (450 nm) en un biofotorreactor durante 10 minutos a una intensidad del 100 %. Después, se retiraron muestras de 30  $\mu$ l, se combinaron con 10  $\mu$ l de tampón de muestra de Laemmli reductor 4x ( $\beta$ -mercaptoetanol al 5 %), se agitaron con vórtex y se calentaron a 95 °C durante 10 minutos. Después, se analizaron 10  $\mu$ l de cada muestra mediante transferencia Western.

Tabla I - Condiciones de las muestras

Muestra	Diazirina <b>4</b> ( $\mu$ M)	Fotocatalizador <b>3</b> ( $\mu$ m)	BSA ( $\mu$ M)	Luz
1	100	0,0	10,0	Ninguna
2	100	0,0	10,0	375 nm
3	100	0,0	10,0	450 nm
4	100	2,5	10,0	450 nm
5	100	5,0	10,0	450 nm
6	100	7,5	10,0	450 nm
7	100	10,0	10,0	450 nm

Se detectó biotinylación de BSA para la Muestra 2. Cuando se irradió una solución de BSA y sonda de diazirina biotinylada con luz de 450 nm (Muestra 3), el grado de biotinylación fue inferior al 0,5 %, estableciendo que la diazirina presenta una señal de fondo mínima a esta longitud de onda. Sin embargo, en presencia de fotocatalizador **3** soluble en agua, se observó biotinylación dependiente del catalizador de BSA. El marcaje fotocatalítico de BSA se confirmó adicionalmente mediante espectrometría de masas de proteínas intactas. A diferencia de las metodologías de marcaje basadas en enzimas anteriores, este enfoque requiere el suministro continuo de luz visible para mantener la sensibilización con diazirina a través del fotocatalizador **3** para el marcaje de proteínas. Esta característica se aprovechó para demostrar cómo el encendido o apagado de la fuente de luz proporciona un control temporal fino sobre el proceso de marcaje, como se ilustra en la FIG. 7A.

#### 10 Ejemplo 2 – *Conjugado de anticuerpo-fotocatalizador y marcaje basado en proximidad usando el mismo*

Se preparó un conjugado anticuerpo secundario-fotocatalizador como punto de entrada general para el marcaje de proximidad fotocatalítica dirigida espacialmente en las superficies celulares. Un anticuerpo de cabra anti-ratón (Gt/ $\alpha$ -Ms) se decoró primero con grupos azida mediante reacción con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido azidobutírico, y después se conjugó con catalizador de iridio que lleva alquino mediante química clic, dando como resultado una relación anticuerpo-fotocatalizador de 1:6. El catalizador de iridio es el complejo de iridio **3** ilustrado en la FIG. 7B.

A continuación, para abordar el marcaje dirigido a proteínas en una superficie, se preparó un sistema modelo que contenía proteínas del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) etiquetadas con Fc humano unidas a perlas de agarosa de  $\alpha$  inmunoglobulina-G (IgG) humana (FIG. 8A). Estas perlas se incubaron secuencialmente con 20 un anticuerpo Ms/ $\alpha$ -VEGFR2 e Ir-Gt/ $\alpha$ -Ms para colocar el catalizador de iridio cerca de las proteínas VEGFR2 en la superficie de la perla. La irradiación de estas perlas con luz de 450 nm en presencia de una sonda de diazirina-biotina proporcionó el marcaje selectivo de VEGFR2 sobre EGFR. Cuando se usó Ms/ $\alpha$ -EGFR como anticuerpo primario, se invirtió la selectividad del marcaje. Es importante observar que un experimento análogo, que usó marcaje basado en peroxidasa, fue incapaz de diferenciar entre EGFR o VEGFR2, como se ilustra en la FIG. 8B.

#### 25 Ejemplo 3 - *Mapeo del microentorno en membranas celulares*

Se aplicó activación fotocatalítica de diazirina dirigida por anticuerpo (es decir,  $\mu$ mapeo) a la superficie de células vivas. Para estos experimentos, la adición del anticuerpo a la superficie celular se mantuvo a 4 °C para limitar la reticulación de proteínas mediada por anticuerpos. CD45, una tirosina fosfatasa muy abundante en las superficies de las células T implicadas en la señalización del receptor de antígeno se seleccionó como diana inicial. El análisis de transferencia Western de  $\mu$ mapeo dirigido a CD45 en células Jurkat mostró biotinylación de proteínas dependiente de la luz y del tiempo en comparación con el control dirigido al isotipo (FIG. 9A). A continuación, se usó análisis proteómico cuantitativo basado en etiqueta de masa en tándem (TMT) de proteínas enriquecidas con estreptavidina para identificar CD45 y dos agentes de asociación conocidos (CD45AP y CD2) como parte de un subconjunto más amplio de proteínas de membrana celular enriquecidas (FIG. 9B).

Con la prueba de concepto para el marcado de la superficie celular en cuestión, se exploró si el  $\mu$ mapeo podría diferenciar entre microentornos separados espacialmente en la misma membrana celular. Para este fin, se seleccionaron CD29 y CD47 como dianas ideales sin asociación coespacial conocida en la superficie celular. De hecho, el  $\mu$ mapeo de CD45, CD29 o CD47 en células Jurkat dio como resultado el enriquecimiento de conjuntos únicos de proteínas, que incluían agentes de interacción tanto conocidos (CD29:CD49D, CD45:CD45AP:CD2) como previamente desconocidos (Fig. 9B). De manera crucial, aunque se compartían varias proteínas entre pares de proteínas diana, ninguna se compartía entre las tres, validando la capacidad del  $\mu$ mapeo para discriminar entre microentornos no relacionados. Por el contrario, cuando se emplean métodos de marcaje de proximidad basados en peroxidasa del estado de la técnica, CD45 de la superficie celular y proteínas asociadas no se resolvieron selectivamente de CD29 o CD47 (FIG. 9C).

#### 45 Ejemplo 4 - *Mapeo del microentorno en membranas celulares*

La selectividad de las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria también se aprovechó para investigar el interactoma de proteína proximal de PD-L1 en células B. Como se ha establecido bien, PD-L1 desempeña un papel importante en las células cancerosas como ligando de punto de control inmunitario que puede acelerar la progresión tumoral mediante la supresión de la actividad de las células T. En el caso, el  $\mu$ mapeo dirigido a PD-L1 reveló CD30, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, y CD300A, un receptor 5 inmunoinhibidor (FIG. 10A), como agentes de interacción potencialmente nuevos basados en un enriquecimiento significativo. Estos resultados resaltan el potencial del  $\mu$ mapeo para proporcionar nuevas ideas con respecto a los microentornos de las proteínas de puntos de control.

Para validar aún más el subconjunto enriquecido de proteínas identificadas por el  $\mu$ mapeo de PD-L1, se realizó 10 marcajes dirigidos de estas dos proteínas altamente enriquecidas. Por lo tanto, los  $\mu$ mapeos dirigidos de estas proteínas dentro del microentorno de PD-L1 deberían proporcionar listas de enriquecimiento similares, verificando su asociación espacial. De hecho, se encontró que el  $\mu$ mapeo dirigido a  $\alpha$ -CD30,  $\alpha$ -CD300A y  $\alpha$ -PD-L1 identificaron el mismo conjunto de 12 receptores de superficie (FIG. 10B).

Ejemplo 5 - *μMapeo Intra/Extrasináptico en de un sistema de dos células*

Es bien reconocido que el desarrollo de nuevas estrategias oncológicas terapéuticas requerirá una comprensión de los mecanismos subyacentes de la comunicación intercelular, particularmente dentro del contexto de la activación y diferenciación de las células T. Además, dado que la localización de PD-L1 se encuentra dentro de la inmunosinapsis de células T/células presentadoras de antígeno (APC) (es decir, en la interfaz entre dos células inmunointeractivas), se planteó la hipótesis de que el  $\mu$ mapeo dirigido a PD-L1 con conjugados y métodos descritos en la presente memoria debería conducir no solo a la biotilación de una superficie de APC que expresa PD-L1 (marcaje *cis*), sino también a la biotilación de la célula T sináptica adyacente (marcaje *trans*) (FIG. 11A). Como experimento de control importante, se estableció además que cuando se toma como diana una proteína excluida de la sinapsis, tal como CD45RO, el radio minimizado por la difusión de  $\mu$ mapeo excluiría la biotilación de la membrana celular *trans* distante.

Se evaluó el  $\mu$ mapeo dirigido a PD-L1 y CD45 en un sistema de dos células compuesto por linfocitos JY-B que expresan PD-L1 como la célula presentadora de antígeno y linfocitos T Jurkat que expresan únicamente PD-1 y la isoforma CD45RO. Dado que las interacciones célula inmune-APC están dirigidas por la unión de múltiples tipos de receptores (por ejemplo, adhesión, coestimulador/correpresor, y receptor de células T (TCR)-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) 5, se empleó la enterotoxina D estafilocócica (SED) para facilitar el acoplamiento del MHC de clase II y TCR y promover la formación y señalización de sinapsis inmunes de células B/células T (FIG. 11A). Después de la aplicación del protocolo de  $\mu$ mapeo basado en irradiación de luz azul, se ensayó el grado de selectividad del marcaje *cis/trans* mediante análisis de citometría de flujo. Como se anticipó, el  $\mu$ mapeo dirigido a PD-L1 dio como resultado marcaje celular tanto *cis* como *trans*, mientras que el  $\mu$ mapeo dirigido a CD45RO condujo a un marcaje *cis* selectivo en las células Jurkat que expresan CD45RO (Fig. 11B y 11C) sin ningún marcaje de las células B adyacentes. En marcado contraste con el  $\mu$ mapeo, el marcaje de proximidad basado en peroxidasa de PD-L1 o CD45RO dentro de este sistema de dos células condujo al marcaje completo de ambos tipos de células en 30 segundos, claramente visualizado a través de citometría de flujo y microscopía confocal (FIG. 11B, 11C y 11D). En comparación, el  $\mu$ mapeo dirigido a PD-L1 mostró una alta selectividad solo para el marcaje *trans* en las regiones de contacto celular *cis* y *trans* (FIG. 11D). Es importante destacar que la aplicación de la tecnología de  $\mu$ mapeo en PD-1 en el sistema de cocultivo Jurkat-JY dio como resultado la tendencia recíproca de marcaje celular *cis* y *trans*. Colectivamente, estos hallazgos demuestran claramente que la capacidad del  $\mu$ mapeo para elucidar las interacciones proteína-proteína puede traducirse directamente hacia el marcaje altamente selectivo de interfaces dinámicas dentro de sistemas multicelulares complejos.

Ejemplo 6 - *Conjugado anticuerpo-fotocatalizador y marcaje basado en proximidad usando el mismo*

Los conjugados que comprenden fotocatalizador de flavina junto con agentes marcadores de proteínas basados en fenol pueden emplearse en composiciones y métodos de marcaje basados en proximidad descritos en la presente memoria. La FIG. 12A ilustra el marcaje de proteínas basado en perlas en donde las proteínas de fusión CD45-Fc o PDL1-Fc se unen en las mismas perlas seguido de la unión de un anticuerpo primario y un conjugado de anticuerpo secundario flavina (AFC). A continuación, se marcan CD45 o PDL1 en presencia de biotina fenol y luz visible. La FIG. 12B es un análisis de transferencia Western de la biotilación de CD45 dependiente de luz para los puntos de tiempo indicados.

La FIG. 12C es un esquema del marcaje de células dirigido a CD45RO o CD45RA con AFC en poblaciones de células T mixtas. La FIG. 12D es el análisis de citometría de flujo del transcurso del tiempo del fotomarcaje de biotilación de células T CD45RA+ o CD45RO+ con isotipo (parte superior),  $\alpha$ -CD45RA + AFC (parte media) y  $\alpha$ -CD45RO + AFC (parte inferior)

Ejemplo 7 - *Mapeo del microentorno en membranas celulares*

La FIG. 13A es un esquema que representa el marcaje por fotoproximidad de CD45 en células Jurkat con conjugado de anticuerpo secundario flavina (AFC). La FIG. 13B es un análisis de transferencia Western de marcaje dirigido a CD45 de las células Jurkat. Los niveles de biotilación aumentan en función de la duración de la irradiación de luz visible con marcaje dirigido a CD45, pero no con controles de isotipo. La FIG. 13C es una imagen confocal de células con marcaje dirigido a CD45 que indica que la biotilación (tinción magenta) está confinada a la superficie celular y depende del tiempo de exposición a la luz. Los núcleos se marcan con tinción de Hoechst y las barras de escala indican 5  $\mu$ m. La FIG. 13D proporciona gráficos de volcán de significación frente a veces de enriquecimiento para biotilación dirigida frente a dirigida al isotipo de CD45 en células Jurkat, después de 2 min de iluminación con luz azul, recolección, captura en perlas de estreptavidina y análisis proteómicos basados en espectrometría de masas cuantitativa. Las proteínas enriquecidas significativamente (aquellas con un valor p corregido por FDR < 0,05 y que muestran un enriquecimiento en veces por encima del control dirigido al isotipo de > 2,5 (1,32  $\log_2$  veces de cambio)) se indican como puntos azules, los agentes de asociación conocidos de CD45 dentro de este grupo enriquecido se indican con puntos naranjas y CD45 se indica con un punto rojo (n=3 experimentos).

Ejemplo 8 - *Mapeo del microentorno en membranas celulares*

La FIG. 14A es un esquema que representa el marcaje por fotoproximidad de PDL1 en células JY-PDL1 con conjugado de anticuerpo secundario flavina (AFC). La FIG. 14B proporciona gráficos de volcán de significación frente a veces de enriquecimiento para biotilación dirigida frente a dirigida al isotipo de PDL1 en células Raji que expresan PDL1, después de 2 min de iluminación con luz azul, recolección, captura en perlas de estreptavidina y análisis proteómicos

cuantitativos basados en espectrometría de masas. Las proteínas enriquecidas significativamente (aquellas con un valor p corregido por FDR < 0,05 y que muestran un enriquecimiento en veces por encima del control dirigido al isotipo de > 2,5 (1,32 log<sub>2</sub> veces de cambio)) se indican como puntos naranja o azul, y PDL1 se indica con un punto rojo (n=3 experimentos). La FIG. 14C es un diagrama de Venn de proteínas significativamente enriquecidas identificadas a partir del marcaje dirigido a PDL1 en células JY y Raji que expresan PDL1. Las proteínas identificadas en ambos tipos de células se muestran en el centro. La FIG. 14D es una lista de proteínas significativamente enriquecidas identificadas a partir del direccionamiento a PDL1 en células JY y Raji con función relacionada con PDL1 conocida. La FIG. 14E es una red de interacción de proteínas de cadena y análisis de términos GO de proteínas significativamente enriquecidas para experimentos dirigidos a PDL1. El sombreado indica pertenencia a términos de ontología génica amplia (proceso biológico). Los nodos con múltiples tonos sombreados indican pertenencia a más de un término. Los bordes gruesos indican evidencia experimental de interacción de StringDB, mientras que los bordes delgados indican interacciones de otras fuentes.

#### Ejemplo 9 - *μ-Mapeo intra/extrasináptico dentro de un sistema de dos células*

La FIG. 15A es un esquema que representa un sistema de dos células que consiste en células Jurkat y Raji modificadas por ingeniería. Se ilustra el marcaje dirigido por anticuerpos con un fotocatalizador (PC) o peroxidasa (HRP) en PDL1. La FIG. 15B es un análisis de citometría de flujo en donde se detecta biotinylación tanto en células Raji como Jurkat con direccionamiento a PDL1 usando el conjugado de anticuerpo flavina (AFC), pero no direccionamiento a isotipo o en ausencia de irradiación de luz visible. No se observó marcaje transcelular entre células Raji marcadas con PDL1 y células A375 suspendidas. La FIG. 15C es la imagen de microscopía confocal del sistema de dos células Raji-Jurkat con direccionamiento a PDL1 en células Raji que revela marcaje tanto en células Raji como en puntos de contacto celular en células Jurkat usando el AFC mientras que se observó marcaje excesivo en ambos tipos de células con HRP (indicado con flechas blancas). Se obtuvieron imágenes de las células para biotinylación, expresión superficial de CD3 y núcleos. La FIG. 15D es un esquema que representa un sistema de dos células que consiste en células Jurkat y Raji modificadas por ingeniería. Se ilustra el marcaje dirigido por anticuerpos con un fotocatalizador (PC) o peroxidasa (HRP) en CD45. La FIG. 15E es un análisis de citometría de flujo en donde el marcaje dirigido de CD45RO en células Jurkat (que se sabe que se excluyen de la sinapsis) dio como resultado bajos niveles de marcaje transcelular Raji usando un AFC y marcaje casi cuantitativo cuando se usó HRP.

#### Ejemplo 10 - *Marcaje selectivo de proteínas con conjugados basados en moléculas pequeñas*

Para determinar primero la capacidad de un conjugado de molécula pequeña-iridio para dirigir el marcaje hacia una proteína específica, se diseñó un ensayo bioquímico sencillo de dos proteínas. Se escogió una relación equimolar de la proteína diana, anhidrasa carbónica (CA), con albúmina de suero bovino (BSA), como proteína competidora. Siguiendo esta hipótesis, la irradiación de la mezcla en presencia de diazirina etiquetada con biotina y un conjugado de sulfonamida-iridio conduciría a un marcaje selectivo de CA sobre BSA. El análisis de las relaciones de marcaje por inmunotransferencia con estreptavidina proporcionaría una indicación tanto de la eficacia de la reacción como de la selectividad. Teniendo en cuenta el efecto que el catalizador de iridio puede jugar sobre la unión del ligando, se preparó el conjugado catalizador-ligando con un conector de PEG3 (trietilenglicol) para separar espacialmente los dos componentes. Gratificadamente, después de irradiación con luz de 450 nm durante 10 minutos en presencia de biotina-peg3-diazirina, se observó un marcaje de 3,5:1 en favor de la proteína diana CA. La FIG. 16 ilustra la configuración y los resultados experimentales, incluyendo el conjugado sulfonamida-iridio y la diazirina etiquetada con biotina.

Por el contrario, cuando se realizó el marcaje en presencia de un fotocatalizador no conjugado, se biotinyló selectivamente BSA sobre CA en una proporción de 5:1. Tomados en conjunto, esto comprende un aumento de 3 veces en la selectividad de marcaje cuando se usa el conjugado de ligando-Ir, proporcionando confianza en este enfoque para identificar la diana. Es importante destacar que esta selectividad se eliminó completamente cuando el experimento dirigido se realizó con un exceso del ligando de sulfonamida no conjugado, confirmando que la selectividad observada fue el resultado de un evento de unión a proteína de ligando. Además, se encontró un enriquecimiento significativo de CA cuando se realiza el marcaje en lisado de células HEK293T, validando la compatibilidad de esta metodología con el más complejo de los entornos biológicos.

#### Ejemplo 11 - *Marcaje selectivo de proteínas con conjugados basados en moléculas pequeñas*

Se investigó adicionalmente la generalidad de los conjugados catalíticos basados en moléculas pequeñas como plataforma con respecto a la identificación de proteínas diana dirigida por ligandos. Los conjugados de molécula pequeña-iridio podrían prepararse fácilmente de una manera operativamente directa usando una reacción clic de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) entre el iridio-alquino de la FIG. 4 y una serie de conjugados de ligando-azida. La capacidad de los conjugados ligando-iridio para marcar sus dianas proteicas correspondientes se determinó por su selectividad frente a BSA como se ilustra en la FIG. 17. Se examinó primero dasatinib, un tratamiento comercializado para la leucemia mielógena muestra una unión nanomolar a la tirosina quinasa de Bruton (BTK, 5 nM). El conjugado dasatinib-Ir correspondiente condujo a un aumento de 12 veces en el marcaje en favor de BTK sobre BSA por transferencia Western en comparación con el carril de control. El inhibidor de bromodominio JQ-114 (unión 50 nM a BRD4) fue igualmente eficaz para dirigir el marcaje, proporcionando un aumento de 6 veces en el marcaje de BRD4 sobre BSA. A continuación, se examinó un aglutinante menos potente, el tratamiento para el mieloma múltiple

lenalidomida, que actúa como un pegamento molecular con la proteína cereblon (CRBN). Aunque este ligando muestra una afinidad de unión más baja (178 nM), demostró ser igualmente eficaz para dirigir la metodología de identificación de diana fotocatalítica descrita en la presente memoria, conduciendo a un cambio de 3 veces frente al control fuera de competencia. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la amplificación de la señal proporcionada por la naturaleza catalítica de esta plataforma de marcaje es capaz de superar los desafíos tradicionales de PAL usando ligandos de afinidad más débil. Además, se encontró que la selectividad del marcaje podía aumentarse con un tiempo de irradiación prolongado, apoyando adicionalmente nuestra hipótesis de marcaje catalítico.

También se buscó establecer si otras modalidades de direccionamiento, además de moléculas pequeñas, serían compatibles con la tecnología de marcaje catalítico descrita en la presente memoria. El péptido cíclico grapado  $\alpha$ -helicoidal ATSP7041, que se dirige a la ligasa E3 MDM2, podría conjugarse fácilmente al fotocatalizador a través de una azido-lisina modificada. Se observó un enriquecimiento significativo (3 veces) de la proteína diana en comparación con el control del fotocatalizador libre, tal como se proporciona en la FIG. 17. La síntesis del péptido cíclico inactivo correspondiente, que lleva una D-fenilalanina, no condujo a selectividad para el marcaje de MDM2 sobre BSA, confirmando una vez más que las interacciones son específicas de sustrato y no se basan en la afinidad de fondo.

#### Ejemplo 12 - Investigación de las interacciones proteína-proteína (PPI) de moléculas pequeñas

Las PPI son esenciales para la función celular y comprenden una clase desafiante de dianas para el descubrimiento de fármacos de moléculas pequeñas. Este reto surge, en parte, de la naturaleza transitoria de estas interacciones que pueden hacer que sean difíciles de detectar bioquímicamente. Sin embargo, se sabe que varios ligandos de molécula pequeña prominentes se unen a complejos de proteína o a proteínas que funcionan a través de complejos dinámicos. Un método que pudiera distinguir eficazmente los componentes de los complejos proteicos sería, por tanto, una herramienta importante para la investigación de las PPI. Inicialmente, se expuso para estudiar la molécula pequeña AT7519, que se une a la quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2). Está bien establecido que la CDK2 forma una PPI con la proteína ciclina A, que contribuye a la regulación del ciclo celular. Como se ilustra en la FIG. 18, la exposición de AT7519 conjugado con Ir a Ciclina A recombinante, CDK2 y BSA (como control) mostró un enriquecimiento significativo tanto de CDK2 (5 veces) como de ciclina A (2 veces) sobre el control de BSA, ejemplificando la capacidad de esta metodología para capturar interacciones transitorias que de otro modo serían difíciles de examinar.

A continuación, se abordó la exploración del eje rapamicina/mTOR en donde la rapamicina recluta FKBP12 al complejo mTOR, lo que conduce a la supresión de la respuesta inmune. Notablemente, tras la irradiación, ambas proteínas se enriquecieron en comparación con los controles (FKBP12: 2 veces, mTOR: 12 veces), a pesar de cualquier alteración en la eficacia de unión causada por el catalizador de Ir colgante, como se ilustra en la FIG. 19.

#### Ejemplo 13 - Investigación de las interacciones proteína-proteína (PPI)

Se cuestionó si el marcado estrecho de la plataforma de  $\mu$ mapeo con conjugados y agentes marcadores descritos en la presente memoria podría explotarse para identificar sitios de unión a ligando a través de una combinación de transferencia Western y análisis MS<sup>2</sup>. Para explorar mejor esto, se eligió el complejo de tres proteínas Calcineurina A/FKBP12/Calcineurina B, que se une al macrólido tacrolimus. Tras la síntesis de una gama de conjugados de tacrolimus-Ir con diferentes longitudes de conector, se encontró que los conectores cortos conducían al marcaje directamente alrededor del sitio de unión del complejo, permitiendo establecer la huella del sitio de reconocimiento molecular. Sin embargo, con el aumento de la longitud del conector, el radio de marcaje aumentó para incluir a otros miembros del complejo de proteínas, cambiando el sitio primario de marcaje. El análisis MS<sup>2</sup> del conector PEG3 apoyó estos datos, mostrando residuos marcados directamente adyacentes al sitio de unión (FIG. 20, izquierda).

