



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 330 538**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05744506 .6**

(96) Fecha de presentación : **25.05.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1761783**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

(54) Título: **Identificación de compuestos que modifican una respuesta celular.**

(30) Prioridad: **25.05.2004 DK 2004 00821**
25.05.2004 DK 2004 00822

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.12.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.12.2009

(73) Titular/es: **2cureX A.p.S.**
Birkevej 37
3460 Birkerød, DK

(72) Inventor/es: **Meldal, Morten;**
Nielsen, Thomas, Eiland;
Hagel, Grith;
Kaznelson, Dorte, Wissing;
Diness, Frederik y
Thastrup, Ole

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 330 538 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

Identificación de compuestos que modifican una respuesta celular.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento y a herramientas para extraer información relativa a una influencia, por ejemplo, sobre un receptor superficial, en concreto, una influencia ejercida mediante la puesta en contacto de un receptor con una sustancia unida a un soporte sólido al que está unida una célula que expresa el receptor superficial. En concreto, el procedimiento se refiere a un soporte sólido que permite la síntesis química de sustancias individuales sobre perlas del soporte sólido.

El procedimiento de la invención se puede usar como un procedimiento muy eficaz para analizar o descubrir la influencia de un banco de sustancias sobre un proceso fisiológico, por ejemplo, en relación con el rastreo de nuevos fármacos, el análisis de la toxicidad de sustancias y la identificación de dianas farmacológicas para fármacos conocidos o nuevos. Otros valiosos usos del procedimiento y de la tecnología de la invención se harán evidentes para el experto en la técnica en base a la siguiente revelación.

Antecedentes de la invención

Se ha demostrado la gran utilidad de la síntesis combinatoria de bancos de péptidos, así como de bancos de moléculas pequeñas como un procedimiento para generar números enormes de muy diversos compuestos (véase, por ejemplo, "Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis": 2002 Roland E. Dolle, *J. Comb. Chem.*, 2003, pp 693-753). Para sacarle todo el partido a esta gran capacidad de la química combinatoria de producir números enormes de compuestos, se han desarrollado varias tecnologías que permiten el rastreo directamente sobre el soporte sólido (M. Meldal, 1994, "METHODS: A companion to methods of enzymology" 6:417-424). En el campo del descubrimiento de fármacos, tales procedimientos se han aplicado con éxito para, por ejemplo, la identificación de moduladores enzimáticos. Es posible sintetizar el banco sobre perlas de resina, portando cada perla un compuesto específico, y luego rastrear estos bancos de "un compuesto por perla" frente al componente biológico purificado de interés (p. ej., proteínas o péptidos celulares). Antes de que sigan avanzando los compuestos activos, identificados a través de tal procedimiento, en el procedimiento de descubrimiento de fármacos, es necesario volver a sintetizar el compuesto y analizar su eficacia en un sistema analítico basado en una célula o *in vivo*. Se supone que los nuevos modos de rastrear bancos combinatorios de un modo fisiológico más correcto aceleran enormemente el procedimiento de descubrimiento de fármacos y muestra su importancia en campos como el de la quimiogenómica y la quimioproteómica. El rastreo de bancos combinatorios en células intactas se ha hecho mediante la captura de células de mamífero o de levadura junto con un número limitado de perlas de resina en una "nanogota" (Borchart *et al.*, *Chem Biol* 1997 4:961). Los compuestos inmovilizados sobre la resina son liberados mediante la perturbación de un ligador foto-escindible, y se controlan los efectos asociados con el compuesto sobre las células intactas. En un procedimiento alternativo, los compuestos son liberados mediante acidólisis. Las perlas de resina que portan la zona de los miembros del banco son extendidas en un césped de células de mamífero, y se controla la ubicación espacial de una respuesta celular, siendo las perlas de esa región aisladas y dilucidada la estructura del compuesto restante (Jayawickreme *et al.*, 1998, "Combinatorial peptide Library Protocols", Ed. Shmuel Cabilly, Humana Press, p. 107-128). El documento WO03/038431 describe procedimientos para rastrear bancos combinatorios de perlas mediante la captura de células de fluidos corporales. Se pueden seleccionar perlas que comprenden un compuesto que permite a las células adherirse a dicha perla. El documento US2003/0059764 describe sistemas de análisis de células multiplexados que usan alineamientos posicionales o no posicionales de vehículos codificados.

Wagner *et al.*, 2004, *European Journal of Biochemistry*, 271 (5), 1046-1053 describen actividades carboxipeptidasa de peptidasas de cisteína recombinantes. Hay descritos ejemplos de sustratos de peptidasa, incluyendo, por ejemplo, Abz-RRFK-OH.

Damirov *et al.*, 1983, *Chemical Abstracts*, vol. 98, n.º 13, n.º de sumario: 107766 describen el análisis configuracional de fragmentos de dinorfina, por ejemplo, de CaCO-Arg6-Arg7-Ile8-Arg9-NHC α .

55 **Resumen de la invención**

Es de gran importancia proporcionar nuevos procedimientos eficaces para la identificación de compuestos que influyan en procesos celulares específicos. En concreto, procedimientos en los que sea posible analizar una cantidad muy grande de compuestos candidatos en cuanto a un efecto específico sobre una célula en un período de tiempo relativamente corto.

Es, por tanto, un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos muy eficaces para analizar o descubrir la influencia de los compuestos de un banco sobre un proceso fisiológico en una célula. En concreto, los procedimientos proporcionan medios para analizar números muy grandes de diferentes compuestos en cuanto a uno o más efectos fisiológicos en un período de tiempo bastante corto. Esto se puede obtener uniendo células vivas a perlas de resina unidas a un compuesto de prueba. Los compuestos de prueba pueden así influir en procesos fisiológicos de dichas células. Dicha o dichas influencias pueden ser detectadas, pudiéndose seleccionar las perlas que contienen células que presentan la o las influencias deseadas. Una vez seleccionadas, es posible identificar los compuestos unidos

a las perlas seleccionadas. Estos procedimientos pueden ser muy útiles, por ejemplo, en relación con el rastreo de nuevos fármacos, el análisis de la toxicidad de sustancias y la identificación de dianas farmacológicas para fármacos conocidos o nuevos.

- 5 Por consiguiente, un primer objetivo de la invención consiste en proporcionar procedimientos de identificación de un compuesto que modifica al menos una respuesta celular, estando cada respuesta celular ligada a diferentes sistemas indicadores que generan resultados detectables, procedimientos que comprenden las etapas de:
- 10 (a) proporcionar múltiples perlas de resina capaces de mantener el crecimiento de células, perlas de resina que cada una comprende un miembro del banco de compuestos de prueba y al menos dos perlas comprenden miembros diferentes del banco; y
 - (b) unir las células que comprenden dicho(s) sistema(s) indicador(es) sobre dicho soporte sólido, de manera que
 - 15 - las células son unidas directamente al soporte sólido y/o
 - al menos el 10% de los soportes sólidos comprenden moléculas de adhesión celular, así como dicho miembro del banco, y las células se adhieren a dichas moléculas de adhesión celular; y
 - 20 (c) rastrear dichas perlas de resina en cuanto a las perlas que comprenden células que cumplan al menos un criterio de selección predeterminado, estando dicho criterio de selección ligado directa o indirectamente a un resultado detectable; y
 - 25 (d) seleccionar perlas que comprenden células que cumplen dicho al menos un criterio de selección; y
 - (e) identificar dicho miembro del banco, identificando de ese modo un compuesto que modifica dicha al menos una respuesta celular.

30 Descripción de las figuras

La figura 1A ilustra un procedimiento para identificar una perla de resina que comprende un compuesto que influye en una respuesta celular ligada a un sistema indicador que genera una señal fluorescente. El procedimiento implica cultivar células sobre perlas de resina, fijar las células, calibrar mediante FABS usando un control positivo y un control negativo, e identificar y aislar las respuestas positivas. El procedimiento para identificar una perla de resina que comprende un compuesto que influye en una respuesta celular ligada a un sistema indicador que genera una señal fluorescente detectable usa un lector de placas o un análisis de adquisición de imágenes. El procedimiento implica 1) cultivar células sobre perlas durante 24 h y fijar las células en EtOH, 2) añadir aprox. 20 perlas a cada pocillo e identificar los pocillos con respuesta usando un lector de placas o un análisis de adquisición de imágenes y 3) transferir las perlas de los pocillos con respuesta a una nueva placa de 384 pocillos (1 perla/pocillo) e identificar los pocillos con respuesta usando un lector de placas o una adquisición de imágenes. Si, por ejemplo, se rastrean 500.000 perlas con 20 perlas/pocillo, se deben rastrear aprox. 25.000 pocillos, i.e., aprox. 68 placas. Con una tasa de respuestas del 0,1%, habrá aprox. 500 pocillos con respuesta que comprenderán aprox. 10.000 perlas, lo que asciende al análisis de aprox. 27 placas en la segunda serie. Alternativamente, las perlas positivas se pueden elegir directamente (preferiblemente, sin fijación) después de la primera identificación usando un análisis de adquisición de imágenes. Se puede usar el procedimiento, por ejemplo, para el análisis de la expresión de un constructo de Cre-YFP.

La figura 2A ilustra un rastreo multiplexado que implica FABS y microscopía. El rastreo implica I) la identificación de las respuestas positivas mediante FABS como se muestra en la figura 1, seguida por II) una etapa de microscopía que identifica perlas de resina que comprenden células con una señal fluorescente interna. El rastreo podría ser, por ejemplo, un rastreo en cuanto a la interiorización de Cre-YFP y MC4R-GFP o HA-MC4R, en la que I) las respuestas positivas del indicador Cre-YFP son identificadas y aisladas mediante FABS y II) se eligen las respuestas positivas de la interiorización de MC4R-GFP o HA-MC4R.

La figura 2B ilustra un rastreo multiplexado que implica dos FABS. El rastreo implica I) la identificación de las respuestas positivas mediante FABS como se muestra en la figura 1, seguida por II) un segundo análisis de FABS. El rastreo podría ser, por ejemplo, un rastreo en cuanto a la interiorización de Cre-YFP y HA-MC4R, en el que I) las respuestas positivas del indicador Cre-YFP son identificadas y aisladas mediante FABS en un tubo de 10 ml (véase la figura 1) y II) se aíslan las respuestas positivas de la interiorización de HA-MC4R (= baja fluorescencia).

La figura 3 ilustra un mapa plasmídico de pCRE-d2EGFP.

La figura 4A ilustra la síntesis de Ac-His-(D)phe-Arg-Trp-NH₂.

La figura 4B ilustra la síntesis de Ac-His-(D)phe-Arg-Trp-Gly-PEGA₁₉₀₀.

La figura 4C ilustra la síntesis de Fmoc-Dap(N₃).

La figura 5 ilustra la síntesis del péptido cíclico del ejemplo 3.

La figura 6a ilustra la síntesis de un banco combinatorio (6a) mediante una reacción de Pictet-Spengler de *N*-aciliminio intramolecular.

La figura 6b ilustra la síntesis de un banco combinatorio (6b) mediante una reacción de Pictet-Spengler de *N*-aciliminio intramolecular.

La figura 7 ilustra los espectros y la determinación de la estructura mediante diferencias de masa exactas de perlas individuales.

La figura 8 ilustra la determinación de la estructura mediante diferencias de masa exactas de perlas individuales.

La figura 9 ilustra una ruta de fragmentación.

La figura 10 ilustra ejemplos de un péptido de adhesión que presenta una perla cubierta por células (U2OS).

La figura 11 ilustra la cuantificación de la interiorización de MC4R-GFP sobre perlas.

La figura 12 ilustra la movilización del Ca^{2+} intracelular visualizada usando una sonda Flou4.

La figura 13 ilustra la transcripción de Cre-YFP inducida por aMSH en células HEK293 y U2OS, respectivamente, que expresan MC4.

La figura 14 ilustra la señal obtenida de una sub-fracción de las respuestas positivas identificadas tras el rastreo funcional (Cre-YFP) de un banco.

La figura 15a es una imagen de una perla con células rastreadas según lo descrito en el ejemplo 14a que comprende el compuesto denominado TEN-636-36-36.

La figura 15b ilustra un análisis EM/EM Q-TOF del compuesto denominado TEN-636-33-26.

La figura 16 ilustra un análisis EM/EM del material escindido de una perla individual de un banco preparado según lo descrito en los ejemplos 6a ó 6b. La dilucidación de la estructura se proporciona mediante $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M-Gly-AA1}]^+$ y $[\text{M-Gly-AA1-AA2}]^+$.

Definiciones

Los aminoácidos naturales se nombran en la presente memoria usando bien su código de 1 letra o el de 3 letras según las recomendaciones de la IUPAC, véase, por ejemplo, <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac>. Si no se especifica nada más, los aminoácidos pueden estar en forma D o L. En la descripción (pero no en el listado secuencial), los códigos de 3 letras que empiezan por una letra mayúscula indican los aminoácidos en forma L, mientras que los códigos de 3 letras en letras minúsculas indican aminoácidos en forma D.

El artículo “un, uno, una”, como se usa en la presente memoria, puede significar uno o más, en función del contexto en el que se use.

En el presente contexto, el término “proteína verde fluorescente” o (GFP) pretende indicar una proteína que, cuando es expresada por una célula, emite fluorescencia tras una exposición a la luz en la longitud de onda de excitación correcta (cf. [(Chalfie *et al.* 1994)]). “GFP”, como se usa en la presente memoria, significa cualquier proteína o fragmento de la misma capaz de emitir fluorescencia cuando es excitada con una radiación apropiada. Esto incluye proteínas fluorescentes que son bien naturales o están diseñadas genéticamente, y proteínas que han sido modificadas para que sean fluorescentes. Se han aislado proteínas fluorescentes naturales de la medusa, *Aequorea victoria*, del pensamiento de mar, *Renilla reniformis*, *Phialidium gregarium* y *Discosoma coral* (W.W. Ward *et al.* (1982) *Photochem. Photobiol.* 35:803-808; Levine *et al.* (1982) *Biochem. Physiol.*, 72B:77-85; Fradkov *et al.* (2000), *FEBS Lett.* 479:127-130). También se han diseñado genéticamente GFP para que emitan diferentes colores y una fluorescencia más intensa en organismos mamíferos (patente estadounidense n.º 5.625.048; los documentos WO 97/28261, WO 96/23810, EP0851874; US6.172.188 y WO01/98338). Se ha diseñado genéticamente una variedad de proteínas fluorescentes relacionadas con *Aequorea* para que tengan diferentes espectros de excitación y emisión modificando la secuencia de aminoácidos natural (D.C. Prasher *et al.*, (1992) *Gene* 111:229-233; Heim *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91: 12501-12504; patente estadounidense n.º 5.625.048; documentos WO96/23810 y PCT/US97/14593).

El término “célula viva” se usa para indicar una célula que es considerada viva según los criterios estándar para ese tipo concreto de célula, tales como el mantenimiento de un potencial de membrana normal, la integridad de la membrana celular y el metabolismo energético.

Los términos “procesamiento de imágenes” y “análisis de imágenes” se usan para describir una gran familia de técnicas de análisis de datos digitales o combinación de tales técnicas que reducen los alineamientos ordenados de

números (imágenes) a información cuantitativa que describe aquellos alineamientos ordenados de números. Cuando dichos alineamientos ordenados de números representan valores medidos obtenidos de un procedimiento físico, la información cuantitativa derivada es, por tanto, una medida del procedimiento físico.

El término “sonda fluorescente” se usa para indicar un polipéptido de fusión fluorescente que comprende una GFP o cualquier parte funcional de la misma que está fusionada N- o C-terminalmente con un polipéptido biológicamente activo según lo definido en la presente memoria, opcionalmente, a través de un ligador peptídico que consta de uno o más residuos de aminoácido, no siendo el tamaño del ligador peptídico en sí mismo relevante, siempre y cuando se mantenga la funcionalidad deseada de la sonda fluorescente. Una sonda fluorescente según la invención se expresa en una célula e imita básicamente el comportamiento fisiológico del resto polipeptídico biológicamente activo del polipéptido de fusión.

El término “que determina la fluorescencia” se usa para describir el procedimiento usado para controlar un cambio en las propiedades de fluorescencia.

El término “bioluminiscencia” se usa para describir un procedimiento en el que se produce luz a través de una reacción química que está ocurriendo de manera natural en un sistema biológico. Para que tenga lugar la reacción se necesitan al menos dos compuestos químicos: uno que produce la luz (denominado “luciferina”) y el otro (denominado “luciferasa”) que cataliza la reacción. A veces, la luciferina y la luciferasa están unidas en una sola unidad (denominada “fotoproteína”). Un ejemplo del último grupo es la aequorina.

El término “FRET” se usa para describir la aparición de transferencia de energía por resonancia fluorescente entre un fluoróforo donante y un cromóforo aceptor. Se trata de una interacción dependiente de la distancia entre los estados excitados electrónicos de dos fluoróforos en los que se transfiere la excitación desde un fluoróforo donante a un cromóforo aceptor sin la emisión de un fotón. La eficacia de la FRET depende de la sexta potencia inversa de la separación intermolecular, haciéndola útil en distancias comparables con las dimensiones de macromoléculas biológicas. De este modo, la FRET es una técnica importante para la investigación de interacciones entre moléculas celulares, por ejemplo, la formación de complejos.

El término “BRET” se usa para describir un procedimiento que está relacionado con la FRET, pero que difiere de la FRET en que el donante es una proteína bioluminiscente como la luciferasa que genera su propia emisión de luminiscencia en presencia de un sustrato, y que puede pasar la energía a un fluoróforo aceptor. Para que bien la BRET o la FRET funcionen, el espectro de emisión del donante debe solaparse con el espectro de absorción del aceptor, sus dipolos de transición deben tener una orientación apropiada, y el donante y el aceptor deben estar muy próximos (habitualmente, a 30-80 Å entre sí, en función del grado del solapamiento espectral).

El término “análisis de la proximidad del centelleo” se usa para describir un análisis que determina la distancia entre dos compuestos, en el que un compuesto (unido a una perla) emitirá luz cuando se produzca radiación desde un isótopo que esté muy próximo y el otro compuesto contenga un isótopo radiactivo.

El término “célula de mamífero” pretende indicar cualquier célula de origen mamífero. La célula puede ser una línea celular establecida, muchas de las cuales están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Virginia, EE.UU.) o una célula primaria con una vida limitada derivada de un tejido de mamífero, incluyendo tejidos derivados de un animal transgénico, o una línea celular inmortal recién establecida derivada de un tejido de mamífero, incluyendo tejidos transgénicos, o una célula o una línea celular híbrida derivada mediante la fusión de diferentes tipos de células de origen mamífero, p. ej., líneas celulares de hibridoma. Las células pueden expresar opcionalmente uno o más productos génicos no nativos, p. ej., receptores.

El término “propiedades de fluorescencia” significa propiedades de absorción, tales como longitud de onda y extensión, o propiedades espectrales de la luz emitida, tales como longitud de onda, tiempo de duración de la fluorescencia, intensidad o polarización, o la localización intracelular del fluoróforo. Puede estar por tanto localizada en un componente celular específico (p. ej., orgánulo, membrana, citoesqueleto, estructura molecular) o puede estar distribuida uniformemente por la célula o por partes de la célula.

El término “células fijadas” pretende cubrir células tratadas con un fijador citológico, tal como glutaraldehído, metanol, acetona o formaldehído; tratamientos que sirven para entrecruzar químicamente y/o estabilizar proteínas solubles e insolubles en la estructura de la célula o para deshidratar células. Una vez en este estado, tales proteínas no se pueden soltar de la estructura de la ahora célula muerta.

El término “línea celular” pretende cubrir un grupo de células, en el que las células de ese grupo son esencialmente genéticamente indistinguibles entre sí. Las células de una línea celular son, por tanto, toda la progenie de la misma célula.

El término “que comprende” debería entenderse de un modo inclusivo. Por consiguiente, a modo de ejemplo, una composición que comprende compuesto X puede comprender compuesto X y, opcionalmente, más compuestos.

El término “múltiple” debería entenderse como “al menos dos”.

El término “banco de compuestos de prueba” debería entenderse como una colección de compuestos de prueba que comprende al menos 2 compuestos de prueba diferentes.

El término “moléculas o compuestos orgánicos pequeños” se refiere en la presente memoria a compuestos no oligoméricos que contienen carbono que se producen mediante síntesis química y que generalmente tienen un tamaño de menos de 600 unidades de masa.

El término “banco de un compuesto por perla” se refiere a los bancos inmovilizados sobre perlas de resina, en los que cada perla de resina individual no comprende más que un miembro del banco en una o múltiples copias. En una forma particular de tales bancos, cada miembro está representado por múltiples fragmentos de dicho miembro obtenidos mediante la codificación de la síntesis de la escalera.

El término “banco de dos compuestos por perla” se refiere a los bancos inmovilizados sobre perlas de resina, en los que cada perla de resina individual no comprende más que un miembro del banco en una o múltiples copias y en los que cada perla de resina individual, además de dicho miembro del banco, comprende también un compuesto de adhesión. Todas las perlas pueden comprender compuestos de adhesión idénticos.

Descripción detallada de la invención

20 Banco de compuestos de prueba

En la presente invención, se usan bancos de compuestos para rastrear compuestos que tienen una influencia fisiológica deseada sobre una célula viva. Como se usa en la presente memoria, el término “banco” significa una colección de entidades moleculares o de compuestos de prueba, también denominados en la presente memoria “miembros del banco”, obtenida tras una serie de transformación química.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el banco es un banco combinatorio. En “Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis”: 1998 Roland E. Dolle y Kingsley H. Nelson, Jr. *J. Comb. Chem.*, 1999, pp 235-282; “Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis”: 1999 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2000, pp 383-433; “Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis”: 2000 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2001, pp 477-517; “Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis”: 2001 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2002, pp 369-418 y “Comprehensive Survey of Combinatorial Library Synthesis”: 2002 Roland E. Dolle *J. Comb. Chem.*, 2003, pp 693-753, se ofrecen ejemplos no restrictivos de bancos combinatorios que se pueden usar con la presente invención y procedimientos para producir tales bancos. El experto entenderá que estos protocolos se pueden adaptar fácilmente a la necesidad específica de una determinada realización de la presente invención.