Se examinó entonces un complejo de cuatro proteínas en donde las proteínas vecinas no interactúan directamente con el ligando de molécula pequeña, para demostrar que puede conseguirse el marcaje de agentes de interacción de proteínas a través del espacio. Para ello, se eligió el complejo de ligasa E3 CRBN/DDB1/Cul4a/RBX1. En línea con los ejemplos anteriores descritos en la presente memoria, cuando se empleó un conector corto, solo se marcó la diana primaria CRBN, sin embargo, con el aumento de la longitud del conector, las proteínas vecinas en el complejo de ligasa E3 pudieron capturarse con esta tecnología. El análisis proteómico de la reacción de marcaje que emplea un conector PEG3 mostró una huella molecular del sitio de unión a molécula pequeña en CRBN además de sitios marcados en el Cul4a vecino, que presumiblemente surgen de interacciones proteína-proteína secundarias (FIG. 20, derecha).

#### Ejemplo 14 - Identificación de receptores de la superficie celular

El receptor de adenosina A2a (ADORA2A) como diana de membrana ejemplar. Este GPCR se ha convertido en una diana importante para la inmunoterapia, pero críticamente, nunca se ha identificado a través de quimioproteómica de células vivas. Usando un ligando descrito para ADORA2A, **A2a**, se sintetizó un conjugado con Ir (**A2a-Ir**) y un conjugado de diazirina unido, como se describe por Yao (**A2a-Dz**) (FIG. 21). Las afinidades de unión de los conjugados de molécula pequeña se midieron después para asegurar la potencia retenida para la diana propuesta tras la conjugación. Mientras que la diazirina de Yao retuvo la unión cercana a la del compuesto parental (0,8 nM frente a 4,8 nM para A2a parental), sorprendentemente, el conjugado con Ir mostró una afinidad de unión >100 veces menor (643 nM). Sin embargo, la metodología de marcaje fotocatalítica descrita en la presente memoria en células HEK293T que expresan ADORA2A, seguido de inmunoprecipitación con estreptavidina y análisis de transferencia Western, reveló

una marcada diferencia en el marcaje entre la diazirina-A2a de tipo Yao estequiométrica y la sonda de iridio-A2a. La inmunotinción no mostró ninguna señal correspondiente a ADORA2A enriquecida después del marcaje con la diazirina-A2a de tipo Yao; sin embargo, se observó un enriquecimiento significativo usando la plataforma de marcaje fotocatalítica descrita en la presente memoria. El análisis quimioproteómico basado en TMT de estas reacciones confirmó el resultado inicial, mostrando el método de marcaje fotocatalítico descrito en la presente memoria un cambio de veces de  $3 \log_2$  en el enriquecimiento para ADORA2A, proporcionando la identificación de diana indiscutible de un GPCR. Por el contrario, usando la diazirina estequiométrica, ADORA2A no se enriqueció estadísticamente, en línea con los datos previos. (FIG. 22). De manera crucial, la pérdida significativa de afinidad del conjugado ligando-iridio por su proteína diana está muy compensada por la amplificación catalítica de la señal conferida por esta plataforma de marcaje.

5

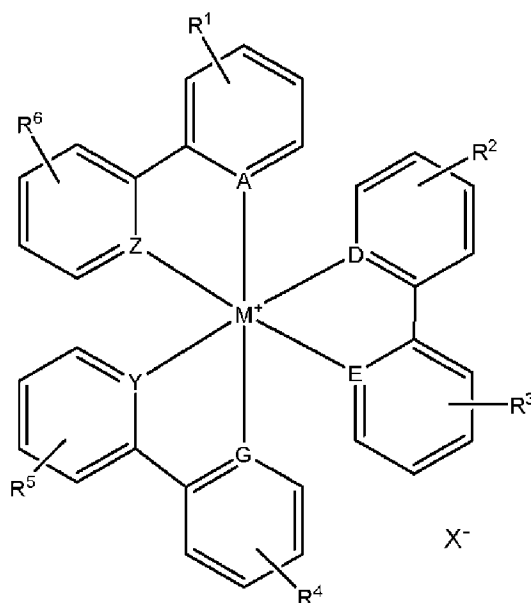
10 Ejemplo 15 - *Identificación de receptores de la superficie celular*

El receptor GPR40 humano (hGPR40) también se sometió a marcaje con composiciones y métodos descritos en la presente memoria. Se empleó un conjugado hGPR40-Ir junto con un agente marcador de proteínas de diazirina biotinilada (Diaz-PEG3-Bt) (FIG. 23). También se usó un ligando de hGPR40-como competidor. Se trataron células HEK-hGPR40 con conjugados de hGPR40-Ir o fotocatalizador de Ir-alquino libre durante 30 minutos, se lavaron y se irradiaron durante 10 min a 450 nm después del tratamiento con (Díaz-PEG3-Bt). Los lisados celulares se procesaron y analizaron mediante transferencia Western con estreptavidina-800 y tinciones de proteínas totales, como se proporciona en las FIG. 24A y 24B.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el marcaje de proteínas basado en proximidad que comprende:  
 un fotocatalizador; y  
 un agente marcador de proteínas, en donde el fotocatalizador tiene una estructura electrónica para activar el agente marcador de proteínas en un intermedio reactivo mediante transferencia de energía, y en donde el intermedio reactivo se inserta en un enlace C-H de una proteína.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el intermedio reactivo es un radical carbeno, nitreno o fenoxi.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el intermedio reactivo tiene un radio de difusión menor de 4 nm antes de la inactivación en un entorno acuoso o de base acuosa.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde el intermedio reactivo tiene una semivida ( $t_{1/2}$ ) menor de 5 nanosegundos.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde la transferencia de energía es transferencia de energía Dexter.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la transferencia de energía es transferencia de electrones individuales.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde la transferencia de energía es de un estado excitado triplete del fotocatalizador.
8. La composición de la reivindicación 7, en donde el fotocatalizador absorbe luz en la región visible del espectro electromagnético.
9. La composición de la reivindicación 1, en donde el fotocatalizador es un fotocatalizador de metal de transición que tiene absorción en la región visible del espectro electromagnético.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde la transferencia de energía es de un estado excitado triplete del fotocatalizador, teniendo el estado excitado triplete una energía mayor de ~250 kJ/mol (60 kcal/mol).
11. La composición de la reivindicación 9, en donde el fotocatalizador de metal de transición tiene la fórmula



- en donde M es un metal de transición;
- en donde A, D, E, G, Y y Z se seleccionan independientemente de C y N;
- en donde  $R^1 - R^6$  representa cada uno de uno a cuatro sustituyentes de anillo opcionales, cada uno de los uno a cuatro sustituyentes de anillo opcionales seleccionados independientemente del grupo que consiste en alquilo, heteroalquilo, haloalquilo, halo, hidroxilo, alcoxi, amina, amida, éter,  $-C(O)O^-$ ,  $-C(O)OR^7$ , y  $-R^8OH$ , en donde  $R^7$  se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo, y  $R^8$  es alquilo; y
- en donde  $X^-$  es un contraión.

12. La composición de la reivindicación 10, en donde el fotocatalizador de metal de transición es soluble en un entorno acuoso o de base acuosa.
13. La composición como en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el agente marcador de proteínas es una diazirina o azida.
- 5 14. La composición de la reivindicación 1, en donde el catalizador es un órgano-fotocatalizador.
15. La composición de la reivindicación 14, en donde el órgano-fotocatalizador se selecciona del grupo que consiste en un grupo tioxantona, fenoltiazina, flavina, fenoazina, cumarina, acetofenona y benzofenona.
16. La composición de la reivindicación 15, en donde la transferencia de energía es transferencia de electrones individuales.
- 10 17. La composición de la reivindicación 1, en donde el agente marcador de proteínas está funcionalizado con un marcador, seleccionándose el marcador del grupo que consiste en funcionalidades biotina, destiobiotina, alquino, azida, etiqueta FLAG, fluoróforo y cloroalcano.

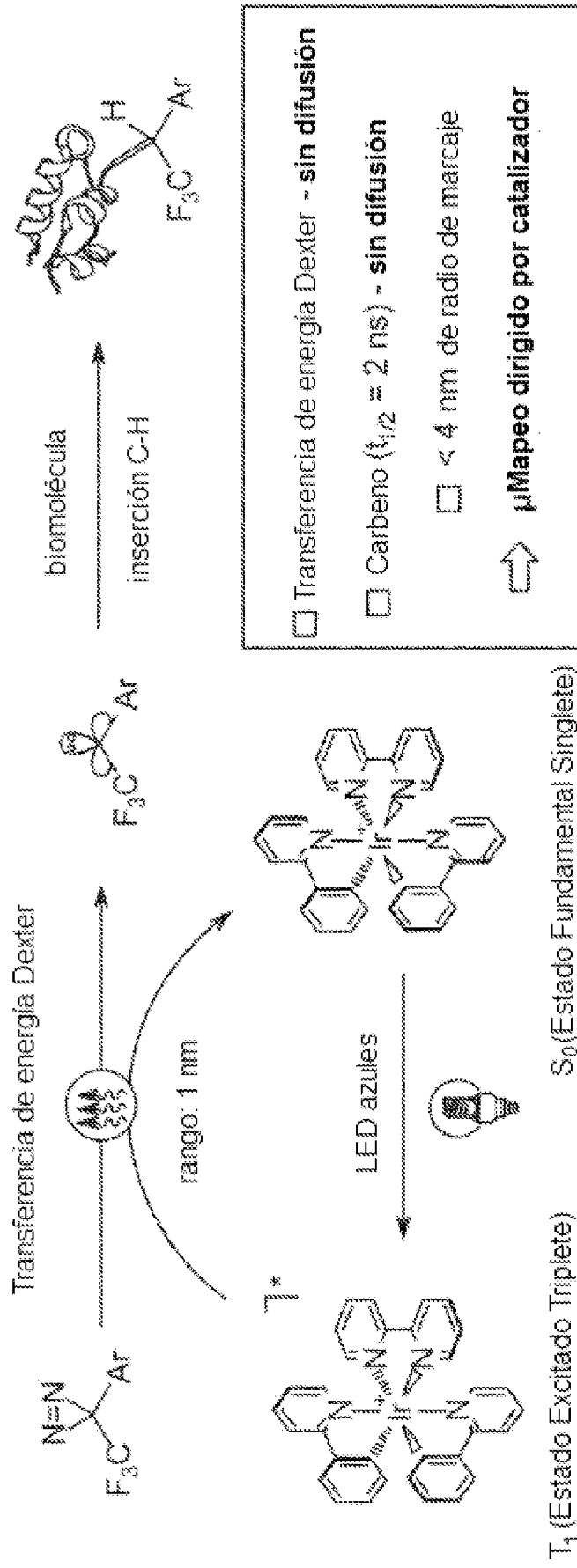


FIG. 1

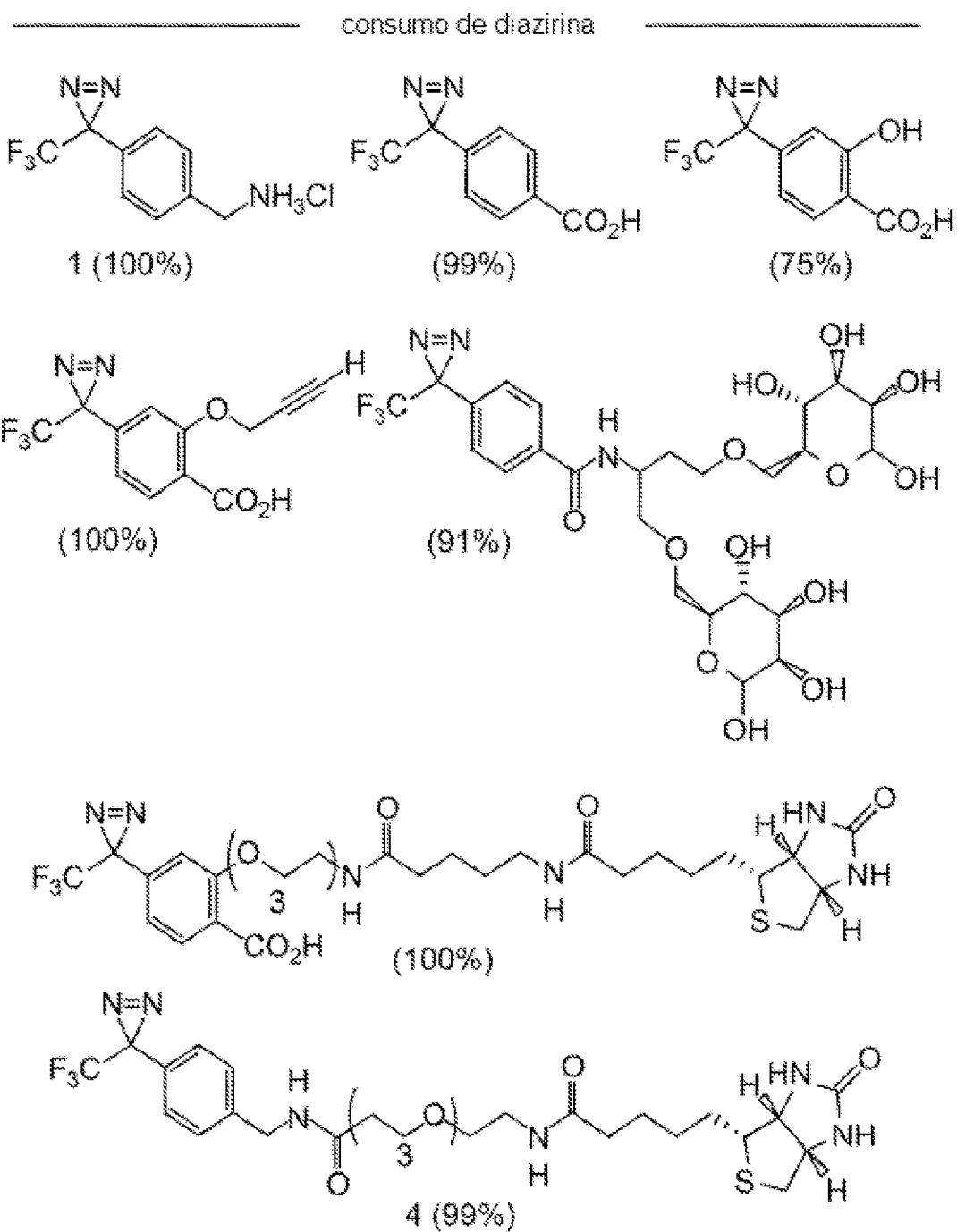
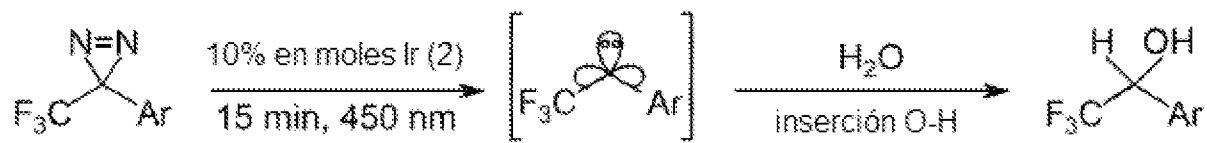


FIG. 2

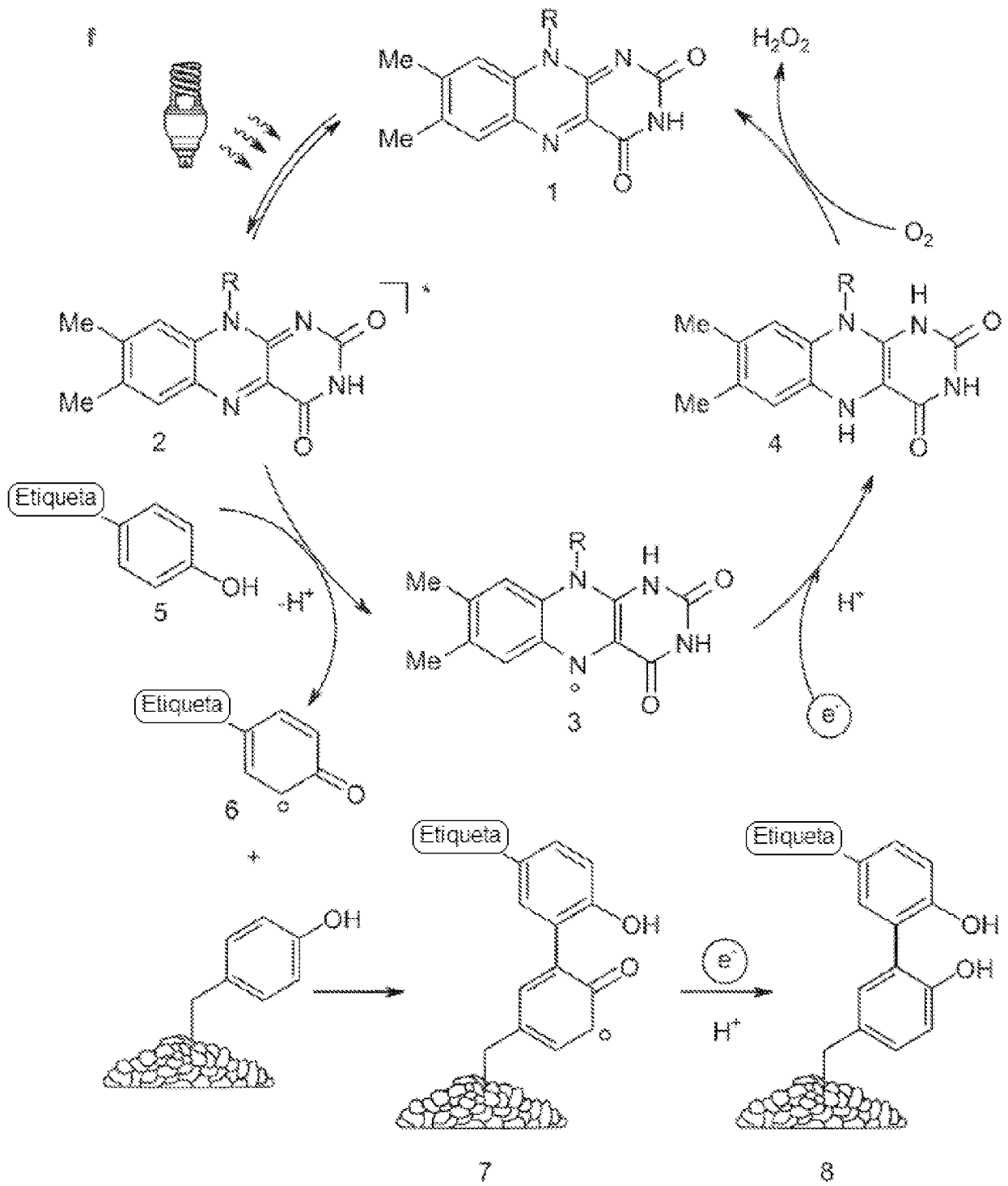


FIG. 3

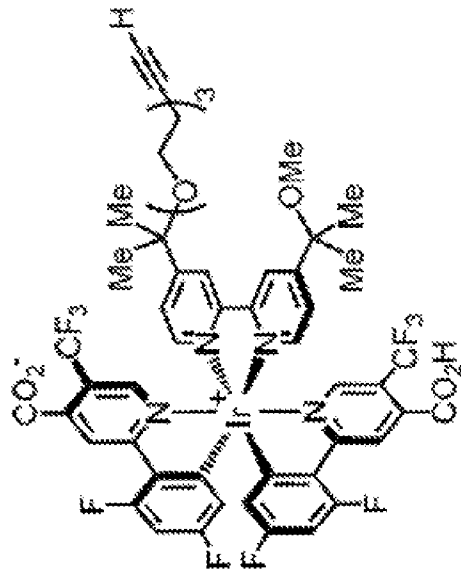
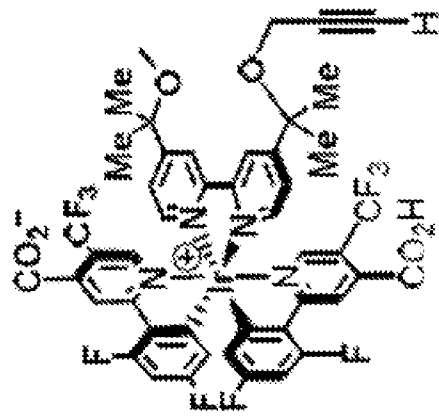


FIG. 4

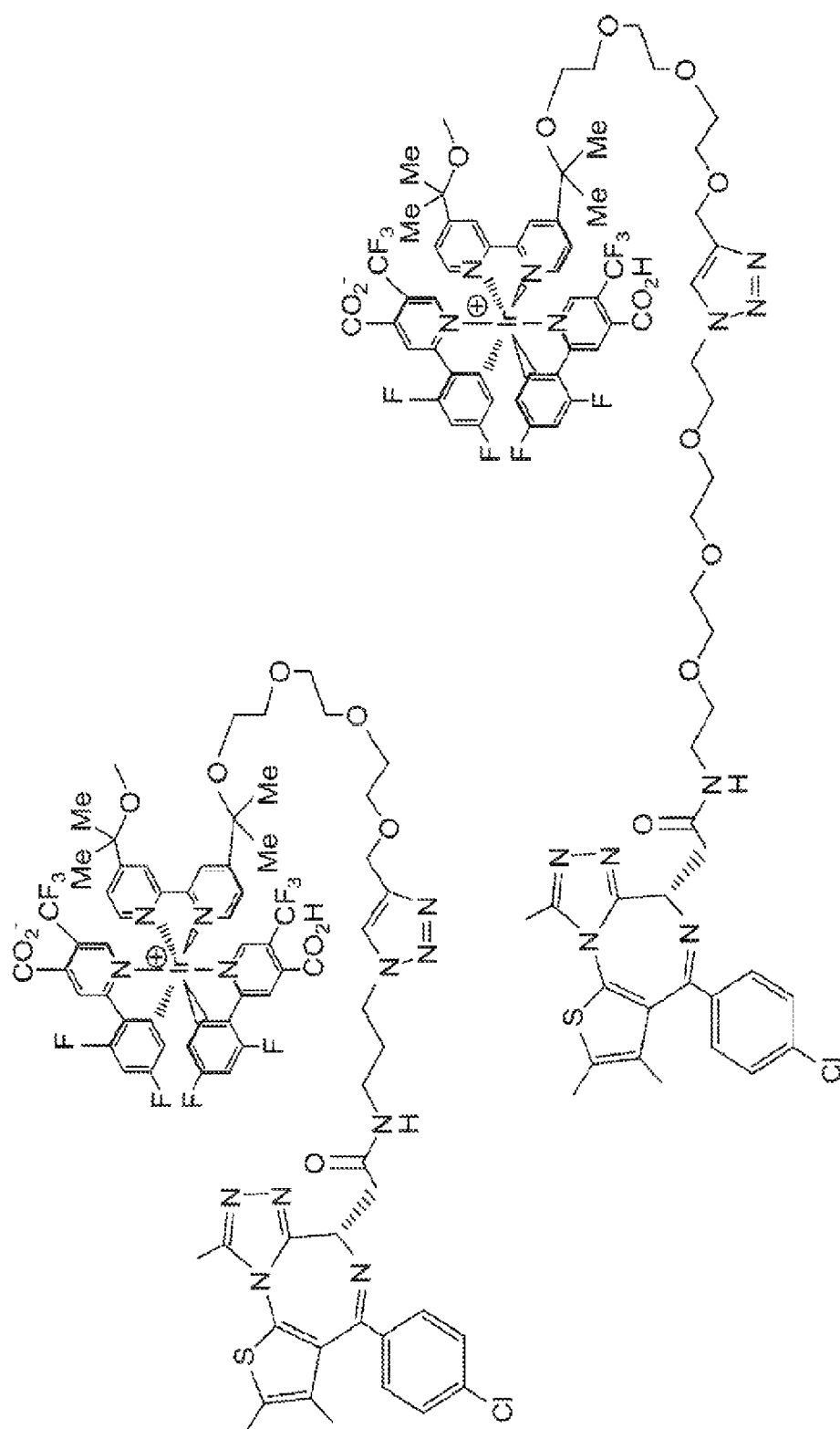


FIG. 5

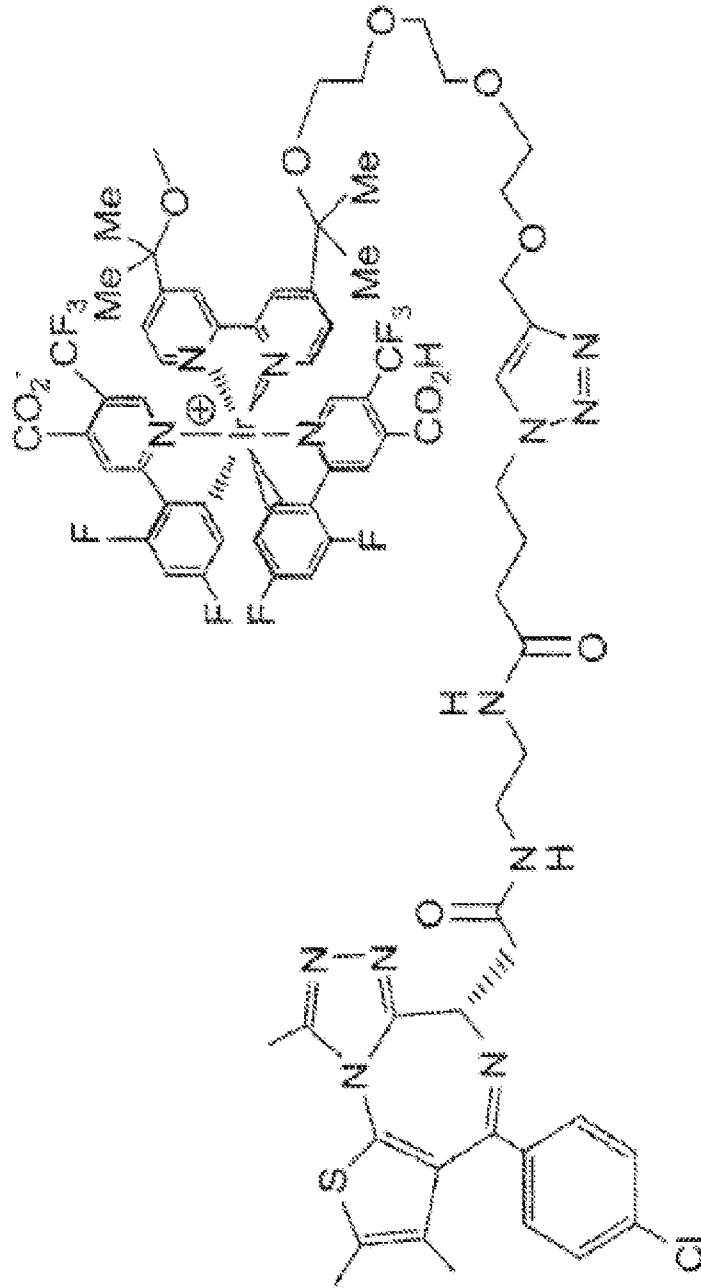


FIG. 5 (Continuación)