En una realización, estas entidades moleculares pueden ser oligómeros naturales “oligómeros de elementos constitutivos en la naturaleza), tales como péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN) u oligosacáridos. A modo de ejemplo, un oligómero natural puede ser cualquier péptido constituido por aminoácido natural, incluso si dicho péptido comprende una secuencia que no está presente en la naturaleza. Los bancos pueden comprender diferentes oligómeros naturales o los bancos pueden comprender sólo una clase de oligómero natural, por ejemplo, el banco puede ser un banco de péptidos. En otra realización, pueden ser oligómeros no naturales (oligómeros que comprenden uno o más elementos constitutivos que no se dan en la naturaleza), tales como péptidos, glicopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN) u oligosacáridos y similares modificados químicamente. Dicha modificación química puede ser, por ejemplo, el uso de elementos constitutivos no naturales conectados mediante el enlace natural que une las unidades (por ejemplo, un enlace amida peptídico), el uso de elementos constitutivos naturales con unidades de unión modificadas (por ejemplo, oligoureas según lo tratado en Boeijen *et al.*, 2001, *J. Org. Chem.*, 66: 8454-8462; oligosulfonamidas según lo tratado en Monnee *et al.*, 2000, *Tetrahedron Lett.*, 41: 7991-95), o combinaciones de éstos (por ejemplo, amidas de estatina según lo tratado en Dolle *et al.*, 2000, *J. Comb. Chem.*, 2: 716-31). Los oligómeros no naturales preferidos incluyen oligómeros que comprenden elementos constitutivos no naturales conectados entre sí mediante una unión de enlace natural. Dichos oligómeros pueden, por tanto, comprender una mezcla de elementos constitutivos naturales y no naturales conectados entre sí mediante enlaces naturales. A modo de ejemplo, el oligómero puede comprender aminoácidos naturales y elementos constitutivos no naturales unidos por enlaces peptídicos, p. ej., ANP o ANL. De este modo, en una realización de la invención, los oligómeros preferidos comprenden aminoácidos modificados o aminoácidos miméticos). Otros oligómeros no naturales preferidos incluyen, por ejemplo, oligoureas, poli(azatidas), oligómeros unidos mediante C-C aromáticos y oligómeros unidos mediante C-N aromáticos. Otros oligómeros preferidos más comprenden una mezcla de elementos constitutivos naturales y no naturales, y enlaces de unión naturales y no naturales. Por ejemplo, el oligómero no natural puede ser cualquiera de los oligómeros mencionados en las recientes publicaciones, véase: Graven *et al.*, 2001, *J. Comb. Chem.*, 3: 441-52; St. Hilaire *et al.*, 2000, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 39: 1162-79; James, 2001, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1: 540-6; Marcaurelle *et al.*, 2002, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 289-96; Breinbauer *et al.*, 2002, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41: 2879-90. Los bancos de la invención también pueden comprender oligómeros cíclicos, por ejemplo, oligómeros naturales cíclicos, tales como péptidos cíclicos u oligómeros no naturales cíclicos. En ciertas realizaciones de la invención, los bancos de oligómeros cíclicos pueden ser ventajosos debido a la estructura rígida. Esto puede resultar en una selectividad y una afinidad superiores.

En otra realización más, las entidades moleculares pueden comprender moléculas no oligoméricas, tales como peptidomiméticos u otras moléculas orgánicas pequeñas. Los peptidomiméticos son compuestos que imitan la acción de un mensajero peptídico, tales como peptidomiméticos de triazolidina y lactama bicíclicos de L-propil-L-leucilglicinamida (Khalil *et al.*, 1999, *J. Med. Chem.*, 42: 2977-87). En una realización preferida de la invención, el banco comprende o incluso, más preferiblemente, consta de moléculas orgánicas pequeñas. Las moléculas orgánicas pequeñas son compuestos no oligoméricos de menos de aproximadamente 600 unidades de masa que contienen cualquiera de una variedad de posibles grupos funcionales y son el producto de una síntesis química, o son aisladas de la naturaleza, o son aisladas de la naturaleza y luego son modificadas químicamente, e incluyen, por ejemplo, los inhibidores de la cinasa basada en urea de Bayer (Smith *et al.*, 2001, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 2775-78). Los compuestos orgánicos pequeños pueden ser seleccionados, por ejemplo, del grupo constituido por alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ariloxilo, aciloxilo, tiol, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxilo, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcocicarbonilamino, amidas, alquilo, alquilo ramificado, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, siloxilo, ceto, heterociclos, sistemas de anillos fusionados, heterociclos fusionados y mezclas de los mismos, en los que cada uno de los anteriormente mencionados pueden estar sustituidos independientemente en cada posición por uno o más grupos seleccionados del grupo constituido por -H, -OH, -SH, halógeno, carboxilo, carbonilo, alcóxilo, ariloxilo, aciloxilo, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxilo, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcocicarbonilamino, amidas, alquilo, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, sililoxilo, ceto, heterociclos, sistemas de anillos fusionados y heterociclos fusionados. Por ejemplo, en las publicaciones de Thompson *et al.*, 1996, *Chem. Rev.*, 96: 555-600; Al-Obeidi *et al.*, 1998, *Mol. Biotechnol.*, 9: 205-23; Nefzi *et al.*, 2001, *Biopolymers*, 60: 212-9; Dolle, 2002, *J. Comb. Chem.*, 4: 369-418, se encuentran ejemplos no restrictivos de bancos de moléculas orgánicas pequeñas que se pueden usar con la presente invención y procedimientos para producirlos.

Los bancos según la invención pueden comprender al menos 20, tal como, al menos 100, por ejemplo, al menos 1.000, tal como al menos 10.000, por ejemplo, al menos 100.000, tal como al menos 1.000.000 de compuestos de prueba diferentes. Preferiblemente, los bancos comprenden en el intervalo de 20 a 10^7 , más preferiblemente, de 50 a 7.000.000, incluso más preferiblemente, de 100 a 5.000.000, incluso más preferiblemente, de 250 a 2.000.000 de compuestos diferentes. En una realización muy preferida de la presente invención, los bancos comprenden en el intervalo de 1.000 a 20.000, tal como en el intervalo de 20.000 a 200.000 compuestos de prueba diferentes. En realizaciones preferidas de la presente invención, el banco comprende en el intervalo de 10.000 a 1.000.000 de compuestos de prueba diferentes.

Preferiblemente, los bancos para su uso con la presente invención se inmovilizan sobre perlas de resina. Dichas perlas de resina pueden ser cualquiera de las perlas descritas más adelante en la presente memoria. Con los procedimientos según la invención, se pueden usar al menos 2, preferiblemente, al menos 20, más preferiblemente, al menos 100, incluso más preferiblemente, al menos 1.000, todavía más preferiblemente, al menos 10.000, por ejemplo, al menos 100.000, tal como al menos 1.000.000 de perlas de resina que comprenden diferentes miembros del banco, i.e. diferentes compuestos de prueba. Preferiblemente, se usan en el intervalo de 20 a 10^7 , más preferiblemente, de 100 a 7.000.000, incluso más preferiblemente, de 1.000 a 5.000.000, todavía más preferiblemente, de 5.000 a 2.000.000, incluso más preferiblemente, de 10.000 a 1.000.000 de perlas de resina que comprenden diferentes miembros del banco con los procedimientos según la invención.

En una realización muy preferida de la invención, cada perla de resina no comprende más que un miembro del banco en una o más copias, i.e., cada perla de resina sólo comprende una clase de compuesto de prueba; sin embargo, dicho compuesto de prueba puede estar presente sobre la perla de resina en múltiples copias. Tales bancos también se pueden denominar bancos de un compuesto por perla. Preferiblemente, cada perla de resina comprende suficientes copias de dicho miembro del banco para ejercer la influencia deseada en las células unidas a dicha perla de resina y para analizar la estructura química del compuesto. Tales bancos se pueden preparar mediante diferentes procedimientos, por ejemplo, mediante un procedimiento de división/mezcla o mediante la unión individual de un compuesto específico a la perla. Los bancos de un compuesto por perla ofrecen la ventaja de que una vez que haya sido seleccionada una perla de resina según los procedimientos descritos en la presente memoria, el compuesto deseado puede ser fácilmente identificado (véanse los procedimientos útiles de la presente memoria que se presentan más adelante).

En una realización preferida, los bancos pueden ser sintetizados directamente sobre las perlas de resina usando un procedimiento de división/mezcla (véase *infra*) que da lugar a bancos de un compuesto por perla. Estos procedimientos de división/mezcla comprenden en general las etapas de:

1. Proporcionar varias mezclas de perlas de resina.
2. Realizar una o más etapas de síntesis químicas diferentes en cada mezcla de perlas de resina.
3. Dividir dichas mezclas para obtener fracciones.
4. Mezclar las fracciones de diferentes mezclas, obteniendo así nuevas mezclas.
5. Opcionalmente, repetir las etapas 1 y 4.

ES 2 330 538 T3

Alternativamente, las etapas 3 y 4 pueden ser como se explica a continuación:

3. Mezclar todas las muestras de perlas de resina, obteniendo así una mezcla mixta.

4. Dividir la mezcla mixta de perlas de resina en recipientes de reacción, obteniendo así nuevas mezclas.

Los bancos de un compuesto por perla se pueden preparar, por ejemplo, según lo descrito en M. Meldal, "Multiple column synthesis of quenched solid-phase bound fluorogenic substrates for characterization of endoprotease specificity", en "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 6:417-424, 1994 o en M. Meldal, "The One-bead Two-Compound Assay for Solid Phase Screening of Combinatorial Libraries in Biopolymer", *Peptide Science* 66:93-100, 2002; o en "Combinatorial peptide library protocols", Ed. por Shmuel Cabilly, Humana Press, 1998, p. 1-24 y 51 a 82.

En otra realización de la presente invención, el banco puede ser un banco de dos compuestos por perla. Cada perla de resina individual de tal banco sólo comprende un miembro del banco en una o más copias. Además, cada perla de resina individual comprende un segundo compuesto, tal como un compuesto de adhesión celular. El compuesto de adhesión celular podría ser, por ejemplo, cualquiera de los compuestos de adhesión celular mencionados en la presente memoria más adelante. Queda comprendido en la invención que varias perlas de resina de un banco, tal como todas las perlas de resina del banco, comprendan compuesto(s) de adhesión idénticos en una o más copias. Los bancos de dos compuestos por perla se pueden preparar, por ejemplo, mediante un procedimiento que implica las etapas de:

1. Proporcionar perlas de resina que comprenden una pluralidad de grupos reactivos.

2. Hacer reaccionar dichos grupos reactivos con dos restos químicos que comprenden grupos protectores diferentes y, preferiblemente, ortogonales.

3. Desproteger un subconjunto de los grupos reactivos mediante la eliminación de una clase de grupo protector, preferiblemente, la eliminación selectiva de una clase de grupo protector.

4. Unir o sintetizar un banco mediante división/mezcla de los compuestos de prueba con el grupo reactivo desprotegido.

5. Desproteger el resto de grupos reactivos mediante la eliminación de otra clase de grupo protector.

6. Unir el segundo compuesto con los grupos reactivos desprotegidos.

El procedimiento también se puede realizar uniendo primero el segundo compuesto y luego sintetizando el banco. Por consiguiente, las etapas del procedimiento se pueden realizar en el siguiente orden: 1, 2, 3, 6, 5 y 4. Es posible sintetizar primero el banco de los compuestos de prueba y luego unirlos a las perlas de resina o es posible sintetizarlo directamente en la perla de resina. De manera similar, es posible sintetizar primero el segundo compuesto de prueba y luego unirlos a las perlas de resina o es posible sintetizarlo directamente en la perla de resina.

Las perlas de resina preferidas se describen en el apartado de "Perlas de resina" que se presenta más adelante en la presente memoria. El grupo reactivo puede ser cualquier grupo reactivo adecuado, siendo sin embargo preferible que el grupo reactivo sea bien un grupo hidroxilo, un tiol o un grupo de amina primaria. El reactivo puede ser también preferiblemente un grupo azido o de amina secundaria. El grupo protector puede ser cualquier grupo protector adecuado conocido por el experto en la técnica, tal como grupos lábiles a ácidos, lábiles a compuestos alcalinos o grupos protectores fotolábiles, preferiblemente, el grupo protector se selecciona del grupo constituido por Fmoc, Boc, Alloc y N₃. Es preferible que los diferentes grupos protectores puedan ser eliminados mediante un tratamiento diferente, por ejemplo, que si un grupo protector es lábil a ácidos, que el otro no sea un lábil a ácidos, sino que sea en cambio, por ejemplo, lábil a alcalinos o un grupo foto-lábil. En una realización preferida, un grupo protector es Fmoc y el otro grupo protector es Alloc o N₃. La etapa 3 se puede realizar, por ejemplo, mediante un procedimiento de división/mezcla según lo descrito anteriormente en la presente memoria, generando de ese modo un banco de un compuesto por perla. El segundo compuesto es, preferiblemente, un compuesto de adhesión celular.

En una realización, el banco puede ser unido a la perla de resina mediante un ligador, que puede ser un ligador escindible. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la síntesis del ligador directamente sobre las perlas de resina o la unión del ligador con las perlas de resina y la posterior unión o síntesis del banco sobre las perlas de resina. De este modo, antes de unir el banco, el ligador comprende preferiblemente un grupo protector según lo descrito anteriormente en la presente memoria. El ligador escindible puede ser cualquiera de los ligadores escindibles descritos más adelante en la presente memoria. Si las perlas de resina están unidas a un compuesto de adhesión mediante un ligador escindible, es preferible que el ligador escindible que une el banco sea diferente al ligador escindible que une el compuesto de adhesión. Es particularmente preferible que el ligador no sea escindible mediante el mismo mecanismo. De ese modo, el banco puede ser liberado específicamente de las perlas de resina sin que se liberen los compuestos de adhesión.

En otra realización más de la invención, el banco puede ser un banco de compuestos mixto, en el que cada perla de resina individual comprende una pluralidad de miembros del banco.

La selección de un banco apropiado depende de la realización específica de la invención. Por ejemplo, puede que sea útil con la invención un banco totalmente aleatorio diseñado para que contenga compuestos interesantes y enormemente diversos. Una ventaja de este enfoque es que el resultado del rastreo no está predispuesto de ninguna manera específica. Como la invención permite el rastreo de millones de diversos compuestos, por ejemplo, inmovilizados sobre perlas de resina, se puede usar un gran número, por ejemplo, en el intervalo de 3 a 5 millones de moléculas aleatorias, en el banco de ligandos.

Alternativamente, se puede usar un banco dirigido más pequeño (de cientos a miles de compuestos), por ejemplo, que empiece por un compuesto o compuestos conocidos, y que proporcione numerosas variaciones de estos compuestos conocidos para el rastreo dirigido. Por ejemplo, en las realizaciones de la invención en las que los compuestos modulan la actividad de una molécula de la superficie celular específica, se puede usar un compuesto conocido por modular dicha molécula de la superficie celular específica como compuesto inicial para la preparación de un banco dirigido. Alternativamente, se puede preparar un banco dirigido más pequeño de compuestos que imiten un compuesto conocido por modular la actividad de dicha molécula de la superficie celular, por ejemplo, usando un modelo informatizado seguido por síntesis químicas. El banco dirigido más pequeño también puede comprender moléculas aleatorias. Los ejemplos de bancos y de procedimientos para preparar tales bancos, que pueden ser útiles en las realizaciones de la invención en las que la respuesta celular esté mediada a través de un receptor unido a proteína G, se describen en C. Haskell-Luevano, A. Rosenquist, A. Souers, K. C. Khong, J. A. Ellman y R. D. Cone, 1999, *J. Med. Chem.* 42:4380-4387, "Compounds that activate the mouse melanocortin-1 receptor identified by screening a small molecule library based upon the b-tum". *J. Med. Chem.* 42:4380-4387, 1999; A. J. Souers, A. A. Virgilio, A. Rosenquist, W. Fenuik y J. A. Ellman, "Identification of a potent heterocyclic ligand to somatostatin receptor subtype 5 by the synthesis and screening of b-tum mimetic libraries". *J. Am. Chem. Soc.* 121 (9):1817-1825, 1999; J. Bondebjerg, Z. Xiang, R. M. Bauzo, C. Haskell-Luevano y M. Meldal, "A solid phase approach to mouse melanocortin receptor agonists derived from a novel thioether cyclized peptidomimetic scaffold". *J. Am. Chem. Soc.* 124:11046-11055, 2002; B. A. Harrison, G. W. Pasternak y G. L. Verdine, "2,6-dimethyltyrosine analogues of a stereodiversified ligand library: highly potent, selective, non-peptidic m opioid receptor agonists". *J. Med. Chem.* 46:677-680, 2003; G. R. Marshall, "Peptide interactions with G-protein coupled receptors". *Peptide Science* 60:246-277, 2003; P. N. Arasasingham, C. Fotsch, X. Ouyang, M. H. Norman, M. G. Kelly, K. L. Stark, B. Karbon, C. Hale, J. W. Baumgartner, M. Zambrano, J. Cheetham, N. A. Tamayo, "Structure-Activity relationship of (1-aryl-2-piperazinylethyl) piperazines: Antagonists for the AGRP/Melanocortin receptor binding". *J. Med. Chem.* 46:9-11, 2003. Además, en los ejemplos 4, 5 y 6 que se presentan más adelante en la presente memoria, se describen bancos útiles. El experto en la técnica entenderá que se pueden preparar otros bancos adaptando los protocolos descritos en las referencias anteriormente mencionadas. El banco puede contener un alineamiento paralelo de modificaciones aleatorias de uno o más compuestos de prueba. En una realización, el banco puede estar formado como un alineamiento en paralelo de modificaciones aleatorias con respecto a un compuesto o compuestos conocidos. El término "alineamiento paralelo" pretende cubrir la síntesis de un banco sometiendo un compuesto dado a un conjunto conocido de reacciones en un recipiente o pocillo aislado. De este modo, se conoce la naturaleza de un compuesto en un recipiente o pocillo dado. El alineamiento de los compuestos de prueba se prepara preferiblemente directamente sobre las perlas de resina usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. En síntesis, se puede dividir la resina en un número de recipientes o pocillos, habitualmente, menor de 500 y añadir los reactivos. En general, no hay etapa de mezclado y tras las etapas apropiadas de lavado, se llevan a cabo las posteriores reacciones mediante la adición de más reactivos a los pocillos. No hay un aumento exponencial en el número de los compuestos generados y que es igual al número de recipientes usados. Se puede identificar fácilmente el compuesto si se le sigue la pista al reactivo añadido a cada pocillo.

También se puede haber preparado el banco mediante síntesis en paralelo usando un marcador capaz de identificar las etapas de síntesis química a las que se ha sometido la perla de resina individual. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante IRORI o un marcador de radiofrecuencia. Alternativamente, se pueden realizar las etapas de síntesis química en paralelo a la preparación de un marcador polimérico. La identificación del marcador proporcionará, por tanto, el conocimiento del compuesto.

La unión de un marcador con un compuesto puede alterar las propiedades de dicho compuesto. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, los compuestos del banco no están marcados, i.e., los compuestos no están conectados con un marcador detectable, tal como un componente fluorescente, un ácido nucleico o un homólogo de ácido nucleico, tal como ANP, un colorante, una sonda que comprende un resto reactivo o similares. En particular, se prefiere que todos los compuestos no estén conectados con el mismo marcador detectable.

La presente invención también describe los procedimientos de síntesis de bancos de compuestos de prueba, en los que dichos bancos son particularmente útiles para los procedimientos de rastreo de la invención.

La invención describe, por tanto, procedimientos de síntesis de un banco de péptidos cíclicos o péptidos miméticos que comprende las etapas de:

- i) proporcionar una pluralidad de de péptidos o péptidos miméticos (preferiblemente, de péptidos) unidos covalentemente con un resto de azida y un resto de acetileno; y

ES 2 330 538 T3

- ii) someter a una ciclación dicho péptido o péptido mimético a través de una reacción catalizada por Cu (I) entre dicho resto de azida y de acetileno; y
- iii) obtener de ese modo un banco de péptidos cíclicos o péptidos miméticos.

Cada péptido sólo comprende preferiblemente un resto de azida y un resto de acetileno. En el ejemplo 4, se ofrece un ejemplo de un procedimiento para preparar tal banco más adelante en la presente memoria.

La invención también describe procedimientos de síntesis de un banco de ureas heterocíclicas, que comprende las etapas de

- i) proporcionar una pluralidad de aldehídos peptídicos que contienen ureas; y
- ii) someter dichos péptidos que contienen ureas a una reacción de Pictet-Spengler intramolecular; y
- iii) obtener de ese modo un banco de ureas heterocíclicas.

Dichos aldehídos peptídicos que contienen ureas son preferiblemente péptidos unidos covalentemente con al menos un resto de urea y un resto de aldehído. La reacción de Pictet-Spengler intramolecular se puede realizar, por ejemplo, según lo descrito en el documento WO2004/113362, que reivindica la prioridad ante la solicitud de patente danesa PA 2003 00967, ambos incorporados en la presente memoria por referencia.

Un ejemplo de un procedimiento para preparar tales bancos se ofrece en los ejemplos 5 y 5a que se presentan más adelante en la presente memoria.

Los péptidos usados para la preparación de cualquiera de los bancos anteriormente mencionados pueden ser oligómeros de aminoácidos naturales o no naturales, o una mezcla de ambos, preferiblemente, son oligómeros de los 20 aminoácidos presentes de manera natural en proteínas, pudiendo estar dichos aminoácidos bien en forma D o L. Es preferible que cada péptido (o péptido mimético) esté inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como cualquiera de los soportes sólidos mencionados más adelante en la presente memoria. Más preferiblemente, el soporte sólido es de perlas de resina y es preferible que cada perla de resina comprenda sólo un miembro del banco en una o más copias.

Preferiblemente, se proporcionan al menos 2, tal como, al menos 10, por ejemplo, al menos 100, tal como al menos 1.000, por ejemplo, al menos 10.000, péptidos y/o péptidos miméticos diferentes. Cada péptido puede comprender en el intervalo de 2 a 100 aminoácidos, tal como en el intervalo de 2 a 50 aminoácidos, por ejemplo, de 2 a 25 aminoácidos, tal como en el intervalo de 2 a 15 aminoácidos, por ejemplo, de 2 a 10 aminoácidos, tal como en el intervalo de 3 a 8 aminoácidos, por ejemplo, de 4 a 6 aminoácidos.

La invención también se refiere a bancos preparados mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

También se pueden usar con la presente invención bancos de compuestos heterocíclicos obtenidos mediante la ciclación de un aldehído peptídico a través de la reacción intramolecular de Pictet-Spengler. Tales bancos pueden ser, por ejemplo, cualquiera de los bancos descritos en el documento WO2004/113362 que reivindica la prioridad ante la solicitud de patente danesa PA 2003 00967.

Perlas de resina

Los miembros del banco de esta invención están preferiblemente unidos a un soporte sólido. Los soportes sólidos preferidos para su uso con la presente invención son perlas de resina (véase más adelante en la presente memoria).

Sin embargo, el soporte sólido también puede ser una zona o región situada sobre una superficie o un gel emplacado o una membrana. Una zona o una región es un área definida sobre dicha superficie, a la que el miembro del banco está unido covalentemente. Es posible prever, por tanto, una superficie que comprenda una pluralidad de zonas o regiones, en la que cada zona o región esté unida covalentemente sólo con un miembro del banco en una o más copias. Dicha superficie podría ser, por ejemplo, una oblea de silicio, una superficie de vidrio, una superficie de plástico o un gel. La superficie de plástico se puede preparar, por ejemplo, a partir de poliestireno, policarbonato, polipropileno, etileno y/o teflón. Los geles se podrían preparar, por ejemplo, a partir de poli(acrilamida) o PEGA.