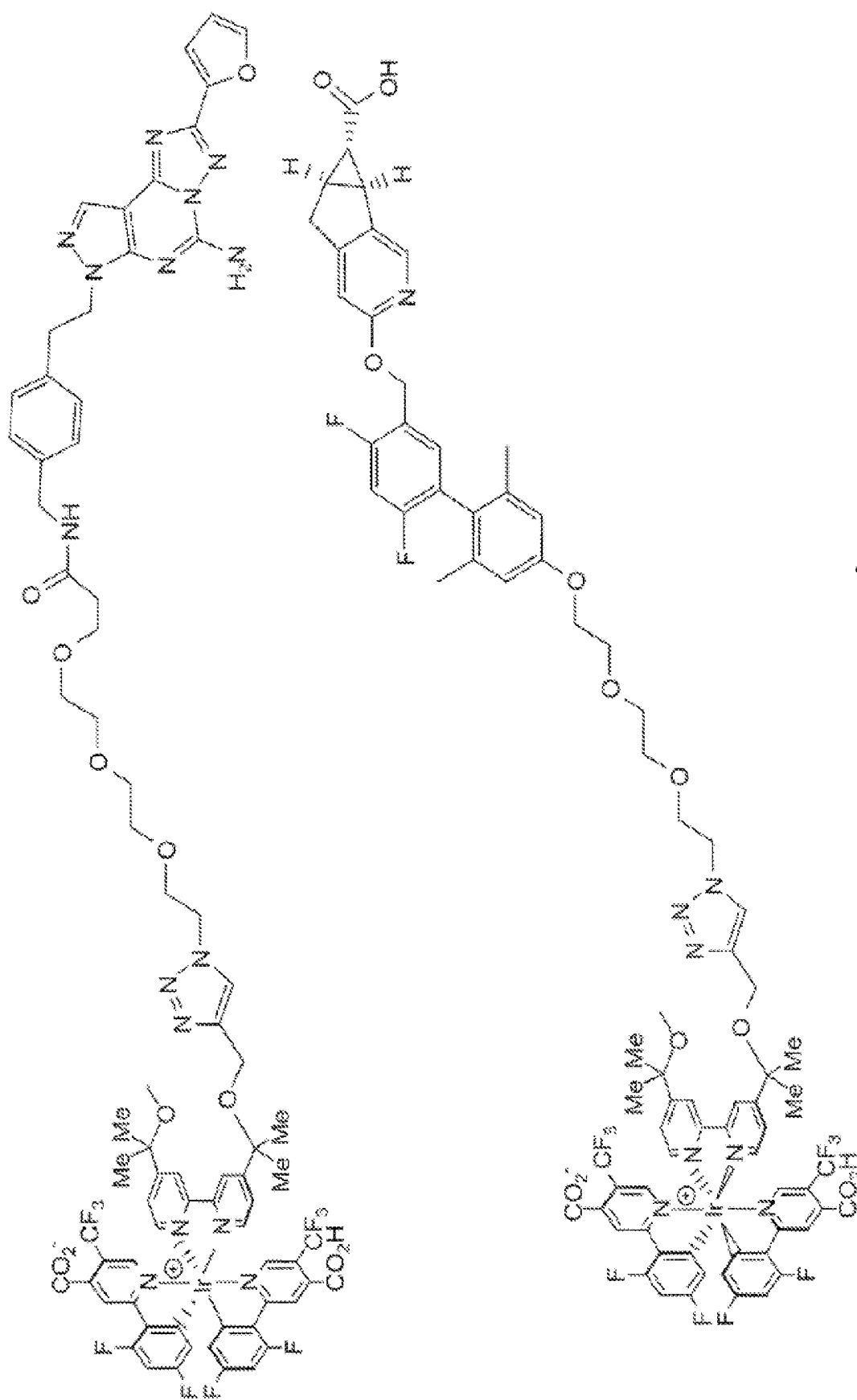


FIG. 5 (Continuación)



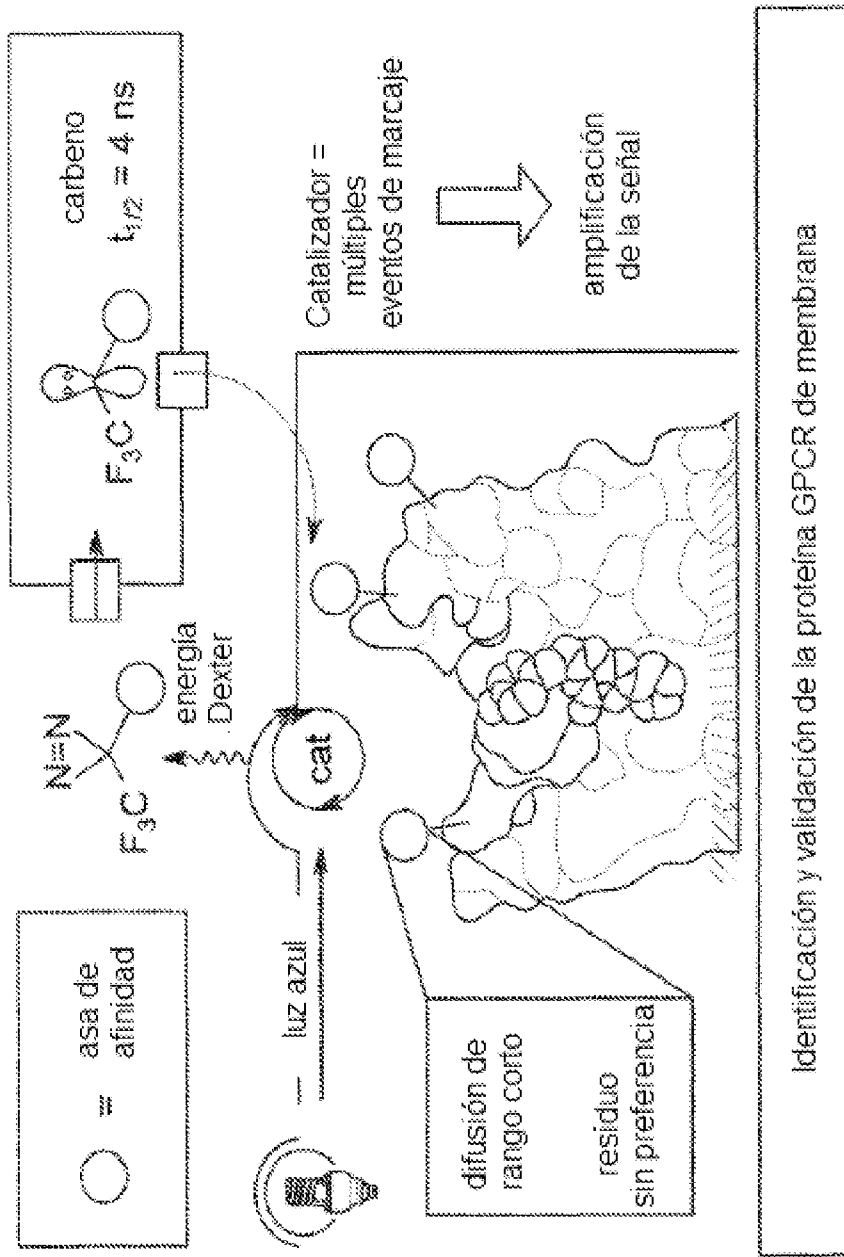
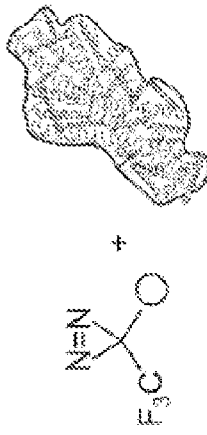
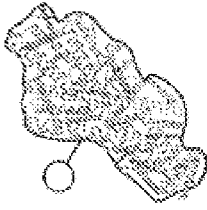
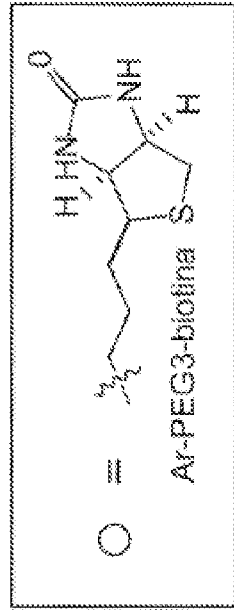


FIG. 6B



BSA-conjugado

BSA

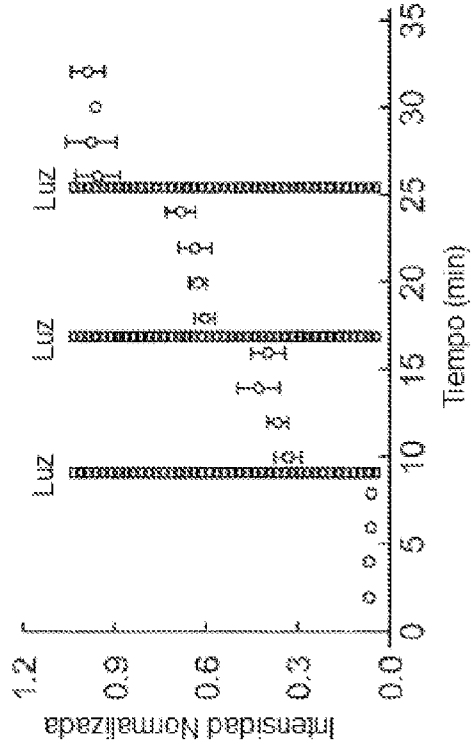
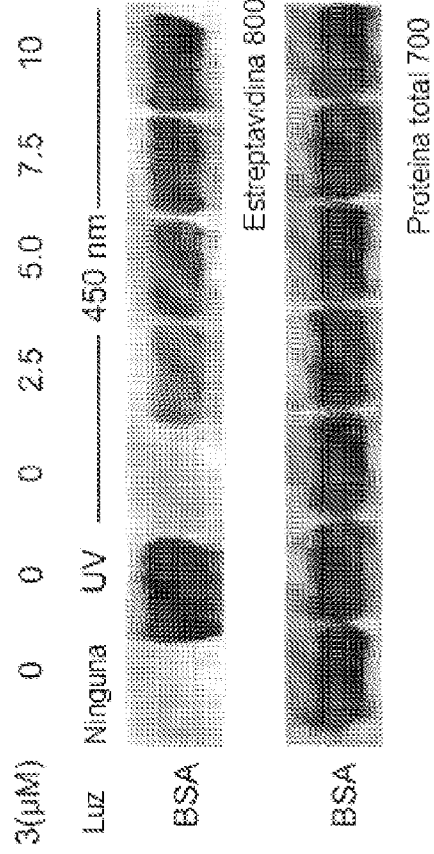


FIG. 7A

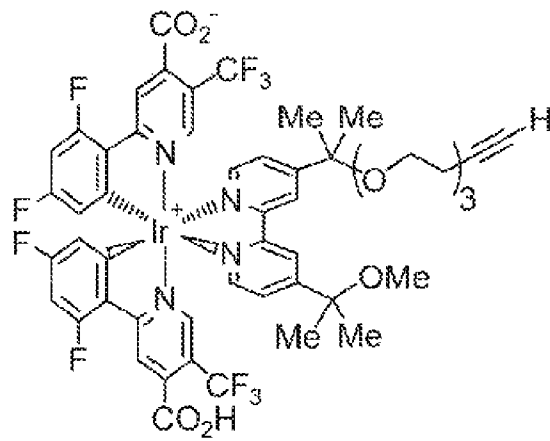


FIG. 7B



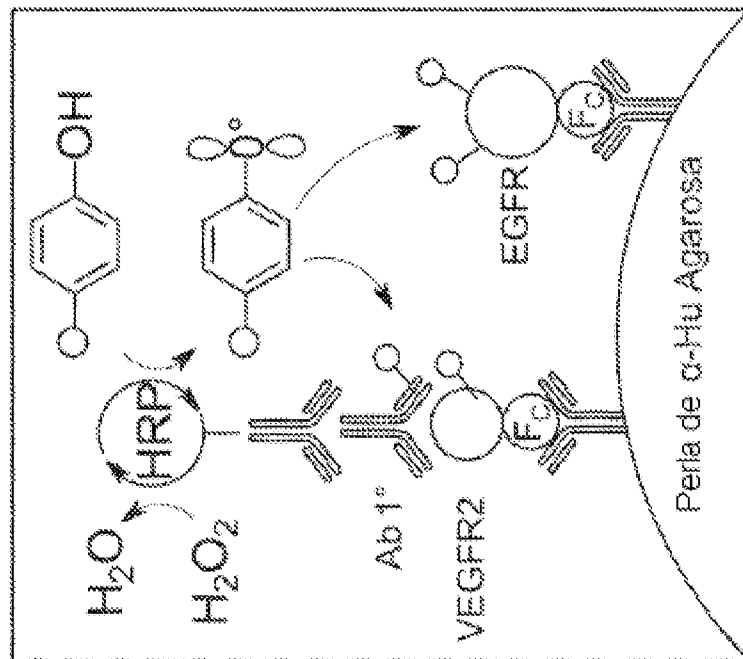
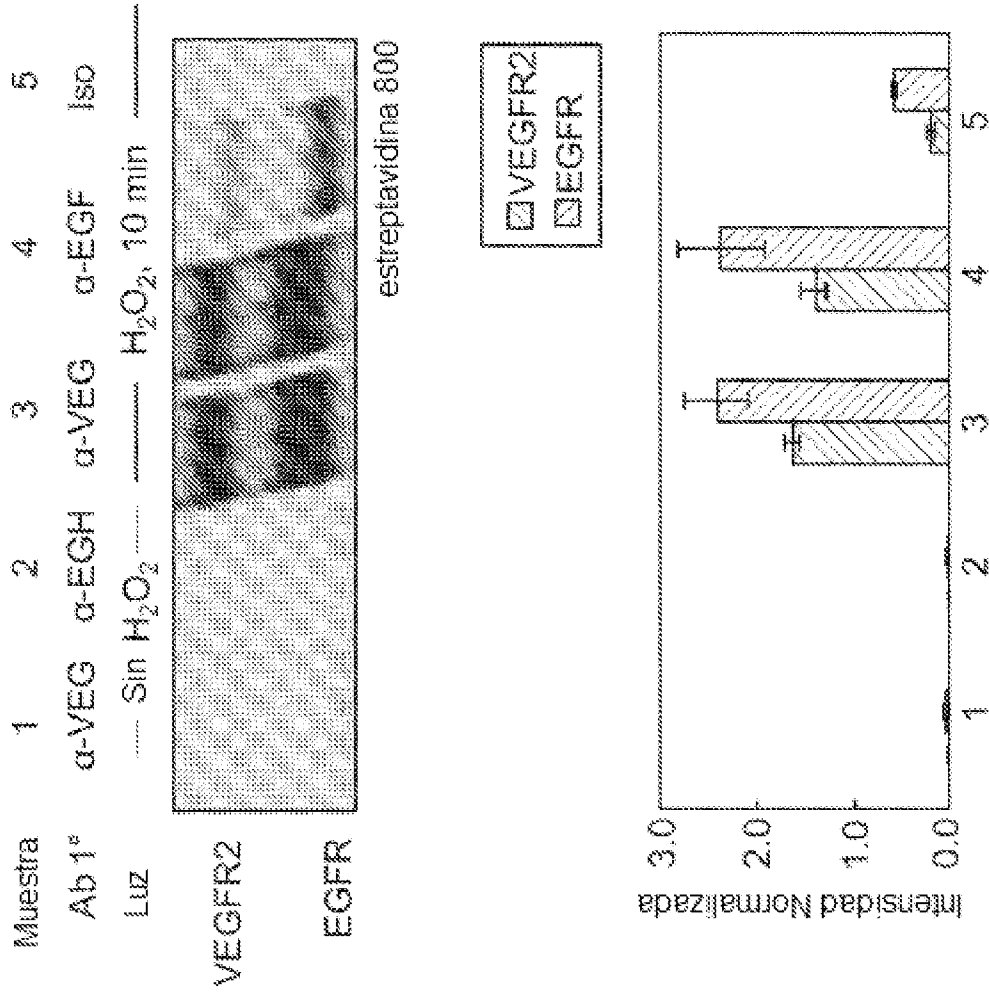


FIG. 8B

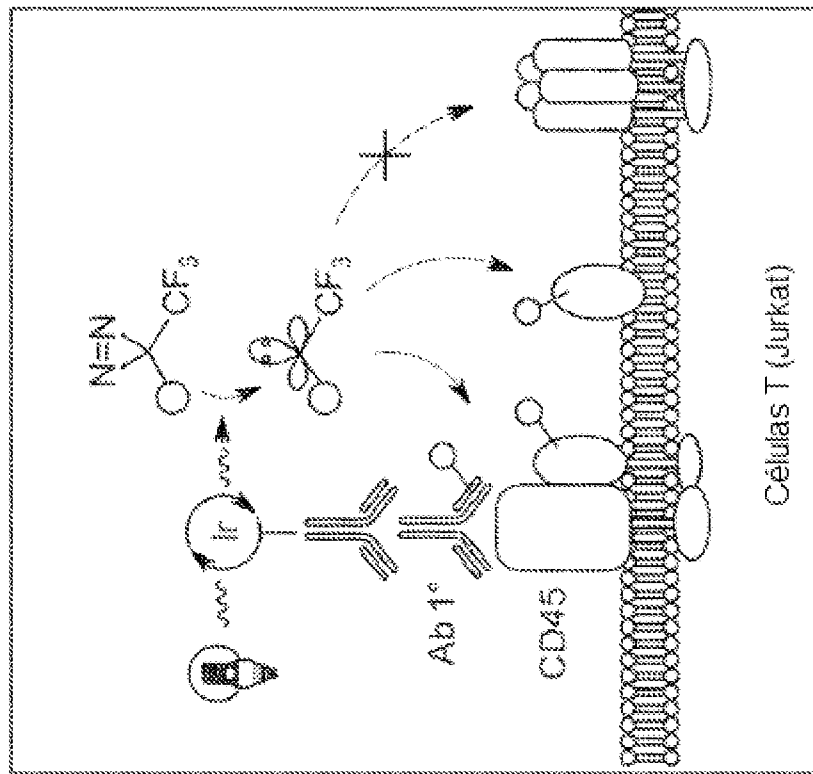
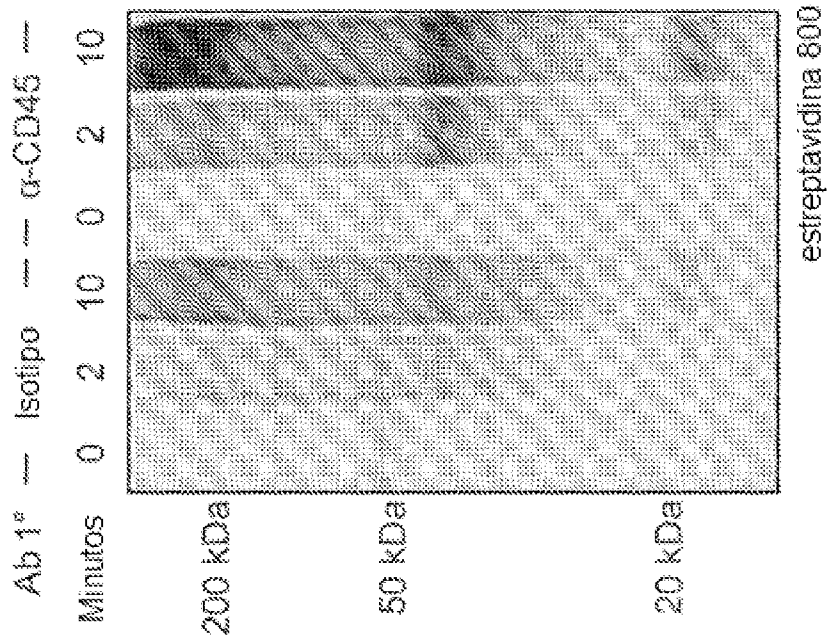


FIG. 9A

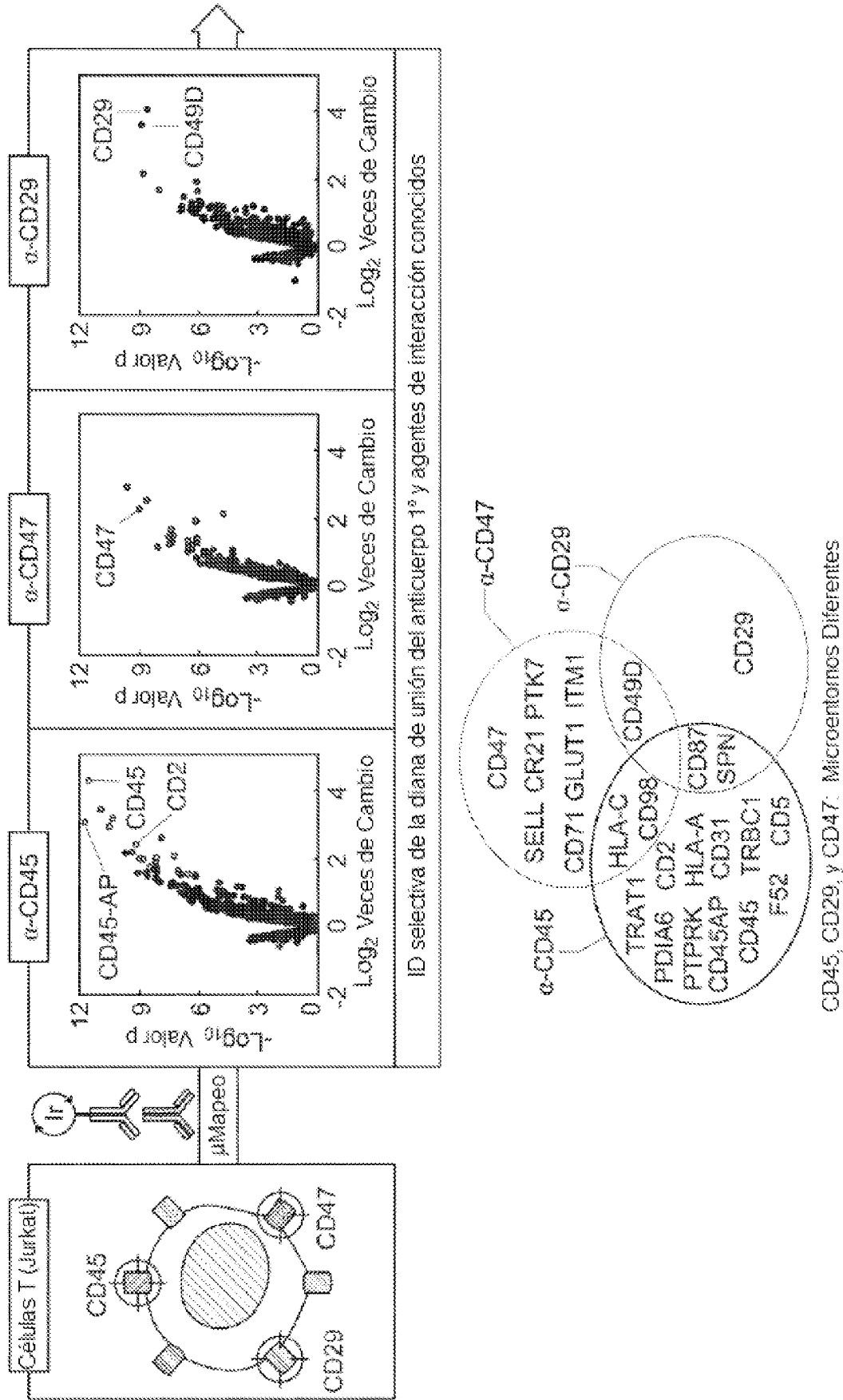


FIG. 9B

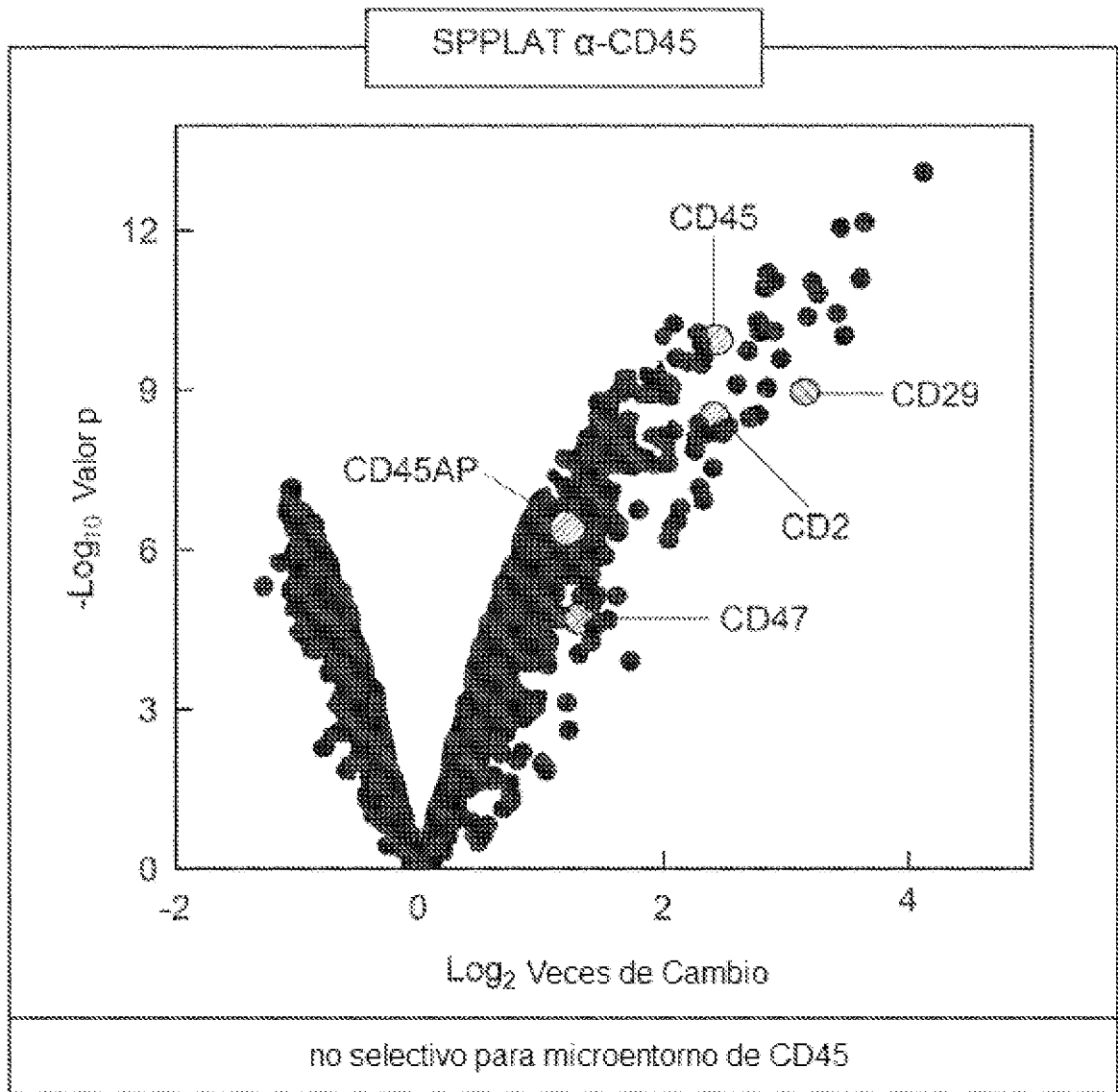


FIG. 9C

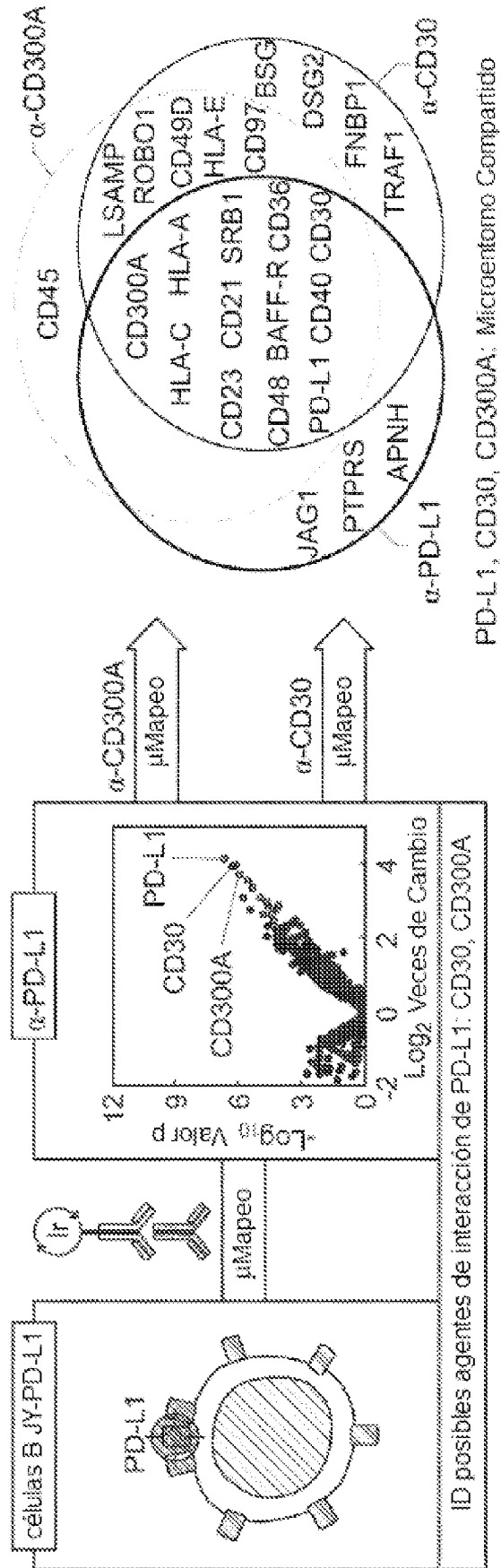


FIG. 10A

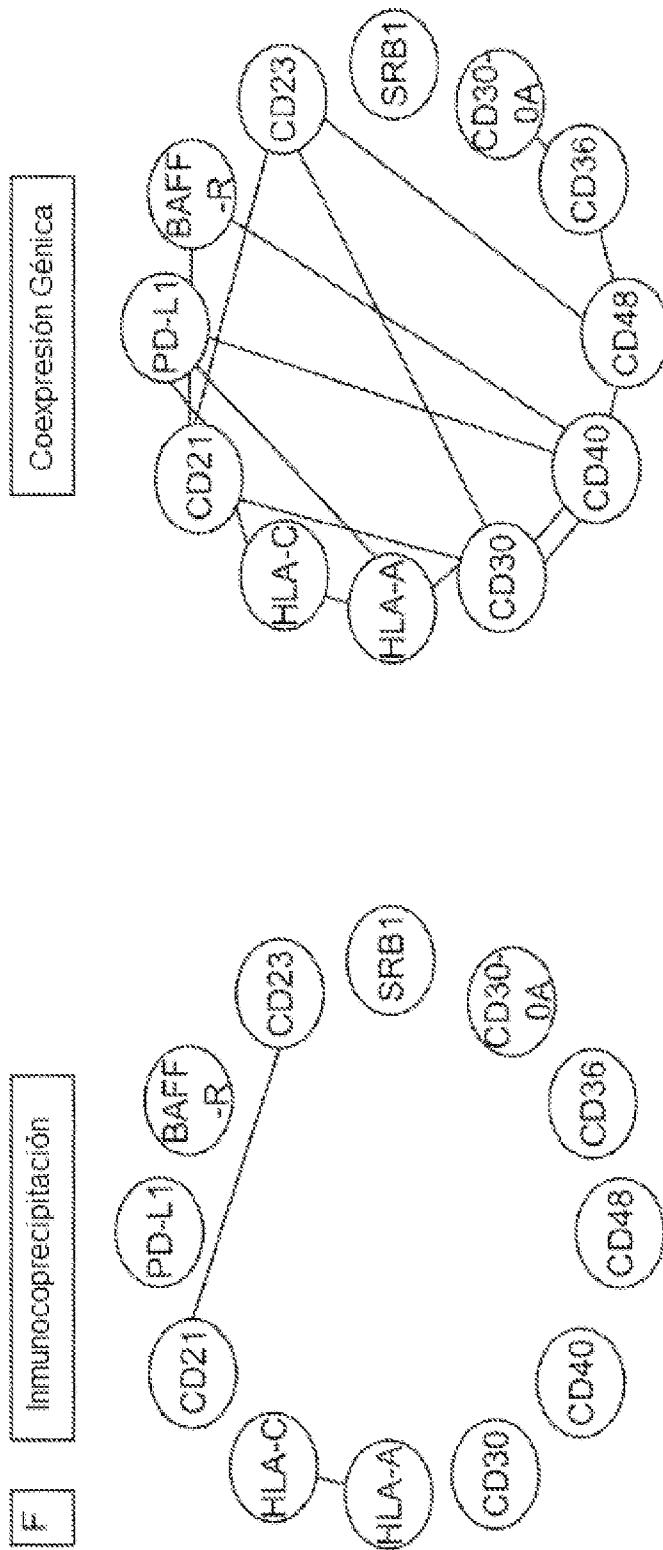


FIG. 10B

Este trabajo (μMapeo)

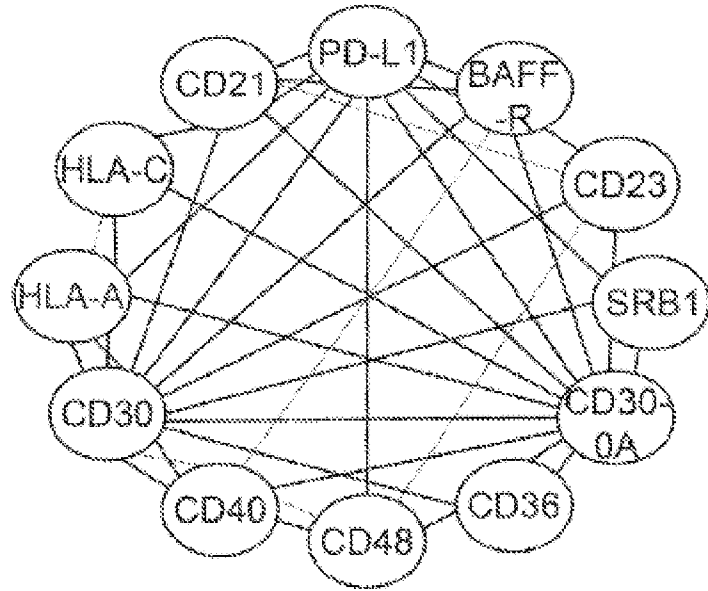


FIG. 10B (Continuación)