Sin embargo, en esta invención, los compuestos del banco están unidos preferiblemente a una perla de resina, lo que les confiere la ventaja de "mini-cubas de reacción" compartimentalizadas para la unión de las células.

En general, se pueden rastrear más compuestos y se pueden realizar varias de las etapas del procedimiento en una perla con suficiente material. Por consiguiente, preferiblemente, el banco está unido a perlas de resina. Cada miembro del banco es un compuesto único y está separado físicamente en el espacio del resto de los compuestos del banco, preferiblemente, mediante la inmovilización del banco sobre perlas de resina, tal que cada perla como máximo comprende un miembro del banco. En función del modo de la síntesis del banco, cada miembro del banco puede contener, además,

fragmentos del miembro del banco. Como la facilidad y la velocidad son características importantes del procedimiento de esta invención, es preferible que la etapa de rastreo tenga lugar en el mismo soporte sólido usado para la síntesis del banco, y también que la identificación de los miembros de la pareja de unión pueda tener lugar en el mismo soporte, tal como sobre una sola perla de resina. De este modo, los soportes sólidos preferidos útiles en el procedimiento de la invención cumplen los criterios de no sólo ser adecuados para la síntesis orgánica, sino además de ser adecuados para los procedimientos de rastreo, tales como el rastreo "sobre la perla", así como adecuados para la unión de las células. Además, es preferible que la perla de resina sea adecuada para una identificación de los miembros del banco "sobre la perla" según lo descrito más adelante en la presente memoria. La perla de resina se puede preparar a partir de cualquier material adecuado, tal como poliestireno, polietileno, poliacrilamida, vidrio de poro controlado o PEG. La perla de resina podría ser, por ejemplo, seleccionada del grupo constituido por Toyopearl, sefarsa, sefadex, CPG, sílice, POPOP, PEGA, SPOCC, Expansin, Tentagel, Argogel, poliestireno, Jandagel, resina de polidimetilacrilamida, resina de poliacrilamida, resinas en soporte Kieselghur y resinas en soporte de poliestireno. Se prefieren los soportes hidrófilos. Los ejemplos de perlas de resina hidrófilas incluyen TentaGel (disponible comercialmente en Rapp polymere, Tübingen, Alemania), ArgoGel (comercialmente disponibles en Argonaut Technologies Inc., San Carlos, CA), PEGA (comercialmente disponibles en VersaMatrix, Copenhagen), POEPOP (Renil *et al.*, 1996, *Tetrahedron Lett.*, 37: 6185-88; disponible en Versamatrix, Copenhagen, Dinamarca) y SPOCC (Rademann *et al.*, 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 5459-66; disponible en Versamatrix, Copenhagen, Dinamarca). Los ejemplos de intentos de rastreo sobre perlas se describen en las siguientes referencias: Chen *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.*, 267: 211-19; Leon *et al.*, 1998, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 2997-3002; St. Hilaire *et al.*, 1999, *J. Comb. Chem.*, 1: 509-23; Smith *et al.*, 1999, *J. Comb. Chem.*, 1: 326-32; Graven *et al.*, 2001, *J. Comb. Chem.* 3: 441-52; Park *et al.*, 2002, *Lett. Peptide Sci.*, 8: 171-78). TentaGel y ArgoGel están constituidas por cadenas de polietilenglicol injertadas en un núcleo de poliestireno. Sin embargo, el uso de estos soportes en el rastreo biológico está limitado por el tamaño y por la desnaturalización de ciertas proteínas, particularmente, de enzimas.

Las perlas de resina preferidas según la presente invención son perlas de resina útiles en la síntesis de un banco, el rastreo y la identificación del ligando/proteína sobre la perla. Por consiguiente, las resinas preferidas según la presente invención son resinas que comprenden polietilenglicol. Más preferiblemente, la resina es un copolímero de PoliEtilenGlicol-Acrilamida (PEGA), una resina de química combinatoria orgánica super-permeable (SPOCC) o de PoliOxiEtilen-PoliOxiPropileno (POEPOP). Otra resina preferida comprende una resina de poliacrilamida entrecruzada.

Las resinas PEGA (copolímero de PoliEtilenGlicol-Acrilamida; Meldal M. 1992, *Tetrahedron Lett.*, 33: 3077-80), POEPOP (PoliOxiEtileno-PoliOxiPropileno; Renil *et al.*, 1996, *Tetrahedron Lett.*, 37: 6185-88) y SPOCC (química combinatoria orgánica super-permeable; Rademann *et al.*, 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 5459-66) son fundamentalmente de polietilenglicol y se hinchan bien en disolventes orgánicos, así como acuosos. Debido a que tienen una unión muy reducida o no inespecífica, las resinas PEGA y SPOCC han sido usadas eficazmente en el rastreo de millares de proteínas, incluyendo enzimas de diferentes clases. Además, estas resinas están disponibles en diferentes tamaños de poro y pueden permitir la entrada de las proteínas de gran tamaño a la vez que conservan su actividad. Por ejemplo, las resinas PEGA6000 permiten la entrada de proteínas de hasta 600 kDa. En los ejemplos que se presentan más adelante, la resina PEGA4000 y PEGA1900 con un corte de peso molecular de 200 y 90 kDa, respectivamente, se usan para el rastreo. En principio, se puede usar en el procedimiento de la invención cualquier soporte hidrófilo que sea útil para la síntesis compartimentalizada, que conserve la actividad de las proteínas y que tenga una unión inespecífica mínima.

Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento que comprende la etapa de proporcionar múltiples perlas de resina capaces de mantener el crecimiento de células. Preferiblemente, todas las perlas de resina proporcionadas son capaces de mantener el crecimiento de células. En una realización preferida, todas las perlas de resina son similares y cada una es capaz de mantener el crecimiento de las células, sólo diferenciándose las perlas de resina entre sí en que comprenden diferentes miembros del banco. En realizaciones de la invención en las que las perlas de resina comprenden una molécula de adhesión celular, es preferible que al menos el 10%, más preferiblemente, al menos el 20%, incluso más preferiblemente, al menos el 30%, todavía más preferiblemente, al menos el 40%, incluso más preferiblemente, al menos el 50%, aún más preferiblemente, al menos el 60%, incluso más preferiblemente, al menos el 70%, aún más preferiblemente, al menos el 90%, todavía más preferiblemente, esencialmente todas, incluso más preferiblemente, todas las perlas de resina comprendan la molécula de adhesión celular, así como un miembro del banco.

Células

Las células para su uso con la presente invención pueden ser cualquier célula útil disponible o preparada para tal efecto. Preferiblemente, las células se seleccionan del grupo constituido por células de mamífero. Por ejemplo, las células pueden ser células humanas. Las células pueden ser células capaces de crecer en suspensión o pueden ser células adherentes. Las células adherentes pueden ser preferiblemente cultivadas directamente sobre las perlas de resina usadas con la invención (véase también más adelante en la presente memoria). Es preferible que las células sean células adherentes. Se prefieren las células con una mejor adherencia frente a las células con una adherencia más baja. Las células que se adhieren bien a las perlas de resina que comprenden un compuesto de adhesión según lo descrito anteriormente en la presente memoria son muy preferidas.

ES 2 330 538 T3

Las células podrían ser, por ejemplo, células primarias o líneas celulares establecidas. Las líneas celulares preferidas incluyen, pero no se limitan a, aquellas mencionadas en la tabla 1

TABLA 1

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología
3T3-L1	Ratón	Fibroblasto embrionario	Fibroblasto
3T3-Swiss albino (CCL-92)	Ratón	Embrión	Fibroblasto
A10	Rata	Aorta torácica	Mioblasto
Att 20	Ratón	Pituitaria	Células redondas pequeñas
BAE	Vaca	Aorta	Endotelial
Balb/c	Ratón	Fibroblasto embrionario	Fibroblasto
BHK:R P.1#4aa PTP1B fl			
BHK-21	Hámster	Riñón	Fibroblasto
BHK467	Hámster	Riñón	
BHK570	Hámster	Riñón	Fibroblasto
BJ	Humana	Prepucio	Fibroblasto
C2C12	Ratón	Músculo	Mioblasto
Caki-1	Humana	Riñón	Epitelial
CAL-54	Humana	Riñón	Epitelial
CHOh1R	Hámster chino	Ovario	Fibroblasto
CHO-K1	Hámster	Ovario	Epitelial
COS 1	Mono	Riñón	Fibroblasto
COS 7	Mono	Riñón	Fibroblasto
G-8	Ratón	Músculo	Mioblasto

ES 2 330 538 T3

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología
GT1-7			
HCT 116	Humana	Colorrectal	Epitelial
HEK293	Humana	Riñón embrionario	Epitelial
Hela	Humana	Adenocarcinoma de cérvix	Epitelial
HEP-G2	Humana	Hígado	Epitelial
HT-1080	Humana	Fibrosarcoma	Epitelial
HT-29	Humana	Colon	Epitelial
HUVEC	Humana	Vena umbilical	Endotelial
Ins-1			
Jurkat done E6-1	Humana	Linfocito T	Linfoblastoide
K-562	Humana	Médula ósea	Linfoblastoide
L-6	Rata	Músculo	Mioblasto
MCF 7	Humana	Glándula mamaria	Epitelial
MDA-MB-231	Humana	Adenocarcinoma	Epitelial
MDA-MB-468	Humana	Glándula mamaria	Epitelial
MDCK	Canina	Riñón	Epitelial
Min 6			
Mv 1 Lu (NBL- 7)	Visón	Pulmón	Epitelial
NIH-3T3	Ratón	Embrión	Fibroblasto
PAE	Cerdo	Aorta	
PC 12	Rata	Glándula suprarrenal	
PC-3	Humana	Próstata	Epitelial
RAT2	Rata	Normal	Fibroblasto
RAW 264.7	Ratón		Monocito
RIN	Rata		Epitelial
SK-ML-28	Humana	Melanoma	
SK-N-AS	Humana	Neuroblastoma	Epitelial
SK-N-DZ	Humana	Neuroblastoma	Epitelial
SK-N-F1	Humana	Cerebro	Epitelial
SK-NM-C	Humana	Neuroepitelioma	Epitelial

Línea celular	Especie	Tejido	Morfología
SK-N-SH	Humana	Neuroblastoma caucasiano	Epitelial
SW480	Humana	Colorrectal	Epitelial
U-2 OS	Humana	Hueso, osteosarcoma	Epitelial
U-87 MG	Humana	Cerebro	Epitelial
U937	Humana	Linfoma	Monocito
VERO	Mono	Riñón	Tipo fibroblasto
WI-38	Humana	Pulmón	Fibroblasto
WM-266-4	Humana	Piel	Epitelial
WEHI	Humana		

En una realización de la invención, las células han sido modificadas genéticamente o de otro modo para aumentar sus posibilidades de uso con la presente invención. La modificación puede ser estable o sólo transitoria, o una mezcla de ambas. Por ejemplo, las células pueden haber sido modificadas para que contengan uno o más sistemas indicadores descritos más adelante en la presente memoria. En función de la naturaleza del sistema indicador, esto se puede hacer mediante un número de procedimientos diferentes. Por ejemplo, si el sistema indicador comprende un ácido nucleico, dicho ácido nucleico puede ser insertado en dicha célula mediante técnicas recombinantes convencionales (véase más adelante).

En otro ejemplo preferido, la célula comprende un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la superficie celular ligada operativamente con una segunda secuencia de nucleótidos que no está asociada de manera natural con ella, dirigiendo la expresión de dicha primera secuencia. La molécula de la superficie celular puede ser cualquiera de las moléculas de la superficie celular descritas más adelante en la presente memoria. Tales células son particularmente útiles en la identificación de compuestos que modulan la actividad de dicha molécula de la superficie celular. Dicho ácido nucleico puede ser introducido transitoria o establemente en dichas células.