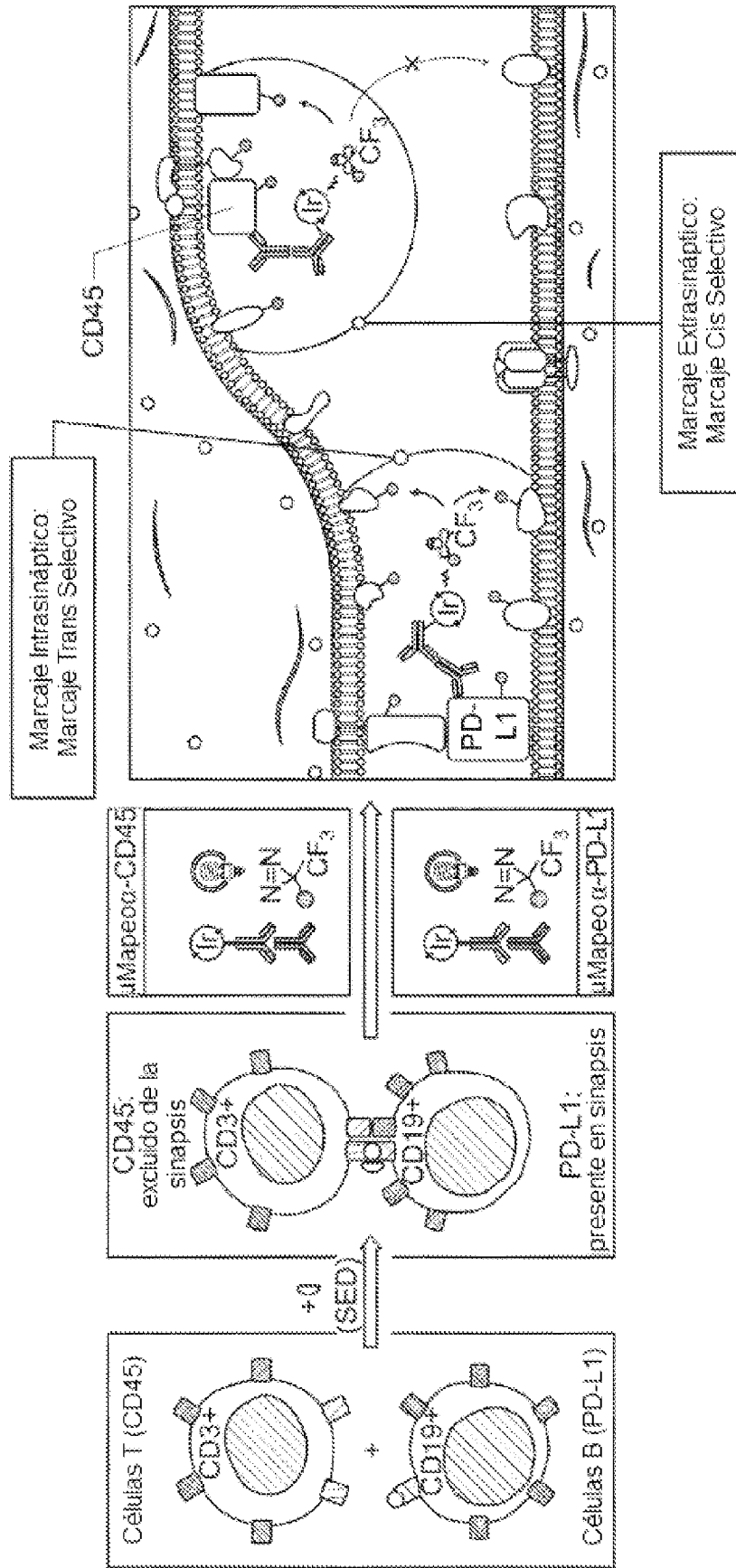


FIG. 11A

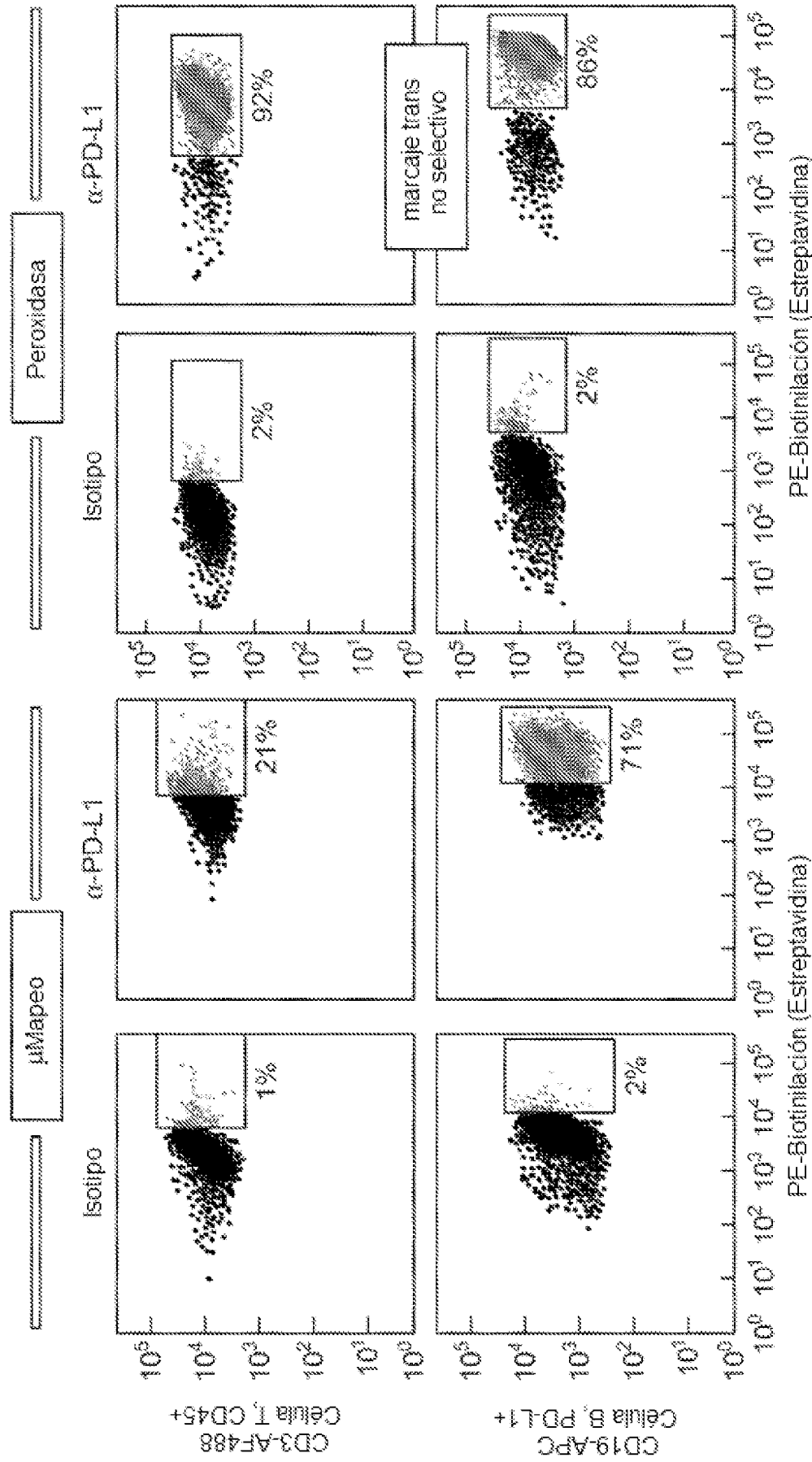


FIG. 11B

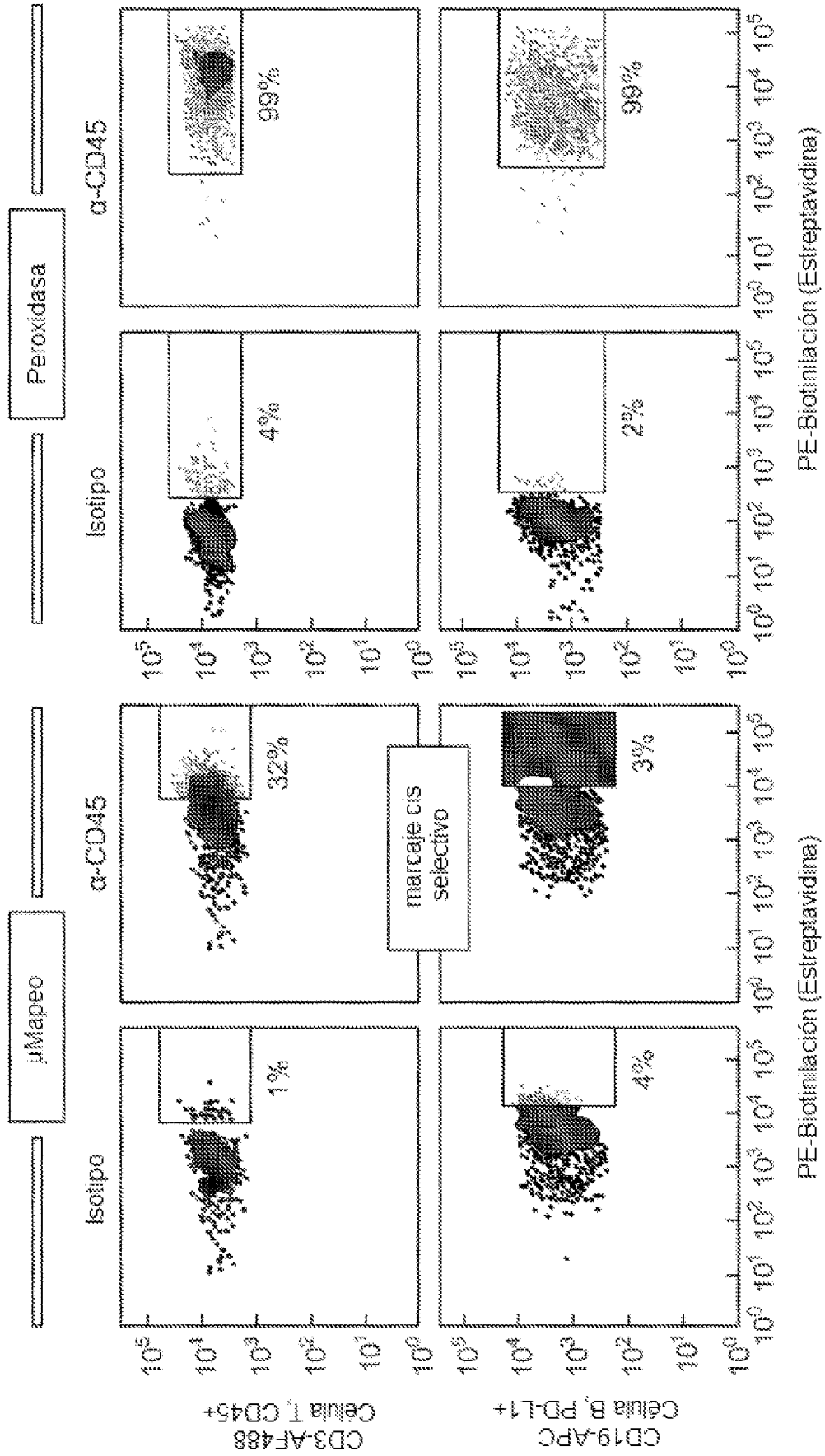


FIG. 11C

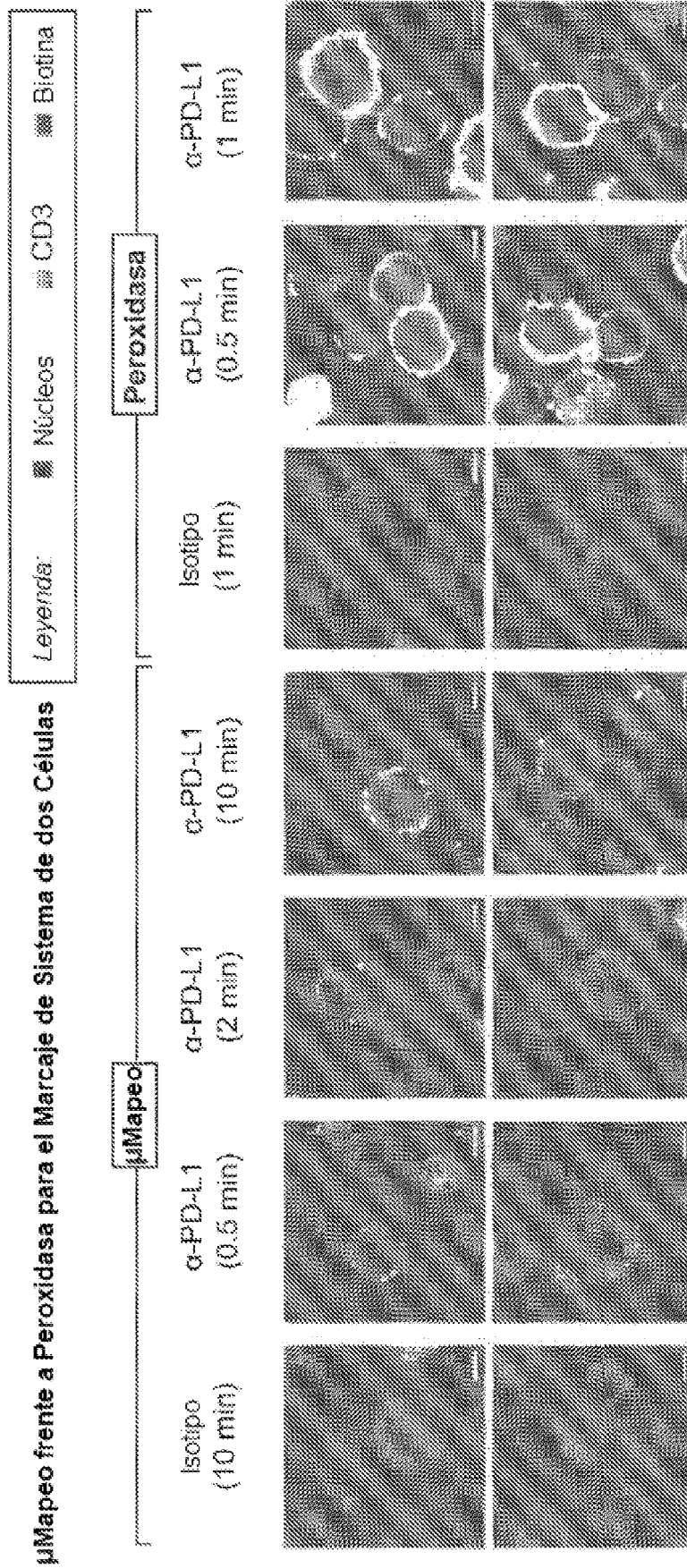


FIG. 11D

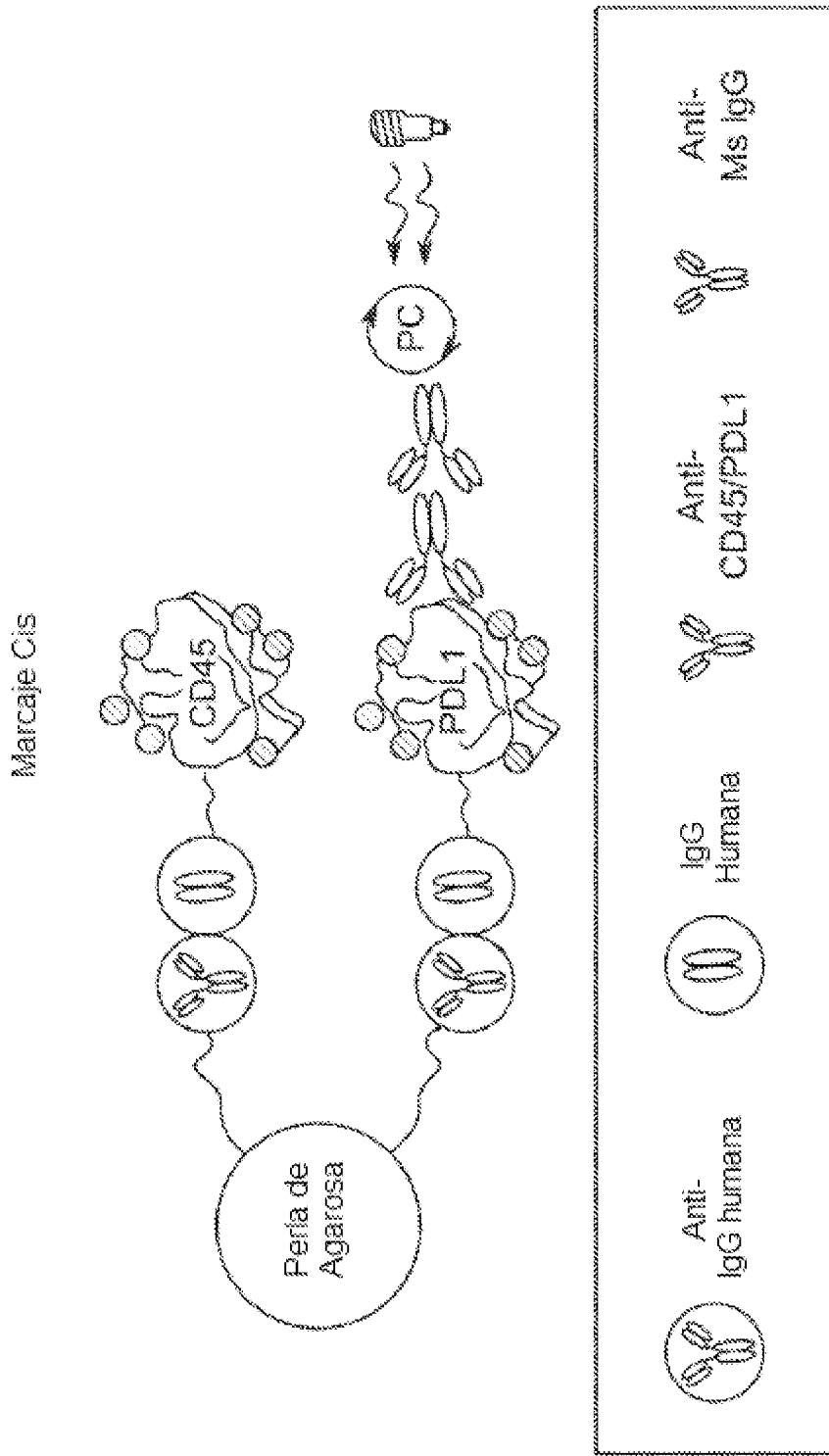


FIG. 12A

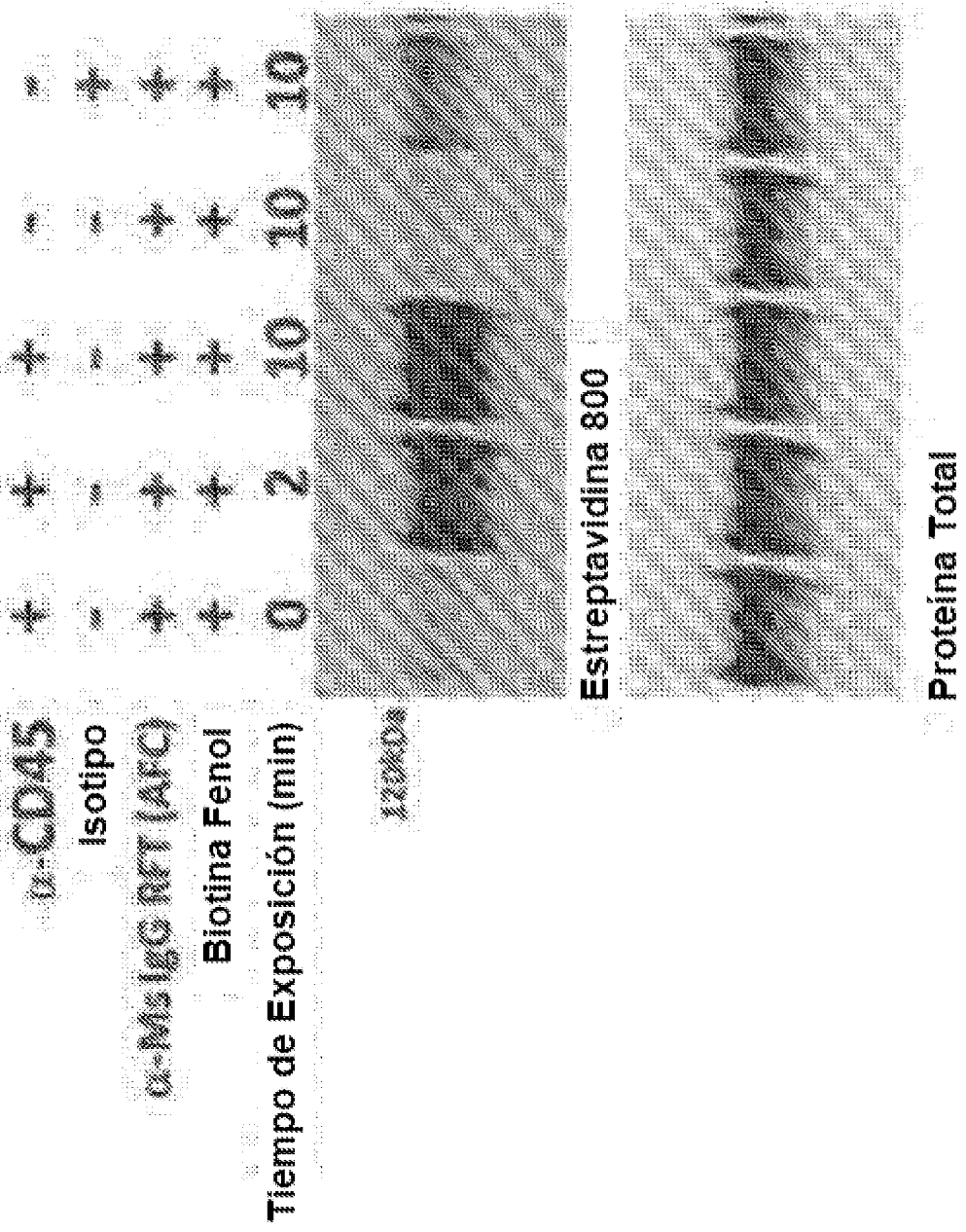


FIG. 12B

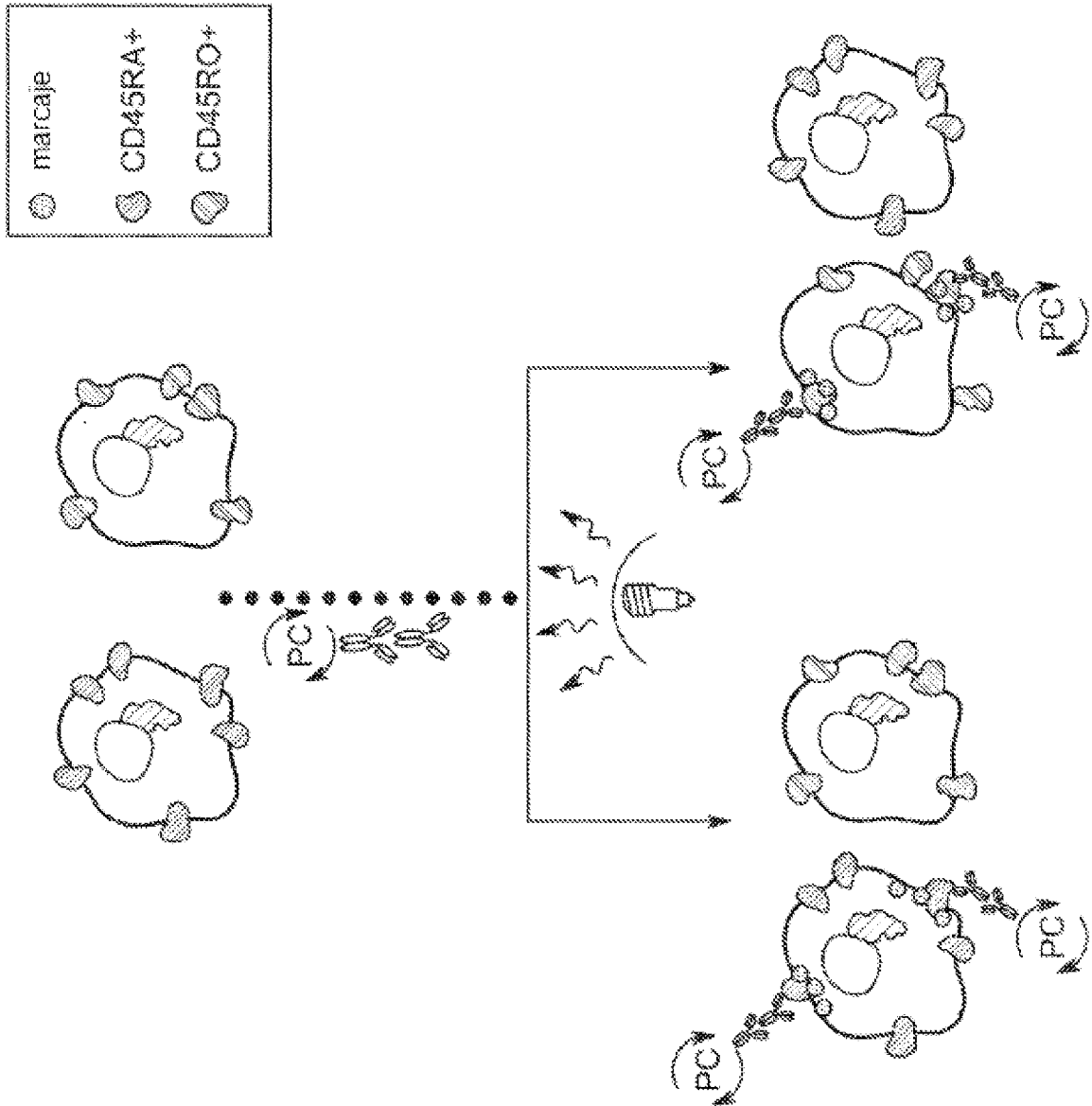


FIG. 12C

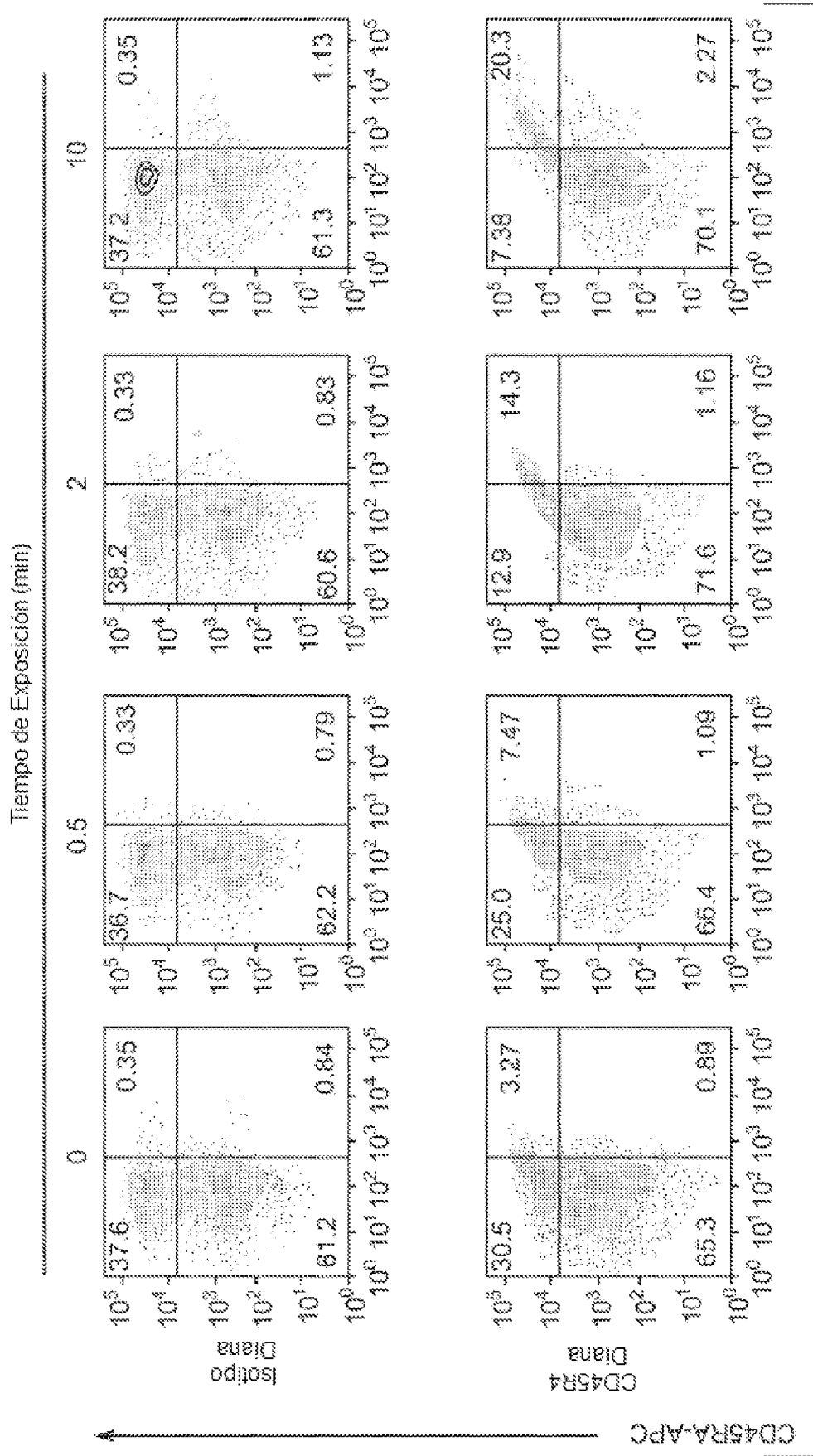


FIG. 12D

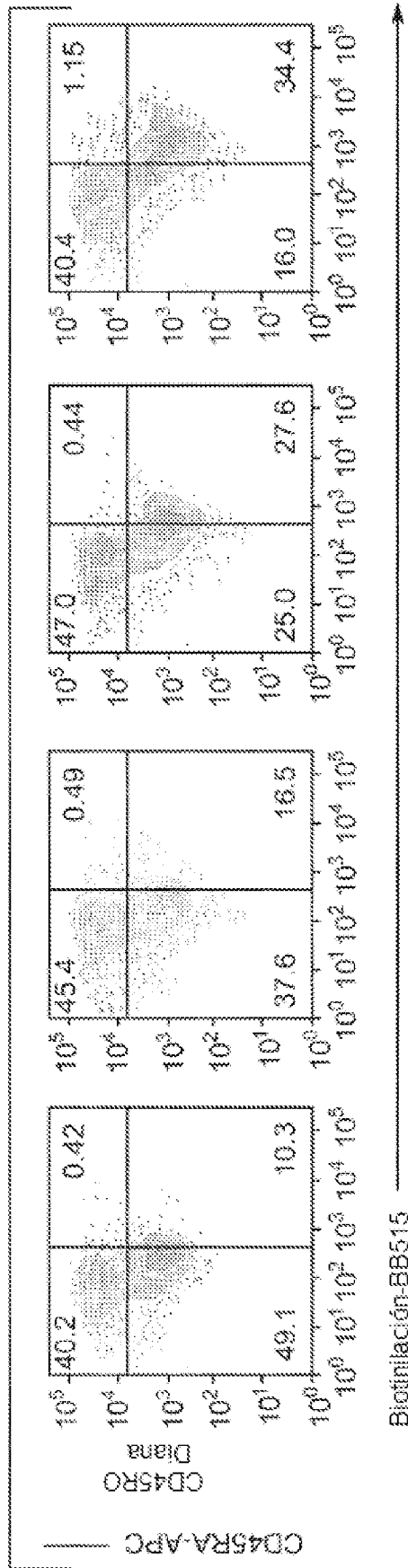


FIG. 12D (Continuación)

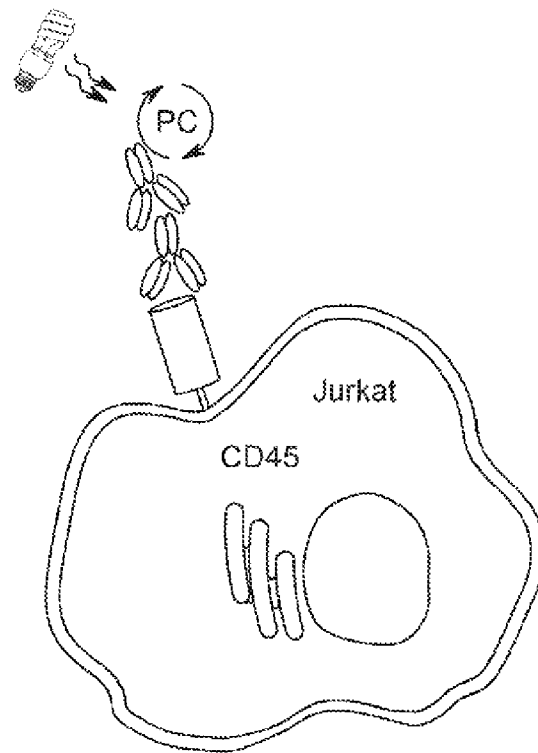
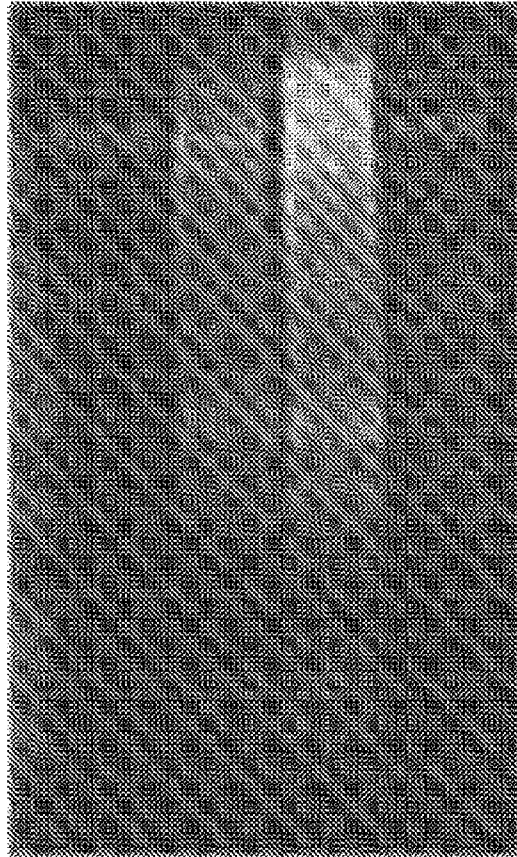


FIG. 13A

$\alpha$ -CD45	+	+	+	-
Isotipo	-	-	-	+
$\alpha$ -Ms IgG RFT (AFC)	+	+	+	+
Exposición a la Luz (min)	0	2	10	10



Estreptavidina 800

CD45

FIG. 13B

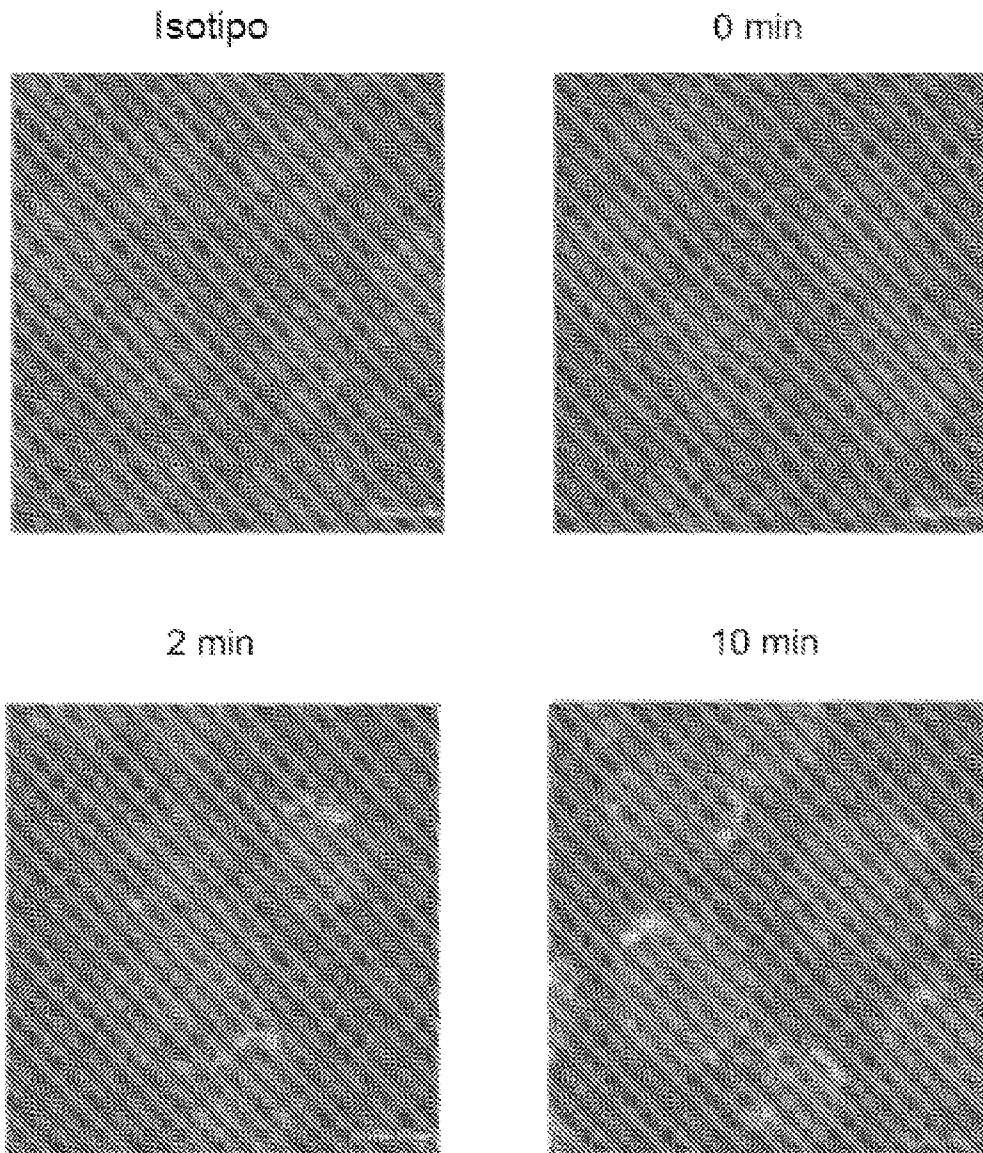


FIG. 13C

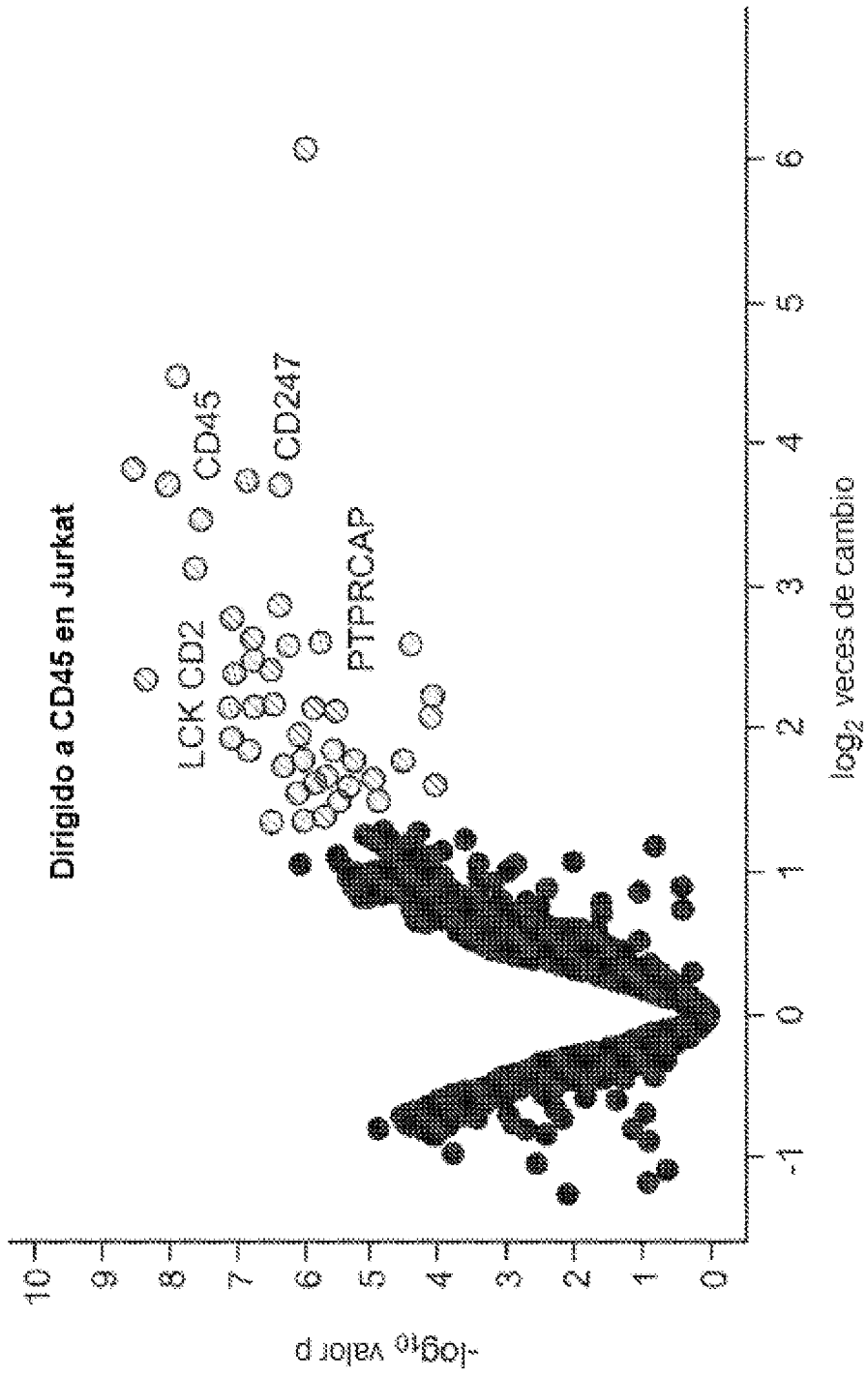


FIG. 13D

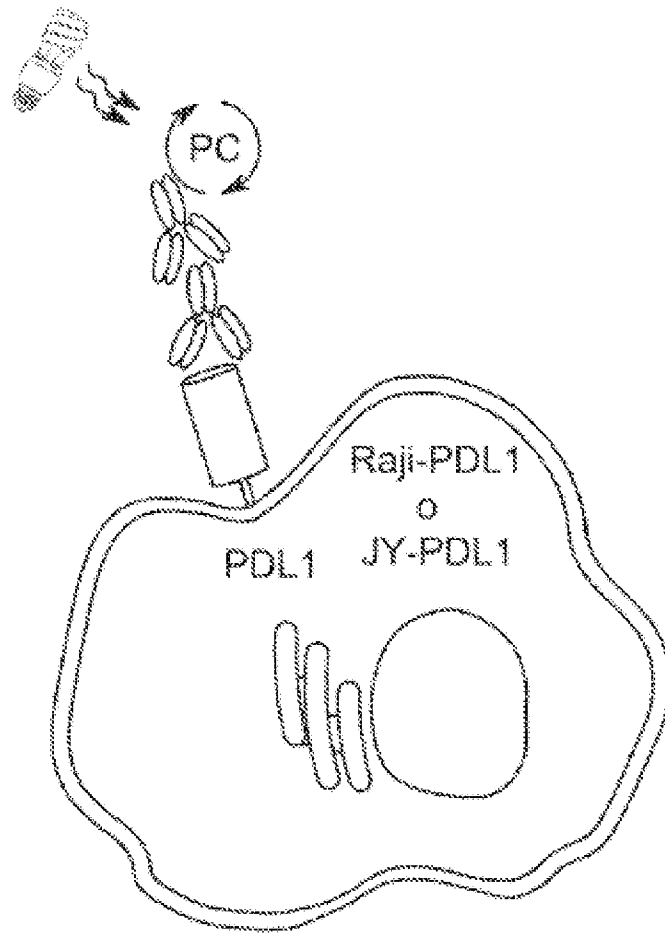


FIG. 14A

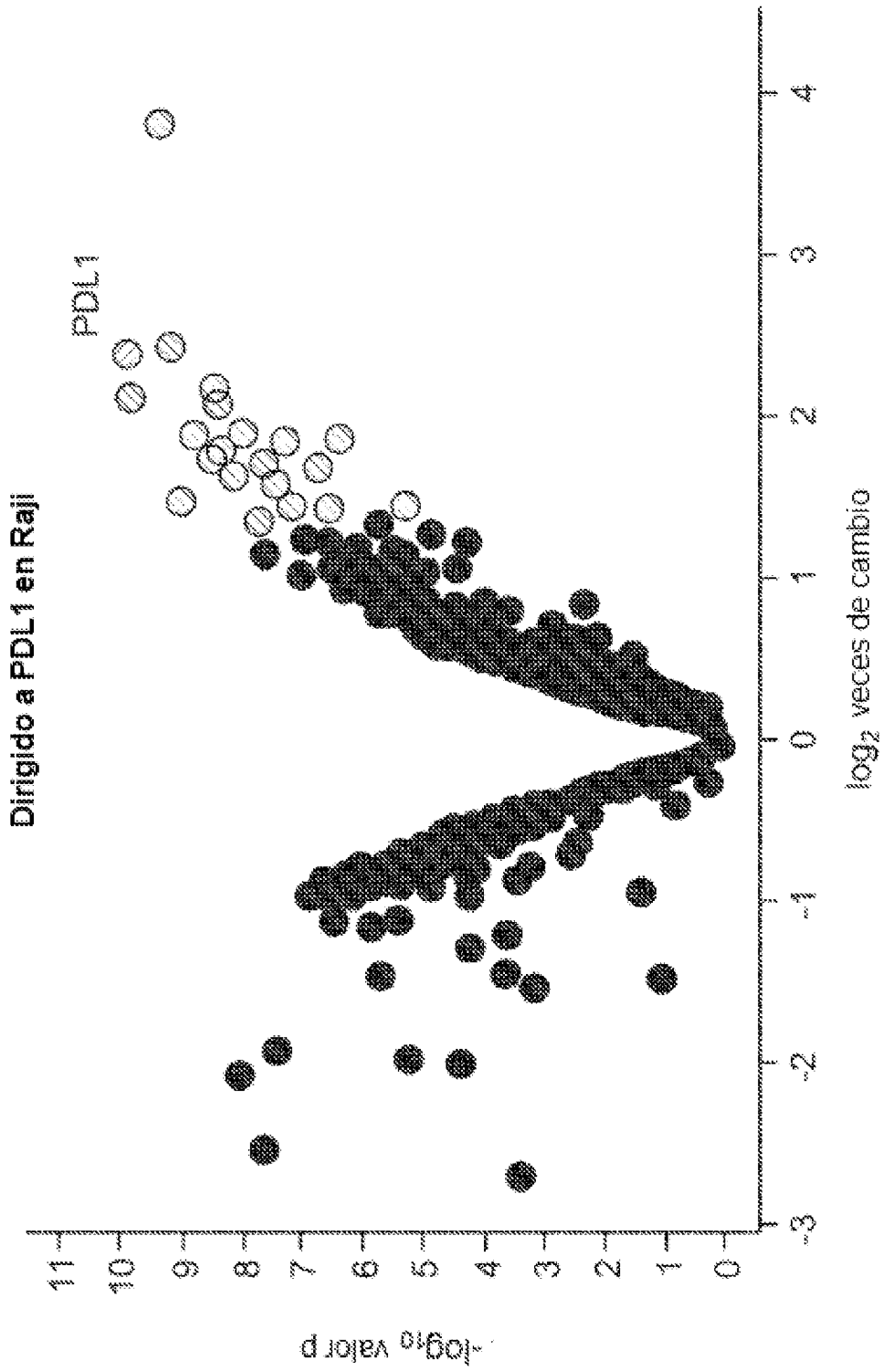


FIG. 14B

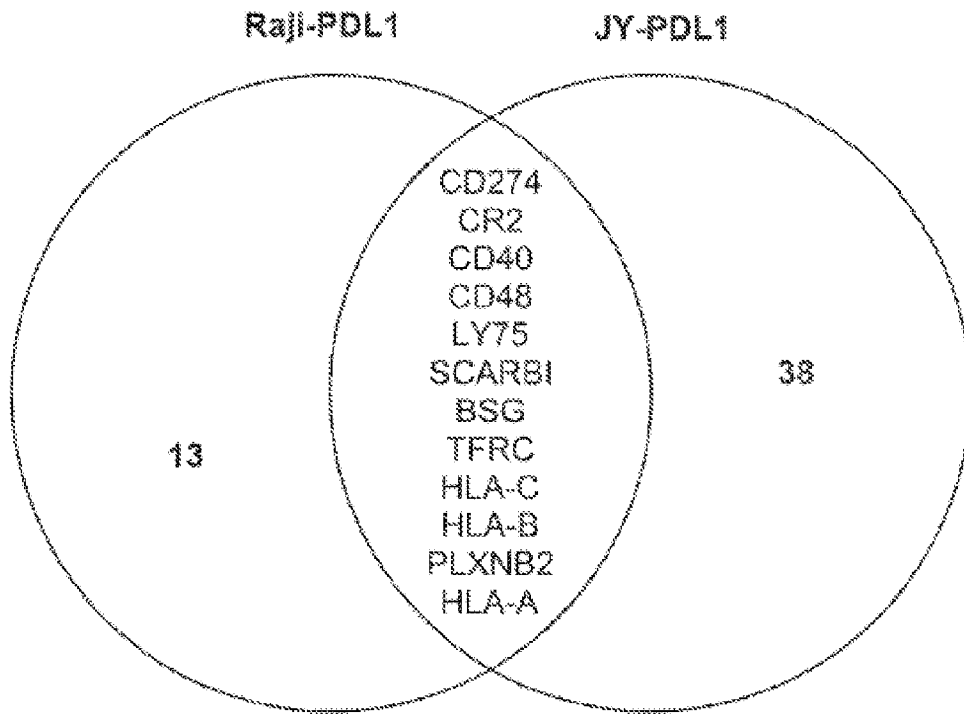


FIG. 14C

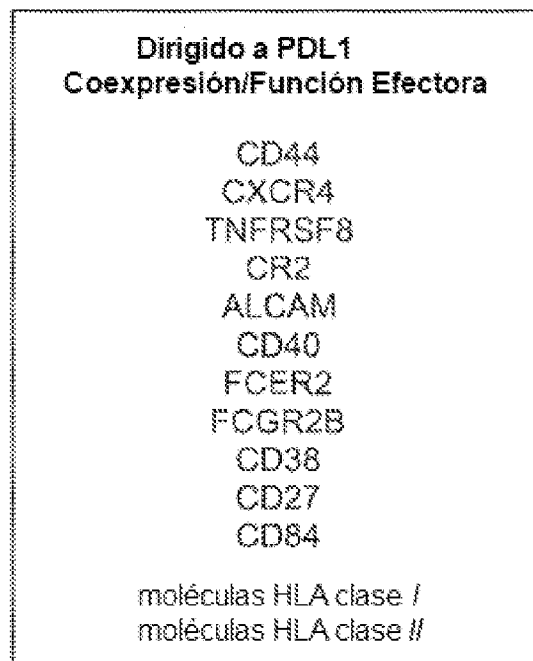


FIG. 14D

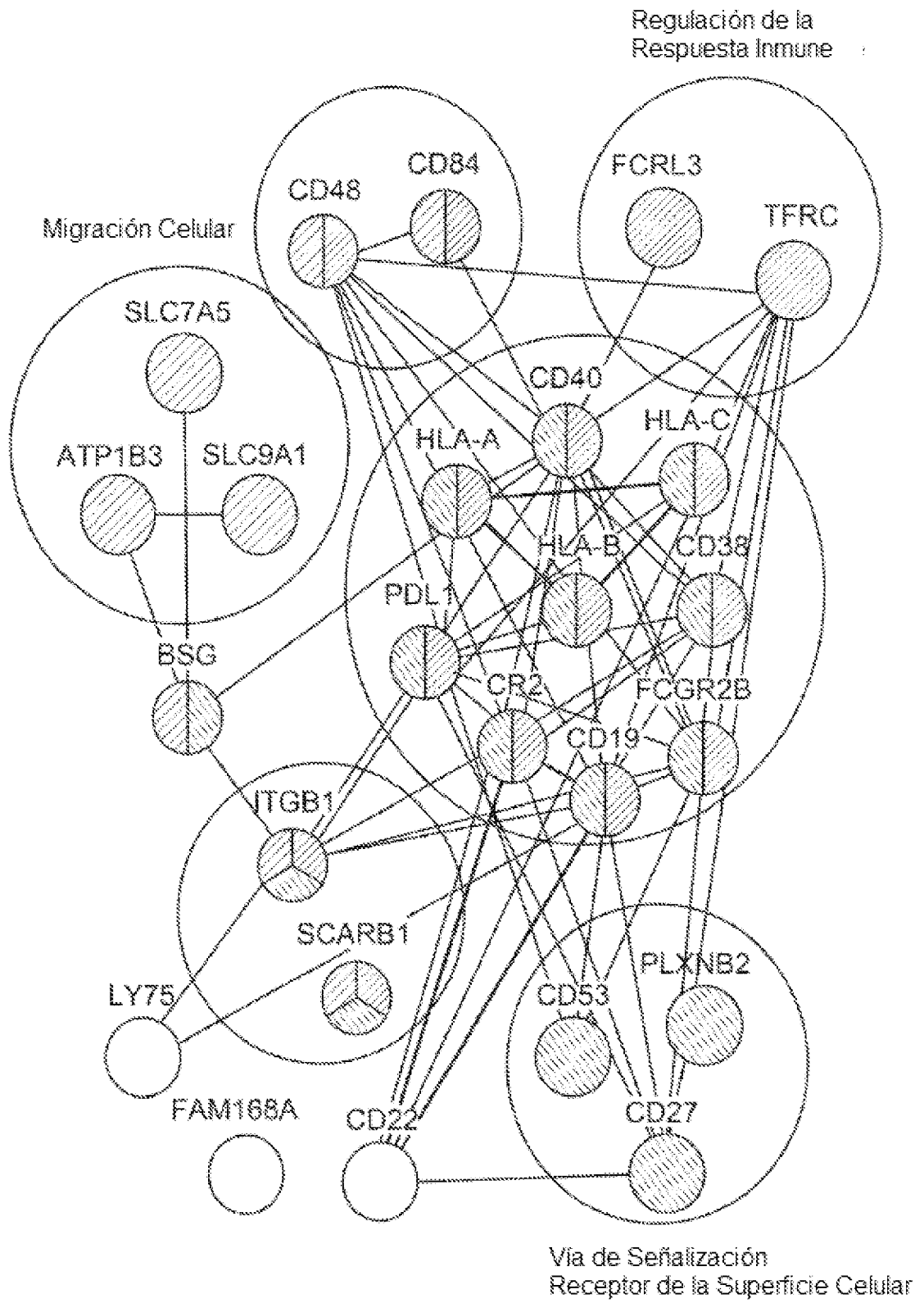


FIG. 14E

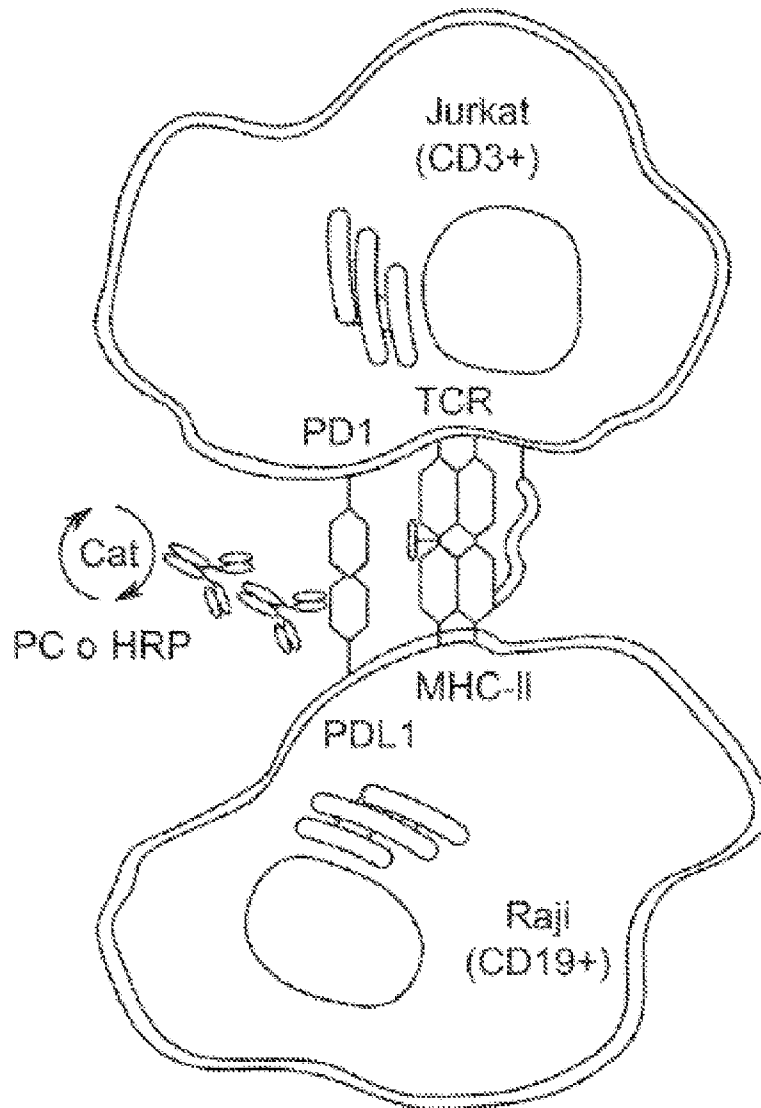


FIG. 15A

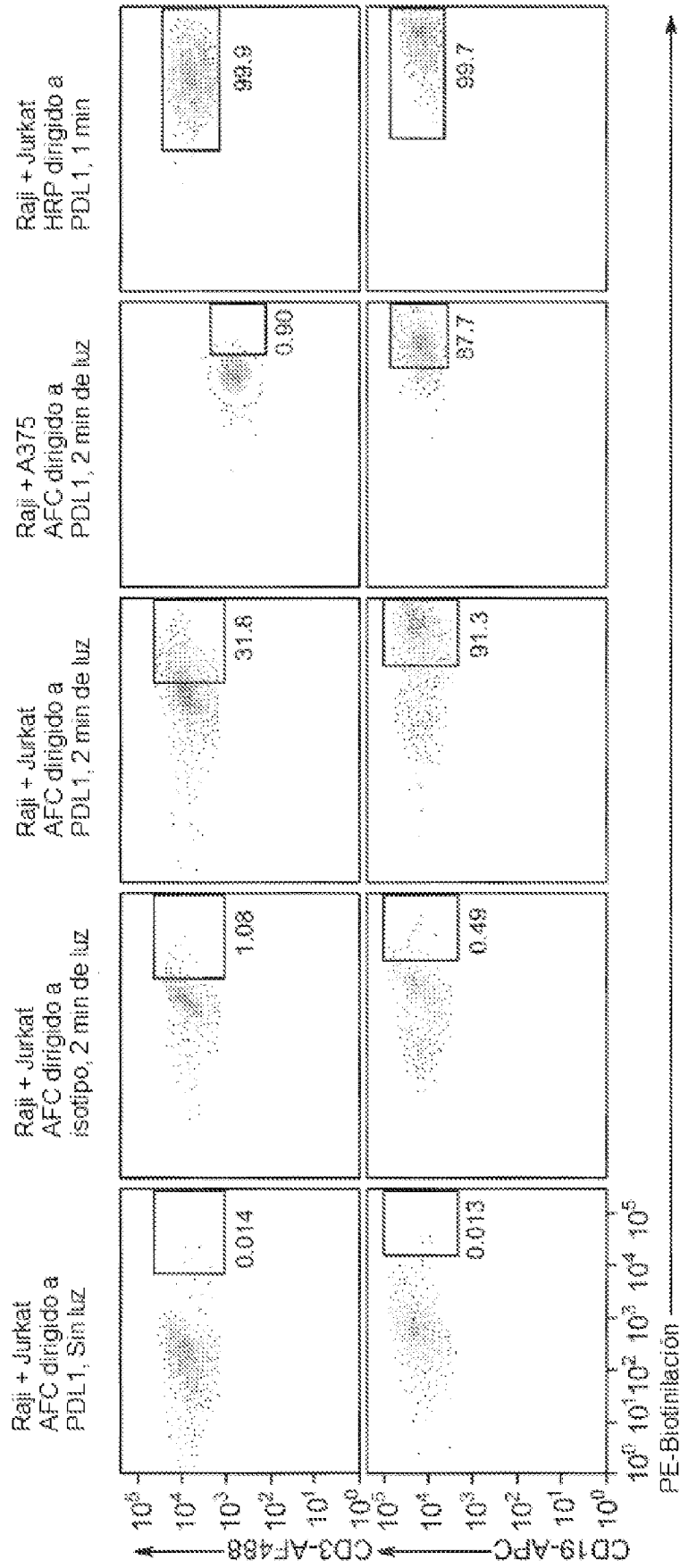


FIG. 15B

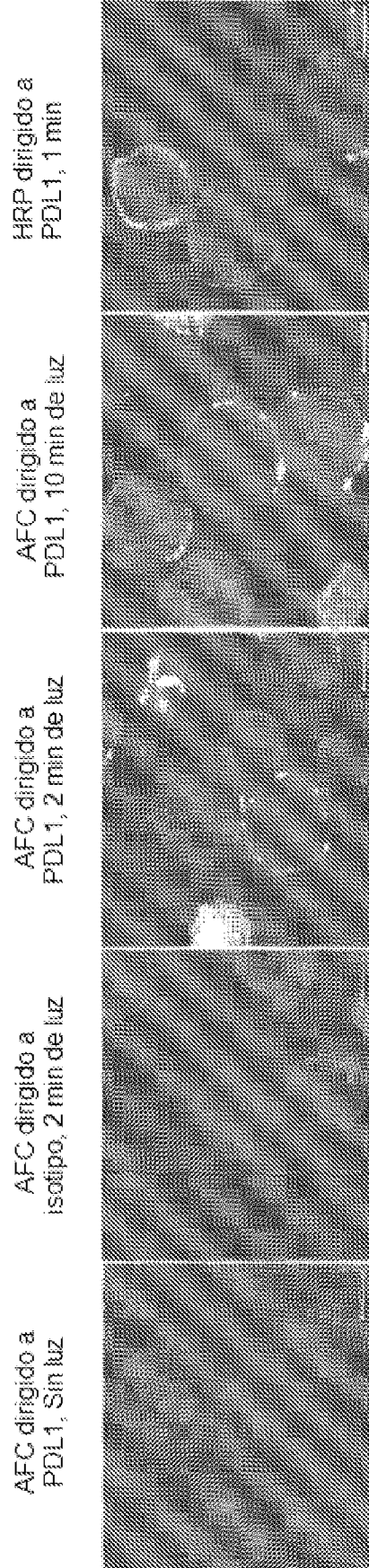