Las segundas secuencias útiles incluyen, por ejemplo, promotores activos en las células concretas, por ejemplo, promotores de mamífero, promotores víricos o promotores sintéticos. Hay un gran número de promotores eucariotas útiles que son conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, en "Mechanism of Transcription" (1998) Simposio sobre Biología Cuantitativa de Cold Spring Harbor, Vol. LXIII; Cold Spring Harbor Laboratory Press, se describen promotores útiles. Tales promotores pueden ser activos constitutivamente o pueden ser activos sólo temporalmente. En un ejemplo, el promotor puede estar regulado por una señal externa, por ejemplo, el promotor puede ser inducible o inhibible.

El ácido nucleico puede ser insertado en las células mediante cualquier procedimiento útil, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes convencionales, tales como cualquiera de las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EE.UU.

En otra realización, las células son células primarias. Las células primarias son células con una vida limitada que son derivadas preferiblemente de un tejido de mamífero. Las células primarias preferidas son células que son adherentes. El tejido de mamífero puede ser, por ejemplo, un tejido humano, tal como tejido sano o enfermo. En una realización, el tejido es o comprende un tejido neoplástico, por ejemplo, tejido extraído de un paciente con cáncer mediante cirugía, por ejemplo, de un paciente que padece un melanoma, cáncer de mama o cáncer de colon. El tejido también puede ser células hipertróficas, tales como miocitos cardíacos. Preferiblemente, dicho paciente de cáncer no ha sido sometido a radioterapia antes de la cirugía. En realizaciones de la invención en las que las células son células primarias, es preferible que el sistema indicador sea endógeno a dichas células primarias.

Unión de las células a perlas de resina y cultivo de las células

La presente invención se refiere a procedimientos que comprenden la etapa de unir células que comprenden uno o varios sistemas indicadores con perlas de resina. Las células pueden ser unidas a dichas perlas de resina, por ejemplo, directamente o mediante la unión de un segundo compuesto que confiere adhesión a la perla de resina.

Las perlas de resina útiles para la presente invención deberían ser capaces preferiblemente de mantener el crecimiento de las células. Las perlas de resina pueden ser capaces *per se* de mantener el crecimiento celular, sin embargo, frecuentemente, las perlas de resina comprenderán un compuesto de adhesión celular que permitirá que las perlas de resina mantengan el crecimiento de las células. Dicho compuesto de adhesión celular puede ser unido a dichas perlas de resina mediante cualquier procedimiento útil conocido por el experto en la técnica en función de la naturaleza del compuesto de adhesión celular.

Con la presente invención, se puede usar cualquier compuesto de adhesión celular conocido por la persona experta en la técnica. Frecuentemente, es una ventaja si el compuesto de adhesión celular comprende al menos un resto cargado positivamente a un pH neutro, más preferiblemente, si el compuesto de adhesión celular tiene una carga neta global positiva a un pH neutro.

En una realización preferida de la invención, el compuesto de adhesión celular comprende un péptido o un polipéptido, más preferiblemente, el compuesto de adhesión celular consta de un péptido. Tales péptidos también se denominan en la presente memoria "péptidos de adhesión".

Dicho péptido consta preferiblemente de en el intervalo de 4 a 100, preferiblemente, en el intervalo de 4 a 75, más preferiblemente, en el intervalo de 4 a 50, incluso más preferiblemente, en el intervalo de 4 a 30, todavía más preferiblemente, en el intervalo de 4 a 25, incluso más preferiblemente, en el intervalo de 4 a 20, aún más preferiblemente, en el intervalo de 4 a 15, tal como en el intervalo de 4 a 10, por ejemplo, en el intervalo de 4 a 8, por ejemplo, en el intervalo de 6 a 7 aminoácidos. En general, es suficiente si el péptido comprende al menos 4 aminoácidos.

Es preferible que el péptido comprenda al menos un aminoácido seleccionado del grupo constituido por arginina y lisina, más preferiblemente, el péptido comprende al menos 2 aminoácidos básicos, tal como 3 aminoácidos básicos seleccionado del grupo constituido por Arg y Lys, incluso más preferiblemente, el péptido tiene una carga neta global positiva. En una realización preferida, el péptido comprende la siguiente secuencia de 4 aminoácidos: básico-básico-lipófilo-básico. Los aminoácidos básicos se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo constituido por arginina y lisina, mientras que el aminoácido lipófilo se puede seleccionar del grupo constituido por Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met bien en forma D o L. Preferiblemente, el péptido comprende al menos 1, preferiblemente, al menos 2, más preferiblemente, al menos 3, incluso más preferiblemente, al menos 4 aminoácidos en la forma D, siendo incluso más preferible que todos los aminoácidos estén en la forma D. Preferiblemente, los D-aminoácidos se usan para aumentar la estabilidad metabólica, pero también se pueden usar L-aminoácidos.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 330 538 T3

Los ejemplos preferidos de péptidos útiles como compuestos de adhesión celular se ofrecen en la tabla 2 que se presenta a continuación:

TABLA 2

	N.º	1	2	3	4	5	6	7	SEC ID N.º
10	1	ala	arg	ile	arg	ile	gln	his	SEC ID:1
	2	ala	lys	cys	arg	trp	cys	met	SEC ID:2
15	3	ala	lys	ala	arg	cys	lys	ser	SEC ID:3
	4	ala	lys	tyr	trp	ser	tyr	lys	SEC ID:4
	5	ala	his	leu	tyr	arg	asn	lys	SEC ID:5
20	6	ala	arg	arg	cys	phe	arg	asp	SEC ID:6
	7	ala	ala	arg	his	cys	tyr	tyr	SEC ID:7
	8	ala	tyr	tyr	cys	gln	gln	arg	SEC ID:8
25	9	ala	asp	leu	lys	arg	pro	met	SEC ID:9
	10	ala	gly	gly	lys	arg	lys	phe	SEC ID:10
30	11	ala	pro	arg	lys	arg	cys	gly	SEC ID:11
	12	ala	thr	arg	arg	val	ala	arg	SEC ID:12
	13	ala	gly	lys	lys	asn	lys	asn	SEC ID:13
35	14	ala	ala	lys	arg	trp	lys	phe	SEC ID:14
	15	ala	arg	trp	pro	tyr	arg	gly	SEC ID:15
	16	ala	leu	tyr	trp	thr	trp	arg	SEC ID:16
40	17	ala	ala	tyr	arg	trp	tyr	arg	SEC ID:17
	18	ala	arg	cys	ile	arg	gly	asp	SEC ID:18
	19	ala	thr	lys	cys	lys	gly	arg	SEC ID:19
45	20	ala	val	tyr	met	arg	asn	ile	SEC ID:20
	21	ala	arg	lys	arg	ile	arg	gln	SEC ID:21
	22	ala	lys	ile	arg	glu	ys	arg	SEC ID:22
50	23	ala	arg	arg	phe	lys	met	tyr	SEQ ID:23
	24		arg	arg	phe	lys			SEC ID:24
55	25		arg	arg	ile	arg			SEC ID:25
	26	leu	arg	his	arg	leu	lys		SEC ID:26
	27	lys	phe	gly	gln	lys			SEC ID:27
60	28	lys	val	tyr	met	his	lys		SEC ID:28
	29	ile	arg	tyr	arg	leu	arg		SEC ID:29

ES 2 330 538 T3

TABLA 2 (continuación)

	N.º	1	2	3	4	5	6	7		SEC ID N.º
5	30	ala	gln	arg	pro	arg	trp			SEC ID:30
		trp	tyr	ala	lys	arg	arg			SEC ID:31
10		lys	arg	ile	arg	gln	arg	leu	arg	SEC ID:32
		lys	arg	ile	arg	gln	arg	lys		SEC ID: 33
			arg	ile	arg	gln	arg			SEC ID: 34
15			arg	gln	arg	ile	arg			SEC ID: 35
		lys	phe	gly	gln	lys	cys			SEC ID:36
		arg	arg	leu	leu	pro	ile			SEC ID:37
20		pro	phe	arg	lys	lys	cys			SEC ID:38
		tyr	arg	trp	arg	ile	ala			SEC ID:39
		arg	ser	lys	arg	ile	asn			SEC ID:40
25		arg	ser	ala	lys	arg	cys			SEC ID:41
		lys	lys	gln	phe	trp	phe			SEC ID:42
30		arg	met	lys	leu	his	lys			SEC ID:43
		arg	his	trp	gly	arg	ile			SEC ID:44
		thr	lys	arg	leu	lys	thr			SEC ID:45
35		thr	lys	gly	lys	ala	lys			SEC ID:46
		ala	lys	thr	arg	his	arg			SEC ID:47
		asn	arg	pro	arg	val	arg			SEC ID:48
40		val	pro	arg	lys	val	gln			SEC ID:49
		lys	met	arg	tyr	cys	gln			SEC ID:50
		ile	arg	lys	his	leu	ile			SEC ID:51
45		pro	arg	arg	val	val	ile			SEC ID:52
		lys	arg	glu	ser	lys	arg			SEC ID:53
		ser	arg	lys	asp	arg	lys			SEC ID:54
50		arg	cys	lys	lys	leu	ile			SEC ID:55
		arg	lys	leu	arg	val	asn			SEC ID:56
55		val	arg	thr	val	arg	val			SEC ID:57
		arg	ala	phe	lys	tyr	tyr			SEC ID:58
		ile	thr	arg	arg	thr	gln			SEC ID:59
60		lys	met	pro	lys	lys	asn			SEC ID:60
		lys	pro	lys	met	met	cys			SEC ID:61
65		lys	lys	met	arg	phe	trp			SEC ID:62

ES 2 330 538 T3

TABLA 2 (continuación)

	N.º	1	2	3	4	5	6	7	SEC ID N.º
5		lys	lys	lys	phe	tyr	tyr		SEC ID:63
		lys	ser	asn	lys	val	arg		SEC ID:64
10		lys	trp	pro	his	his	arg		SEC ID:65
		arg	his	ile	gln	trp	tyr		SEC ID:66
		leu	arg	leu	lys	pro	lys		SEC ID:67
15		glu	arg	lys	arg	cys	thr		SEC ID:68
		arg	arg	ala	arg	gln	asp		SEC ID:69
		arg	glu	lys	gly	ala	arg		SEC ID:70

Además, el péptido preferido puede ser cualquiera de los péptidos identificados mediante cualquiera de las SEC ID: 1 a 70, preferiblemente, cualquiera de las SEC ID: 1 a 23 y 26 a 35, tal como SEC ID: 1 a 23, por ejemplo, SEC ID: 25 a 35, en las que 3 aminoácidos, preferiblemente, 2 aminoácidos, más preferiblemente, 1 aminoácido ha sido sustituido por otro aminoácido. Preferiblemente, dicha sustitución es una sustitución conservadora, i.e., una sustitución por un aminoácido con características similares. Dicha característica podría ser, por ejemplo, propiedades ácidas/básicas, polaridad o lipofilia. También está comprendido dentro de la invención que el péptido pueda ser un péptido del tamaño anteriormente mencionado que comprenda cualquiera de los péptidos identificados por SEC ID: 1 a 70. En particular, para inmovilizar el péptido sobre una perla de resina, puede ser útil sintetizar el péptido de adhesión sobre un aminoácido inmovilizado sobre la perla de resina, por ejemplo, sobre Gly.

En una realización, el péptido se selecciona preferiblemente del grupo constituido por los péptidos identificados por SEC ID: 21 a 23 y 36 a 35, más preferiblemente, del grupo constituido por 26 a 35, incluso más preferiblemente, por la SEC ID: 35. En otra realización, se prefiere el péptido definido por SEC ID: 21.

En una realización de la invención, es preferible que el péptido tenga propiedades fluorescentes bajas o esencialmente nulas. Es particularmente preferido que el péptido tenga propiedades fluorescentes bajas o esencialmente nulas cuando esté unido a un soporte sólido, tal como una perla de resina. El término "propiedades fluorescentes esencialmente nulas" significa que el péptido no emite ninguna fluorescencia detectable. Esto es particularmente relevante para las realizaciones de la invención en las que el resultado detectable es fluorescencia (véase más adelante en la presente memoria). Los péptidos preferidos para su uso con esta realización de la invención se pueden seleccionar del grupo constituido por SEC ID: 26 a 35.

Los péptidos útiles como compuestos de adhesión celular se pueden identificar usando cualquier procedimiento adecuado. Dicho procedimiento puede incluir, por ejemplo, las etapas de:

- i) unir un péptido de prueba a una perla de resina;
- ii) incubar dicha perla de resina con células en condiciones de cultivo celular;
- iii) analizar si dichas células se unen a dicha perla de resina;
- iv) identificar la secuencia peptídica

en el que el péptido de prueba es útil como compuesto de adhesión celular si se unen más células a dicha perla de resina en presencia, que en ausencia de dicho péptido de prueba. Preferiblemente, el péptido de prueba es útil como compuesto de adhesión celular si al menos 200, más preferiblemente, al menos 500, incluso más preferiblemente, al menos 1.000 células se unen a dicha perla de resina tras la incubación. Esto es particularmente el caso de realizaciones de la invención en las que las resina son perlas de PEGA. Por ejemplo, es posible identificar péptidos de prueba útiles según lo descrito en el ejemplo 1 que se presenta más adelante en la presente memoria.

En las realizaciones de la invención en las que es preferible que el péptido tenga una fluorescencia baja o nula, es preferible que el procedimiento comprenda una etapa adicional realizada en cualquier momento posterior a la etapa i), tal como inmediatamente después de la etapa i) y antes de la etapa ii). Dicha etapa adicional comprende analizar si dicho péptido tiene propiedades fluorescentes. Esto se puede hacer, por ejemplo, clasificando las perlas de resina en un FABS o manualmente con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. Si esto se hace antes de la etapa ii), entonces sólo se incuban con las células las perlas de resina con propiedades de fluorescencia bajas o nulas. En el ejemplo 1a, se describe un ejemplo no restrictivo de un procedimiento útil.

El péptido puede ser unido a la perla de resina mediante cualquier procedimiento útil, por ejemplo, mediante la síntesis del péptido directamente sobre una perla de resina amino-funcionalizada usando un protocolo de Fmoc estándar para la síntesis de péptidos. Se pueden usar otros grupos protectores en lugar de Fmoc, como por ejemplo, N₃ o Alloc. En una realización, Alloc es el grupo protector preferido. Es preferible usar diferentes grupos protectores para la síntesis del péptido de adhesión o para la síntesis del banco. También se puede sintetizar el péptido anclando un aminoácido con Fmoc a una perla de resina con funcionalidad hidroxilo, tal como la resina PEGA derivada de ácido hidroximetilbenzoico, seguido por el ensamblaje del péptido usando una tecnología de Fmoc estándar como la descrita en B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz y R. Frank, "An Efficient method for anchoring Fmoc-amino acids to hydroxyl-functionalised solid supports", *Tetrahedron Lett.* 31:1701-1704, 1990. Las cadenas laterales se pueden proteger con grupos protectores lábiles a ácidos tales como t-Bu, Trt, Pmc, Boc, etc. El péptido protegido se puede escindir de la resina, por ejemplo, usando condiciones alcalinas o hidracina, pudiéndose determinar la estructura, p. ej., mediante una degradación de Edman sobre la perla. En el ejemplo 5a, "Síntesis del péptido de adhesión" que se presenta más adelante en la presente memoria, se proporciona un ejemplo no restrictivo de un procedimiento para sintetizar un péptido de adhesión.

En una realización, el compuesto de adhesión puede estar unido a la perla de resina mediante un ligador, que puede ser un ligador escindible. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la síntesis del ligador directamente sobre las perlas de resina o la unión del ligador con las perlas de resina y la posterior unión o síntesis del banco sobre las perlas de resina. De este modo, antes de unir el banco, el ligador comprende preferiblemente un grupo protector según lo descrito anteriormente en la presente memoria. El ligador escindible puede ser cualquiera de los ligadores escindibles descritos más adelante en la presente memoria. Si las perlas de resina están unidas a un banco mediante un ligador escindible, es preferible que el ligador escindible que une el compuesto de adhesión sea escindible de manera diferente.

En realizaciones en las que las células se adhieren a la perla de resina mediante un compuesto de adhesión y el compuesto de adhesión está unido a la perla de resina mediante un ligador escindible, las células pueden ser al menos parcialmente o incluso esencialmente por completo liberadas de la perla de resina mediante la escisión del ligador escindible.

El análisis de si las células se unen a las perlas de resina se puede hacer mediante cualquier procedimiento convencional, tal como mediante una inspección manual con la ayuda de un microscopio de luz. Si las células tienen propiedades fluorescentes, por ejemplo, si las células expresan una proteína fluorescente, entonces las perlas de resina con células unidas pueden ser identificadas usando un microscopio fluorescente o un FABS, preferiblemente, un microscopio fluorescente.

En una realización preferida de la invención, las células pueden ser cultivadas directamente sobre las perlas de resina. En general, un procedimiento para cultivar células sobre perlas de resina puede comprender las etapas de:

- Proporcionar perlas de resina capaces de mantener el crecimiento de células.
- Sembrar células sobre dicha perla de resina.
- Incubar dichas perlas de resina que comprenden dichas células en un medio de cultivo celular en condiciones de cultivo celular.
- Opcionalmente, dejar que dichas células se dividan sobre dicha perla de resina.
- Cultivar de ese modo células sobre las perlas de resina.

Las células se pueden adherir activamente a las perlas de resina y luego serán, por lo general, denominadas células adherentes.

Las condiciones de cultivo de las células dependen de las células específicas. Para un gran número de células de mamífero, tales condiciones comprenden una humedad elevada, preferiblemente, cercana al 100%, CO₂ aproximadamente al 5% y en torno a 37°C. A menudo es deseable mantener las perlas de resina sumergidas en un medio de cultivo adecuado y, frecuentemente, también es deseable poder hacer circular las perlas de resina por dentro de dicho medio, por ejemplo, mediante agitación o rotación. Dicha agitación o rotación puede ser continua o a intervalos. También es posible que el recipiente que comprende las perlas de resina sea simplemente mecido suavemente unas cuantas veces de vez en cuando.

En otra realización preferida de la invención, las células pueden estar unidas a las perlas de resina sin una adhesión activa. Por ejemplo, éste puede ser el caso de células no adherentes, i.e., células que pueden ser cultivadas en suspensión.

En una realización de la invención, más de una línea celular o tipo de célula primaria se unen a o son cultivadas sobre las perlas. Por consiguiente, se pueden unir a o cultivar sobre dichas perlas, por ejemplo 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo 6, tal como 7, por ejemplo 8, tal como 9, por ejemplo 10, tal como en el intervalo de 10 a 20, por ejemplo, en el intervalo de 20 a 50, tal como más de 50 líneas celulares diferentes. También se pueden unir diferentes células primarias específicas a las perlas cultivadas.

Es posible que un sub-grupo de perlas de resina sólo comprenda una línea celular o una clase específica de células primarias y otro sub-grupo de perlas de resina comprenda otra línea celular u otra clase específica de células primarias, etcétera. Sin embargo, también es posible que, en principio, todas las perlas de resina comprendan todas las líneas celulares diferentes. También se pueden prever los casos intermedios entre estos dos extremos. Preferiblemente, dichas líneas celulares diferentes y/o células primarias diferentes comprenden diferentes sistemas indicadores. Por consiguiente, es posible que las diferentes líneas celulares sean derivadas de la misma línea celular precursora mediante la inserción de diferentes sistemas indicadores. Sin embargo, las líneas celulares diferentes también pueden no estar relacionadas.

10 *Ligadores escindibles*

El banco de los compuestos de prueba y/o el compuesto de adhesión puede estar unido en una realización a las perlas de resina o a soportes sólidos mediante el ligador escindible.

15 El ligador escindible puede ser cualquier resto químico que se pueda usar para unir una molécula a un soporte sólido bien covalentemente o mediante la formación de un complejo, y después de ello, que sea capaz de liberar dicha molécula mediante la acción de bien un ácido, una base, electrófilos, nucleófilos, agentes oxidantes, agentes reductores, metales o luz. Preferiblemente, el ligador escindible une el miembro del banco/la molécula de adhesión con el soporte sólido covalentemente. Una publicación exhaustiva que describe el estado de la técnica en cuanto a los “ligadores escindibles” es “Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry”, F. Guillier, D. Orain y M. Bradley, *Chem. Rev.* 2000, 100, 2091-2157. Con la presente invención, se puede usar cualquiera de los ligadores escindibles descritos en la misma.

25 Los ejemplos de ligadores lábiles a ácidos útiles incluyen los ligadores usados más comúnmente para el desprendimiento ácido desde un soporte sólido, los ligadores de Wang y Rink. Los ejemplos de ligadores lábiles a bases útiles incluyen los ligadores de Wang y de HMBA, que pueden ser escindidos en condiciones alcalinas. Los ligadores escindibles sensibles a la luz son ligadores que, tras la acción de la luz con una determinada longitud de onda e intensidad, pueden liberar el miembro del banco/el compuesto de adhesión del soporte sólido. Los ligadores foto-lábiles escindibles mediante la radiación con luz UV pueden ser los ligadores del tipo *o*-nitrobencilo (análogos nitrados del ligador de Wang), los ligadores del tipo NBA o los ligadores del tipo Holmes. También se pueden usar con la invención los ligadores de paladio. En una realización, se prefieren los ligadores fotolábiles.

Moléculas de la superficie celular

35 En una realización particularmente preferida de la invención, los procedimientos de la invención implican la identificación de compuestos que modulan una respuesta celular que es mediada a través de una molécula de la superficie celular. Por consiguiente, la invención puede ser útil, por ejemplo, en la identificación de compuestos que modulan la actividad de una molécula de la superficie celular, preferiblemente, una molécula de la superficie celular capaz de activar/inhibir una ruta de transducción de señales. En el contexto de la presente invención, el término “ruta de transducción de señales” debería entenderse en el significado comúnmente usado en Biología Celular i.e., la modulación de un hecho intracelular desencadenado por un receptor de la superficie celular.

45 Las rutas de transducción de señales pueden implicar, por ejemplo, las etapas de fosforilación, escisión de proteínas, síntesis de AMPc, activación de la transcripción, inhibición de la transcripción, cambio en la concentración de Ca^{2+} intracelular, cambio en el potencial de la membrana, relocalización subcelular de los componentes celulares, formación de complejos de componentes celulares, degradación de componentes celulares y/o cambio en el metabolismo energético.

50 La molécula de la superficie celular es preferiblemente una proteína, más preferiblemente, una proteína que es accesible desde la superficie extracelular. Aún más preferiblemente, la molécula de la superficie celular es un receptor de proteínas de la superficie célula (también denominado simplemente en la presente memoria “receptor”). Un “receptor”, en el significado de la presente invención, es una molécula que al menos a veces está ubicada en la superficie celular y que es capaz de asociarse con al menos un ligando. El sitio de unión al ligando es accesible desde la superficie extracelular. Frecuentemente, la asociación con dicho ligando puede alterar la actividad del receptor.