FIG. 15C

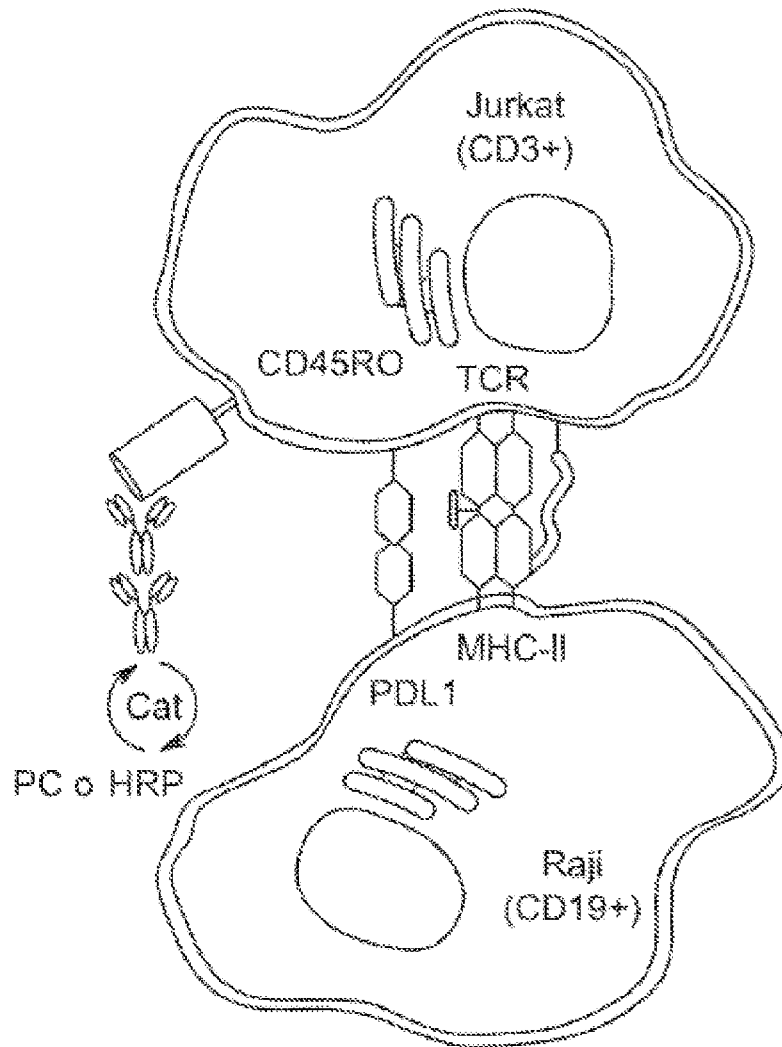


FIG. 15D

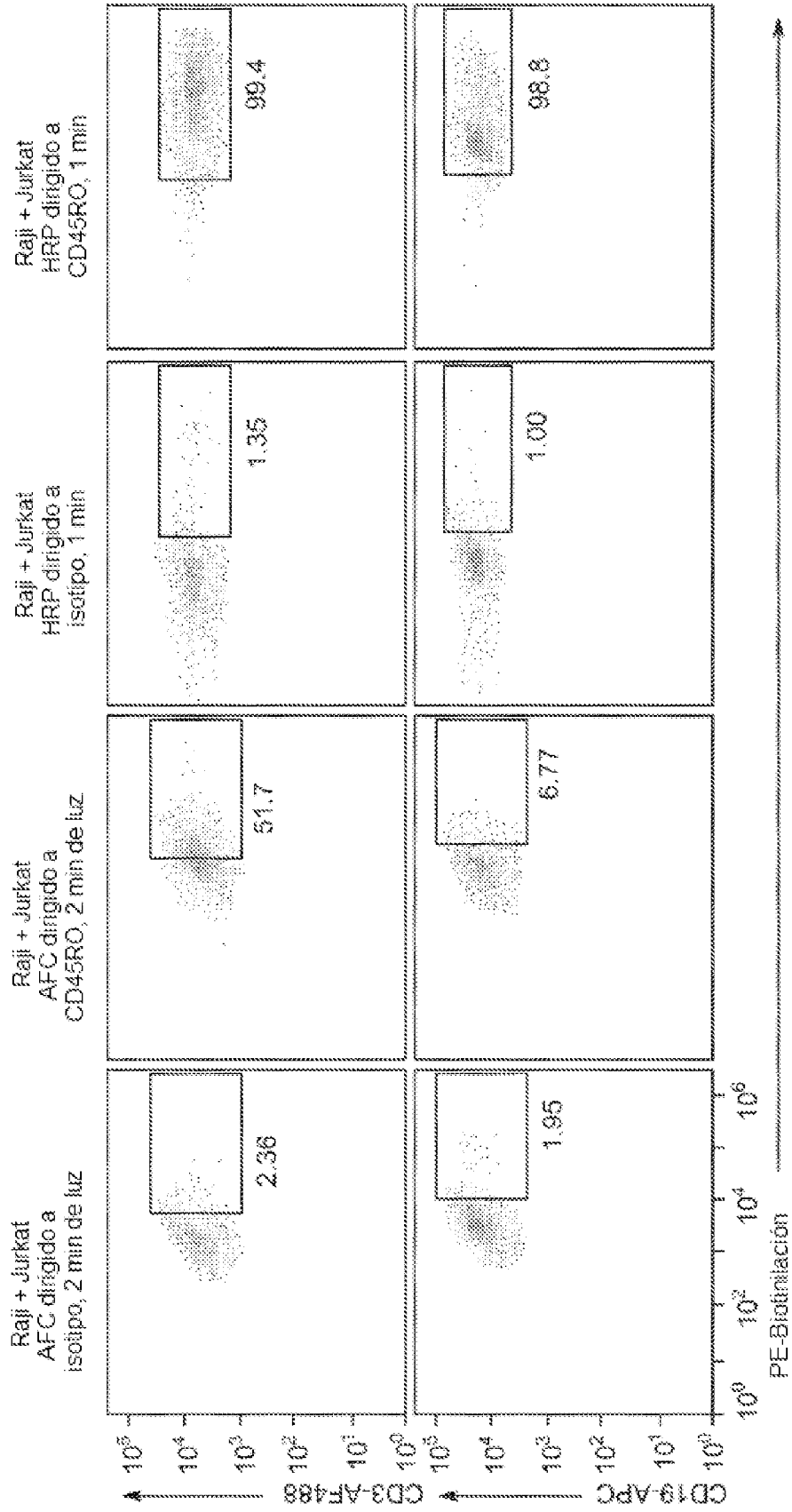


FIG. 15E

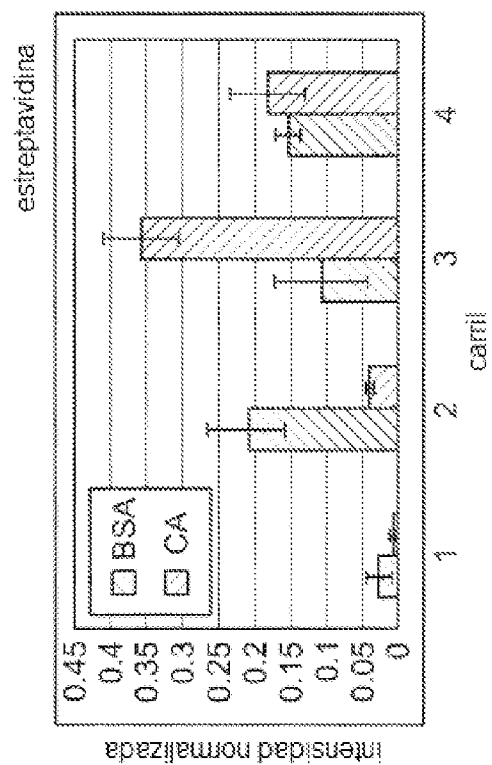
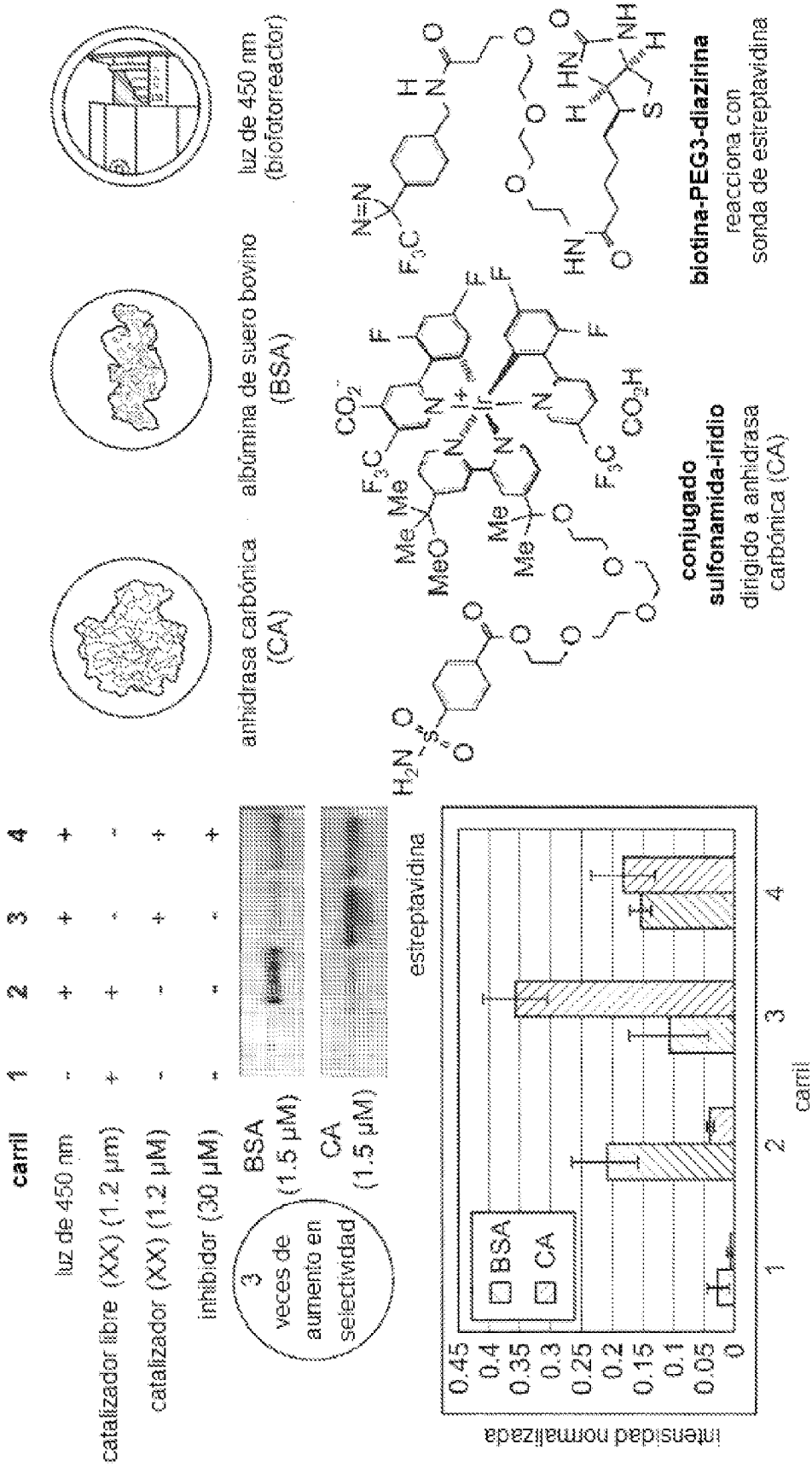


FIG. 16

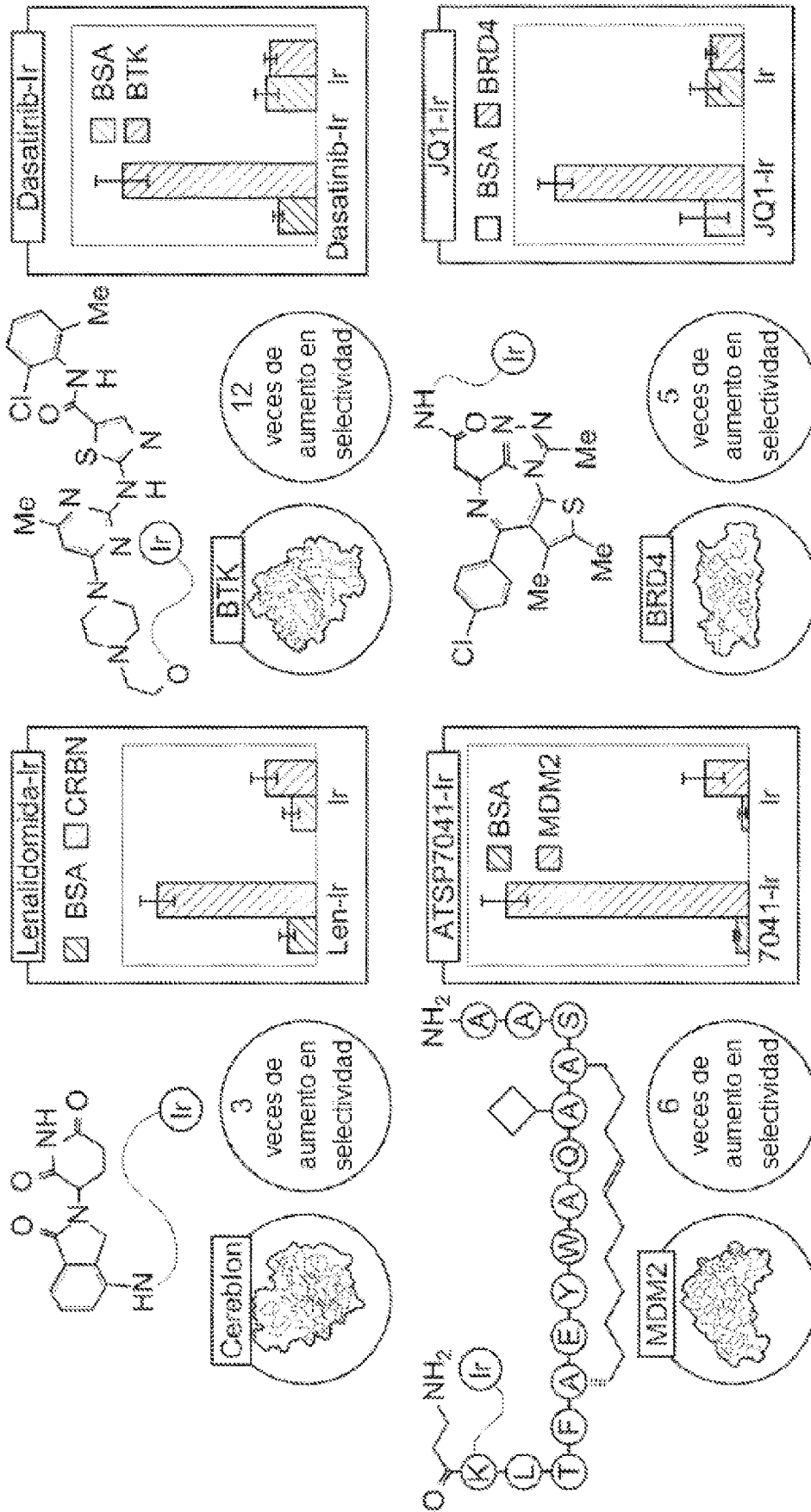


FIG. 17

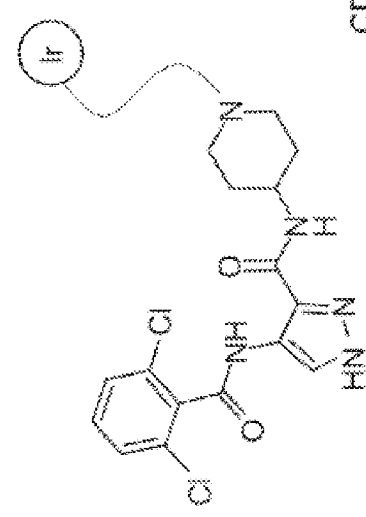
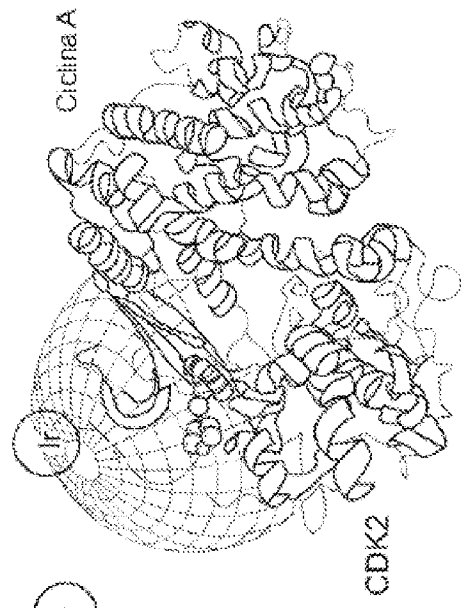
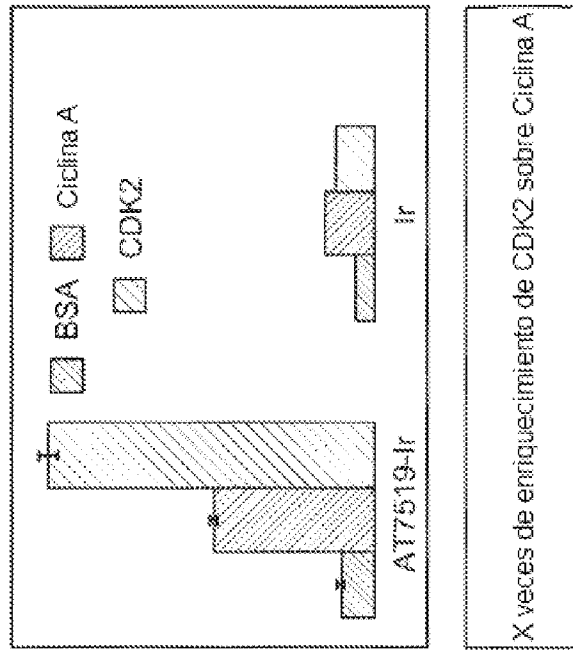


FIG. 18

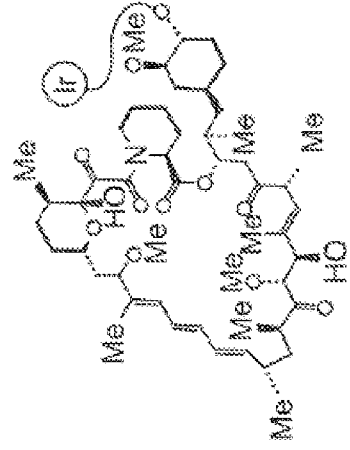
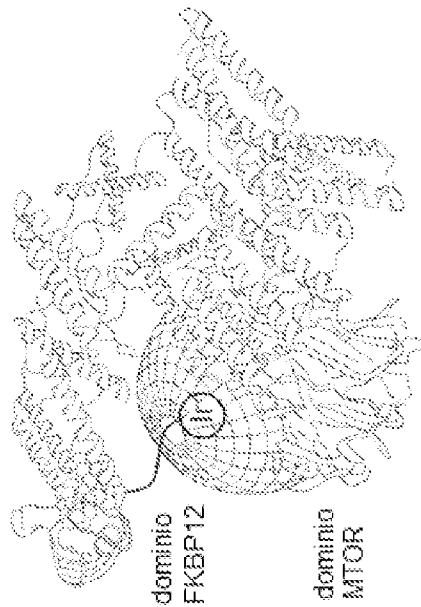
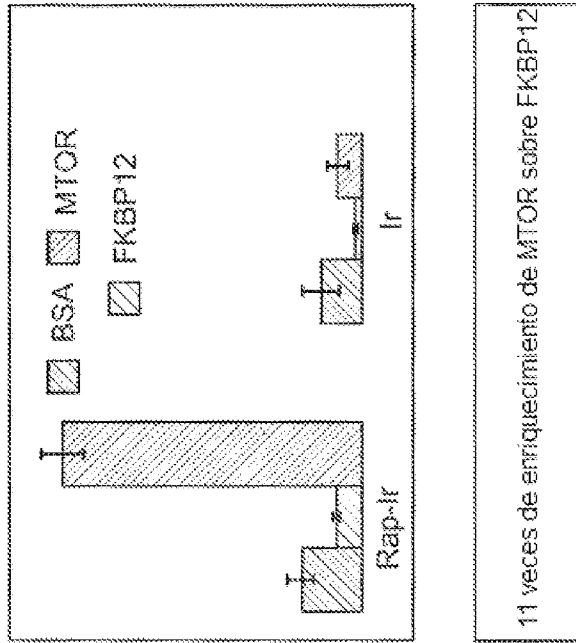


FIG. 19

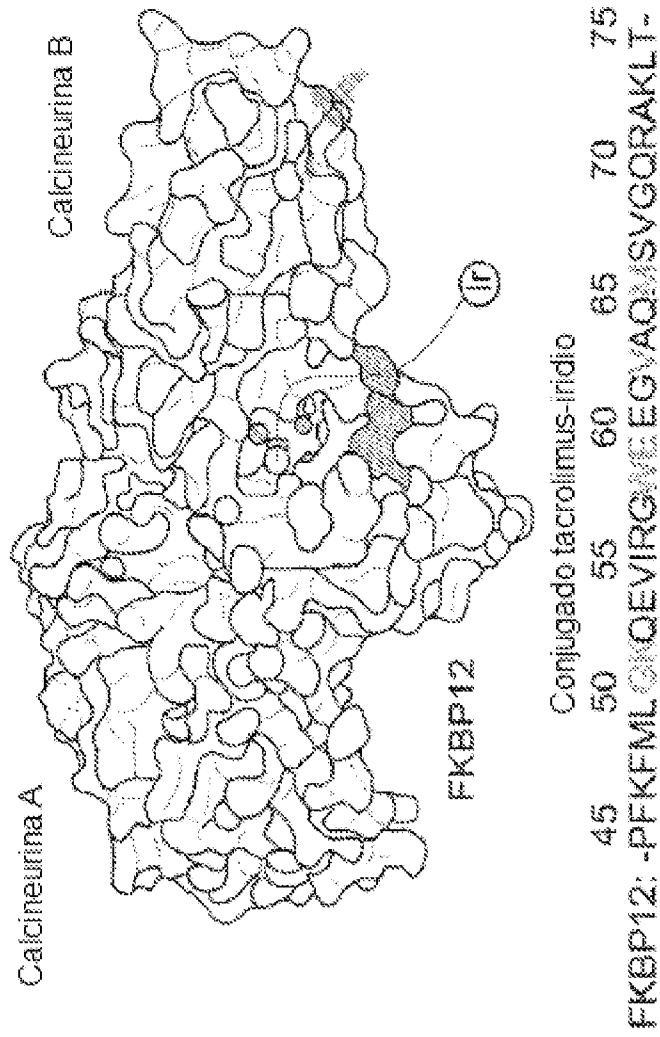
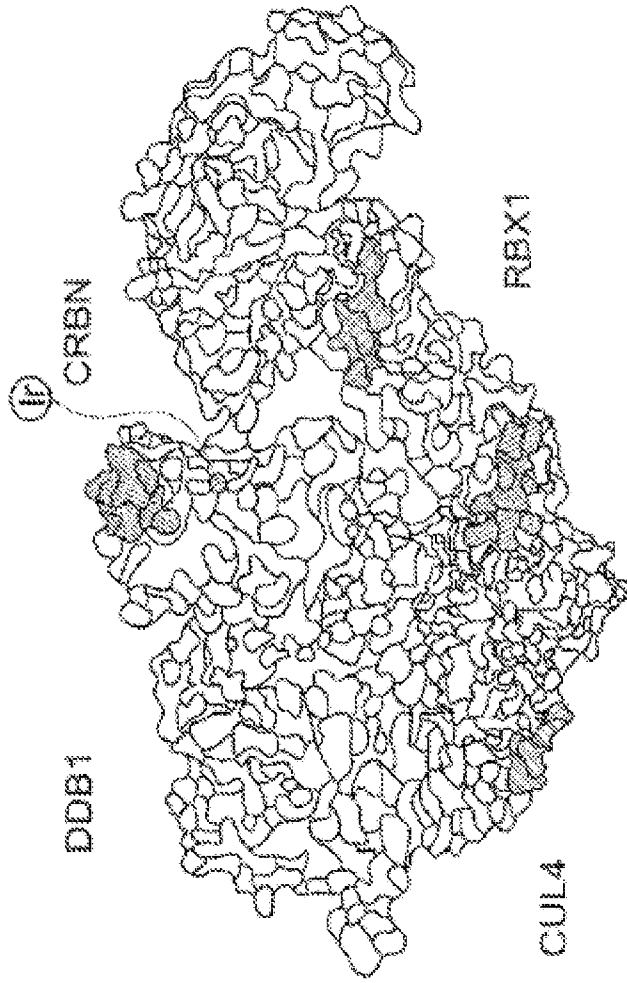


FIG. 20



Conjugado lenalidomida-iridio

140 145 150 155 160 165 385 390 395 400 405  
 CRBN: -AEIYAYR EEEQYQIETVKKVKAIGRQR- CUL4: -RFVNLMKESFETPINKRPNKP-  
 230 235 240 245 250 255 260 265 270  
 CUL4: -SFELKFL EETNGLYAE GQRIMQER EYFPEYLMHYSKR LEEE-  
 45 50 55 60 65 70 75 80 85  
 CUL4: -IKNFRDRPR LFDNYTQDTWRKLUHEAVRVAQSSTIRYNEE-

FIG. 20 (Continuación...)

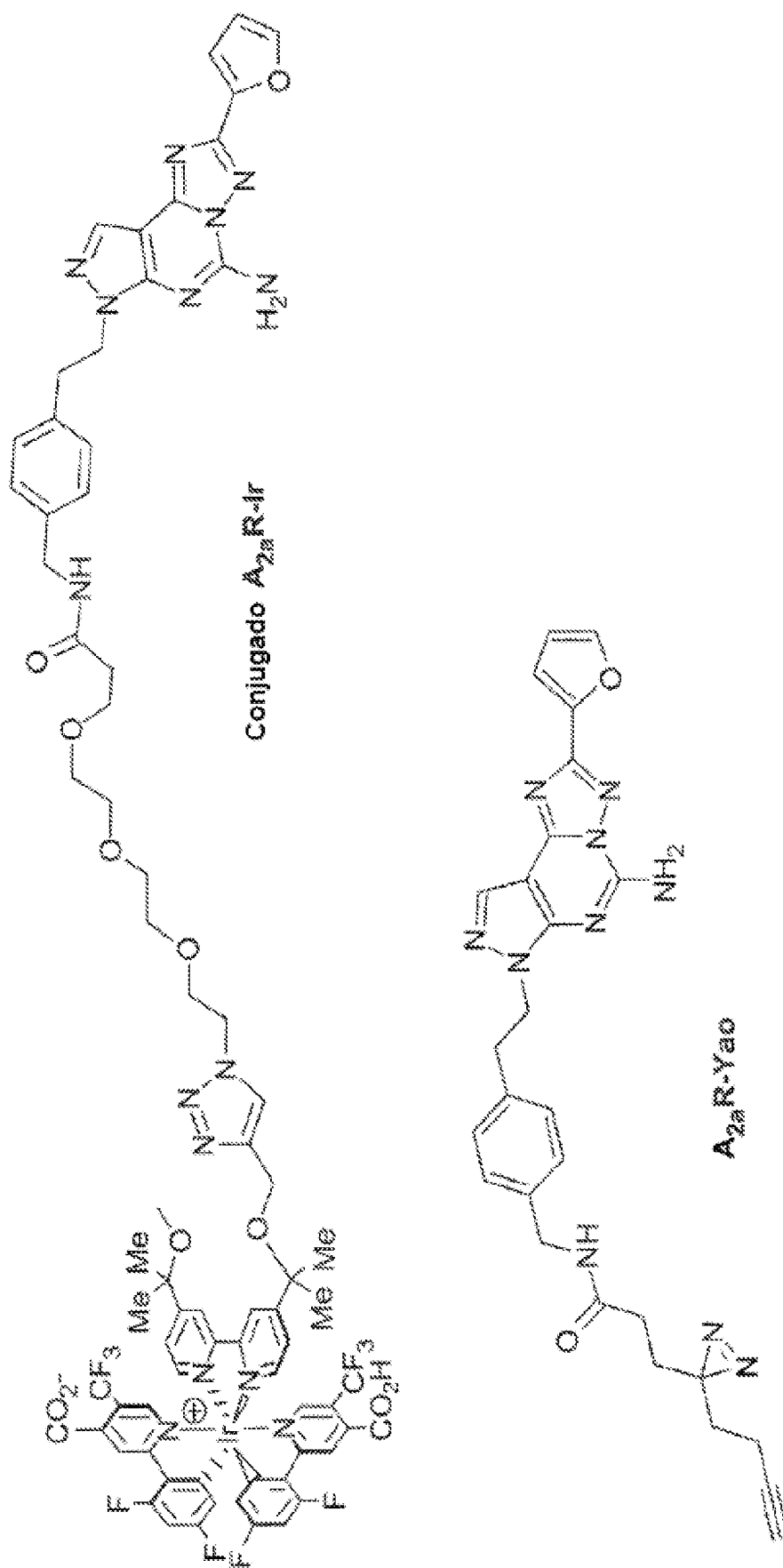


FIG. 21

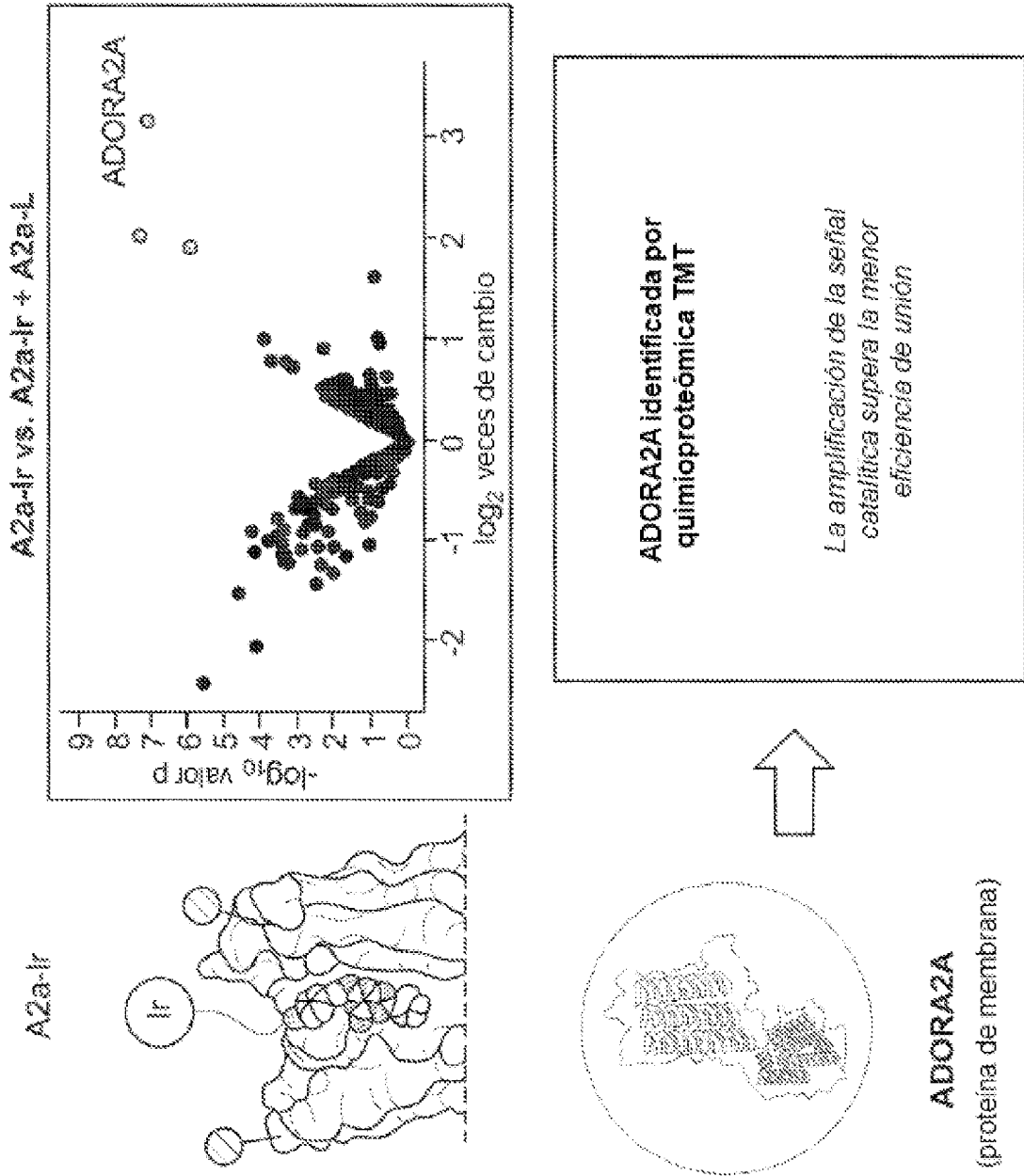


FIG. 22

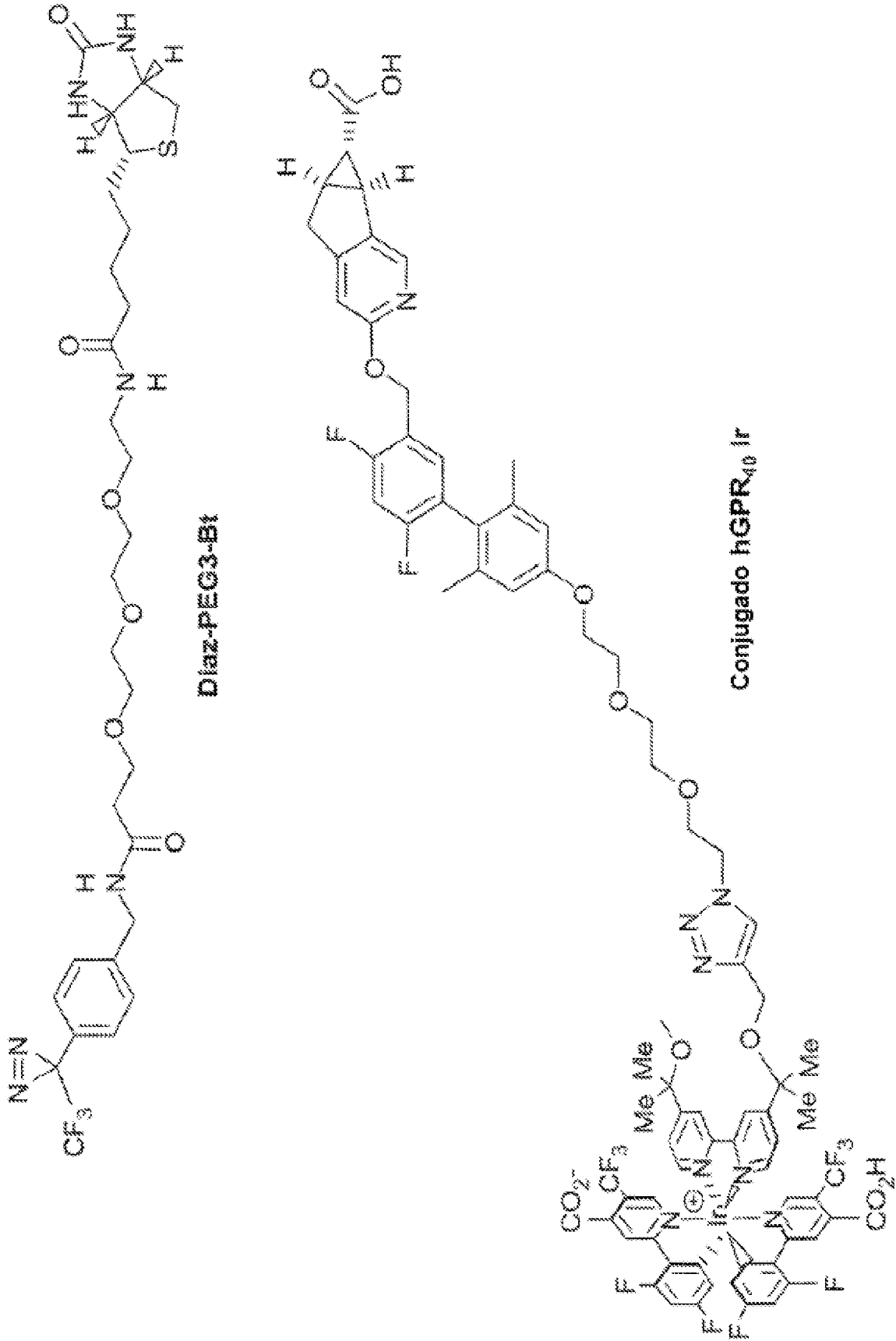


FIG. 23

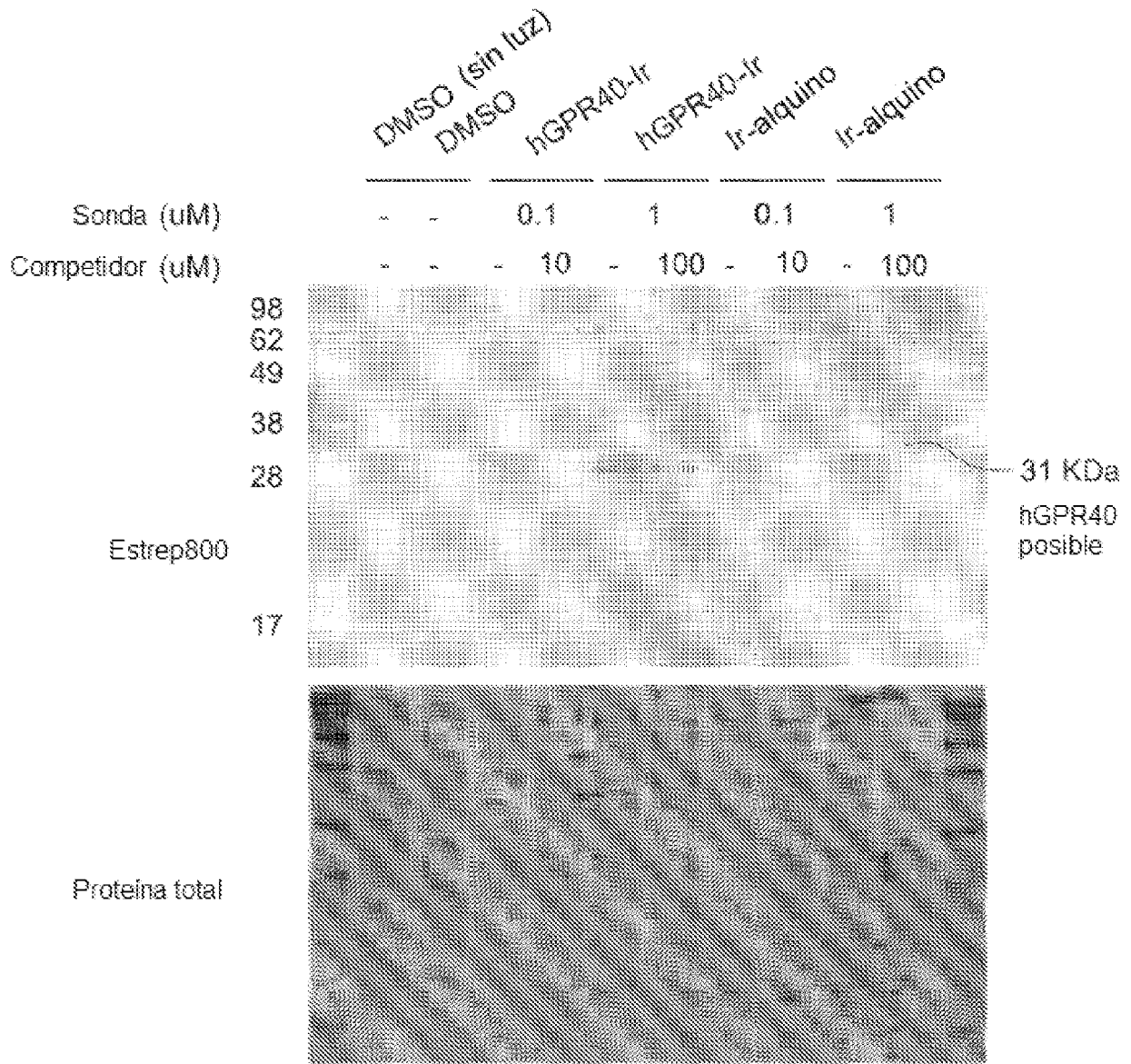


FIG. 24A

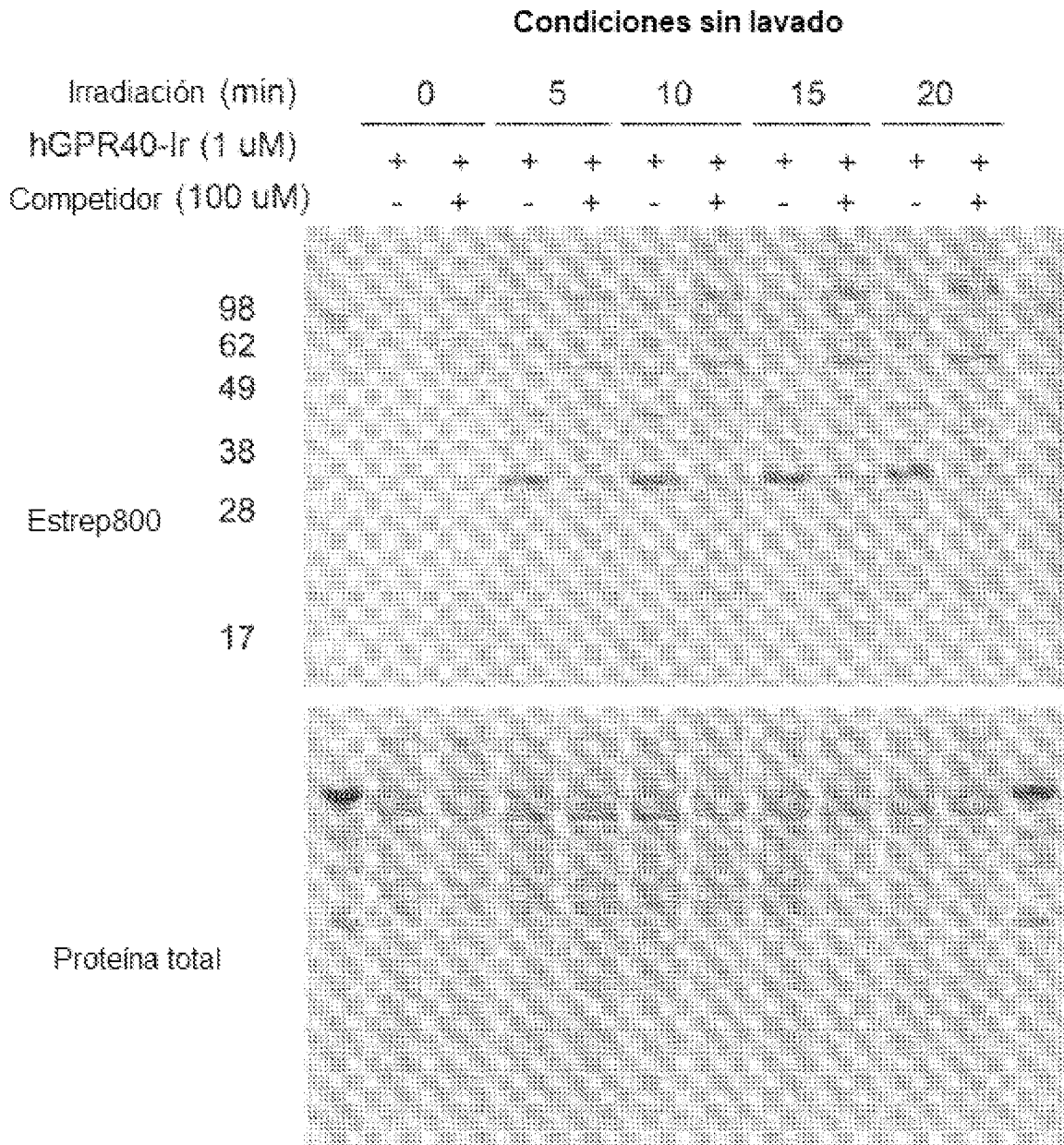


FIG. 24B