55 En una realización preferida, la molécula de la superficie celular es un receptor unido a proteína G (GPCR). GPCR es una familia de receptores unidos a una proteína G trimérica. Los GPCR para su uso con la invención tiene preferiblemente 7 dominios transmembrana. Los ejemplos de GPCR útiles se ofrecen en la tabla 3.

60 Los GPCR se pueden dividir en sub-familias. Por consiguiente, los GPCR se pueden seleccionar del grupo constituido por GPCR que pertenecen a la familia del tipo rodopsina, la familia de la secretina o la familia metabotrópica, preferiblemente del grupo constituido por GPCR pertenecientes a la familia de tipo rodopsina o la familia de la secretina.

65 Los GPCR de tipo rodopsina también se denominan GPCR de clase I. Se caracterizan por una similitud estructural con el receptor de rodopsina. Los ejemplos preferidos de miembros de esta familia incluyen receptores para los siguientes ligandos: Acetilcolina (muscarínica y nicotínica), Adrenoceptores, Adrenoceptores alfa, Adrenoceptores beta, Dopamina, Histamina, Serotonina (5-HT), Angiotensina, Bradicinina, anafilatoxina C5a, Fmet-leu-phe, Interleucina-

8, ochernocina, Orexina, Nociceptina, CCK (Gastrina), Endotelina, Melanocortina incluyendo cualquiera de los receptores de melanocortina de 1 a 5, Neuropeptido Y, Neurotensina, Opiode, Somatostatina, Tachicina (Sustancia P, NKA₁), Trombina, tipo vasopresina, Galanina, hormona de estimulación folicular, Lutropina-coriogonadotropina, Tirotropina, Rodopsina, Opsina, Prostaglandina, ácido lisofosfatidico, Esfingosina-1-fosfato, Leucotrieno, Prostaciclina, Tromboxano, Adenosina, Purinoceptores, Cánnabis, factor de activación plaquetaria, hormona liberadora de gonadotropina, hormona liberadora de tirotropina, factor de inhibición de la hormona del crecimiento o Melatonina.

Los GPCR del tipo secretina también se denominan GPCR de clase II. Se caracterizan por una similitud estructural con el receptor de la secretina. (N.º de acceso NM_002980). Los ejemplos preferidos de miembros de esta familia incluyen receptores para los siguientes ligandos: secretina, calcitonina, factor liberador de corticotropina/urocortina, péptido inhibidor gástrico (GIP), péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), hormona liberadora de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, PACAP o polipéptido intestinal vasoactivo (VIP).

Los GPCR metabotrópicos también se denominan GPCR de clase III. Los ejemplos preferidos de miembros de este grupo incluyen receptores para los siguientes ligandos: glutamato metabotrópico, GABA₈ o el sensor del calcio extracelular.

En otra realización preferida de la invención, los GPCR se unen a una proteína G, tal como G_s que estimula la adenilato ciclasa. En otra realización preferida de la invención, los GPCR se unen a una proteína G, tal como G_i, que inhibe la adenilato ciclasa. En la tabla 3, se ofrecen ejemplos de GPCR unidos a G_s o G_i.

TABLA 3

Símbolo del gen* del Servidor	
<u>Gene</u> <u>Ontology</u> <u>Blast</u>	Nombre completo
Señalización de la proteína G, unidos al segundo mensajero nucleótido cíclico	
NEUY_HUMAN	Precursor del neuropeptido Y [Contiene: Neuropeptido Y
ACM2_HUMAN	Receptor de la acetilcolina muscarínica M2
SY02_HUMAN	Precursor de la citocina inducible pequeña A2
B3AR_HUMAN	Receptor beta-3 adrenérgico
TSHR_HUMAN	Precursor del receptor de la tirotropina
CB1R_HUMAN	Receptor cannabinoide 1
DADR_HUMAN	Receptor de la dopamina D(1A)
LSHR_HUMAN	Precursor del receptor de la hormona
coriogonadotrópica-	lutropina
HH2R_HUMAN	Receptor de la histamina H2
NY1R_HUMAN	receptores de tipo 1 del neuropeptido Y
5H1D_HUMAN	Receptor de la 5-hidroxitriptamina 1D
5H1B_HUMAN	Receptor de la 5-hidroxitriptamina 1B
5H1E_HUMAN	Receptor de la 5-hidroxitriptamina 1E
SSR1_HUMAN	Receptor de la somatostatina de tipo 1
SSR2_HUMAN	Receptor de somatostatina de tipo 2
5H1F_HUMAN	Receptor de la 5-hidroxitriptamina 1F
SSR4_HUMAN	Receptor de la somatostatina de tipo 4
VIPR_HUMAN	Precursor del receptor 1 del polipéptido intestinal vasoactivo
CKR1_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 1
SSR3_HUMAN	Receptor de la somatostatina de tipo 3

ES 2 330 538 T3

	Simbolo del gen* del Servidor		Nombre completo
5	<u>Gene Ontology Blast</u>		
	MC5R_HUMAN		Receptor de la melanocortina-5
	5H7_HUMAN		Receptor de 5-hidroxitriptamina 7
10	CB2R_HUMAN		Receptor cannabinoide 2
	CRF1_HUMAN		Precursor del receptor 1 del factor liberador de la corticotropina
15	SSR5_HUMAN		Receptor de la somatostatina de tipo 5
	OPRM_HUMAN		Receptor opioide de tipo Mu
	OPRD_HUMAN		Receptor opioide de tipo delta
20	MC3R_HUMAN		Receptor de melanocortina-3
	<u>Gene Ontology Blast</u>		Nombre completo
25	PI2R_HUMAN		Receptor de la prostaciclina
	CXC1_HUMAN		Receptor 1 de la quimiocina XC
	ML1A_HUMAN		Receptor de la melatonina de tipo 1A
30	ML1B_HUMAN		Receptor de la melatonina de tipo 1B
	5H6_HUMAN		Receptor de 5-hidroxitriptamina 6
	ACTR_HUMAN		Receptor de la hormona adrenocorticotrópica
35	MSHR_HUMAN		Receptor de la hormona estimulante de melanocitos
	PTRR_HUMAN		Precursor del receptor de la hormona paratiroidea/del péptido ligado a la hormona paratiroidea
40	5H4_HUMAN		Receptor de la 5-hidroxitriptamina 4
	CGRR_HUMAN		Precursor del receptor del péptido ligado al gen de la calcitonina de tipo 1
45	EDG7_HUMAN		Receptor Edg-7 del ácido lisofosfatídico
	HH3R_HUMAN		Receptor de histamina H3
50	Htr7 RGD		Receptor 7 de 5-hidroxitriptamina (serotonina)
	Señalización de la proteína G, unidos al segundo mensajero nucleótido AMPc		
	PE23_MOUSE		Receptor de la prostaglandina E2, subtipo EP3
55	CYA4_MOUSE		Adenilato ciclasa, tipo IV
	P2YC_MOUSE		Purinoceptor 12 de P2Y
	GALS_HUMAN		Receptor de la galanina de tipo 2
60	GLP2_HUMAN		Precursor del receptor del péptido 2 de tipo glucagón
	CAL0_HUMAN		Precursor de la calcitonina [contiene: calcitonina;
65	SLIB_HUMAN		Precursor de la somatoliberina

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	CAL1_HUMAN	catacalcina Precursor del péptido I relacionado con el gen de la calcitonina
10	B2AR_HUMAN	Receptor beta-2 adrenérgico
	ACM2_HUMAN	Receptor de la acetilcolina muscarínica M2
	B3AR_HUMAN	Receptor beta-3 adrenérgico
15	FMLR_HUMAN	Receptor de fMet-Leu-Phe
	A1AD_HUMAN	Receptor alfa-1D adrenérgico
20	AA2A_HUMAN	Receptor de la adenosina A2a
	V2R_HUMAN	Receptor de la vasopresina V2
	PE23_MOUSE	Receptor de la prostaglandina E2, subtipo EP3
25	MC4R_HUMAN	Receptor de la melanocortina-4
	GRK5_HUMAN	Cinasa CRK5 del receptor unido a la proteína G
	CRF1_HUMAN	Precursor del receptor 1 del factor liberador de la corticotropina
30	A1AB_HUMAN	Receptor alfa-1B adrenérgico
	PE24_HUMAN	Receptor de prostaglandina E2, subtipo EP4
35	GLR_HUMAN	Precursor del receptor del glucagón
	CKR3_HUMAN C-C	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 3
40	CRF2_HUMAN	Precursor del receptor 2 del factor liberador de la corticotropina
	Q8BZV8	Homólogo del receptor de ADP plaquetario P2Y12
45	CYA4_MOUSE	Adenilato ciclasa, tipo IV
	Q99188	ORF OR107W del cromosoma XV
	P2YC_MOUSE	Purinoceptor 12 de P2Y
50	WAS2_HUMAN	Miembro 2 de la familia de proteínas del Síndrome de Wiskott-Aldrich
	Adcy2 MGI	Adenilato ciclasa 2
55	Adcy4 MGI	Adenilato ciclasa 4
	P2ry12 MGI	Con receptor purinérgico P2Y, 12 unido a proteína G
60	Ptger3 MGI	Receptor 3 de prostaglandina E, (subtipo EP3)
	Crhr1 RGD I	Hormona 1 liberadora de la corticotropina
	CYR1 SGD	Adenilato ciclasa

65

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	RGS2 SGD	Proteína activadora de la GTPasa (GAP)
	acy-1	IMP -- [cgc3038]
	acy-2	IMP -- [cgc3207]
10	C44F1,5	[cgc3038]
	acy-4	[cgc3207]
	Señalización de la proteína G, ruta de activación de la adenilato ciclasa	
15	GBQ_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(q),
	subunidad	alfa
20	Q9D1X2	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides
	TSHR_MOUSE	Precursor del receptor de la tirotropina
	Q9WUC0	Polipéptido de unión del nucleótido guanina estimulante
25		alfa extra grande
	Q9Z0H2	Isoforma 2 de la proteína P55 de golgi específica de la
		neuroendocrina
30	Q9Z0L1	Precursor del receptor unido a la proteína G
	Q9Z1N8	Proteína G XLALPHAS
	Q9Z1R7	Proteína de unión del nucleótido guanina
35	AA2A_MOUSE	Receptor de la adenosina A2a
	LGR8_MOUSE	Receptor 2 de la relaxina
40	UCN3_MOUSE	Precursor de la urocortina III
	RAS1_YEAST	Proteína 1 de tipo Ras
	GBQ_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(q),
45	subunidad	alfa
	CALR_HUMAN	Precursor del receptor de la calcitonina
	GPR3_HUMAN	Receptor probable unido a la proteína G GPR3
50	TSHR_MOUSE	Precursor del receptor de la tirotropina
	Q14455	Subunidad alfa de la proteína de unión de GsGTP
		(fragmento)
55	AA2A_MOUSE	Receptor de la adenosina A2a
	GBAF_MOUSE GB10_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(OLF),
60		subunidad alfa (fragmento). Proteína de unión del
		nucleótido guanina, (fragmento de la subunidad alfa-10)
	Q80ZK6	Similar a GNAS (fragmento)
65		

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	Q8BIR3	Homólogo de la protenina XLALPHAS
	Q8BM77	Similar al receptor unido a la proteína G QUE AFECTA
	al	DESCENSO testicular
10	Q8BUB2	GNAS
	Q8BXD1	Similar al receptor unido a la proteína G QUE AFECTA
	al	DESCENSO testicular
15	Q8C6E2	Inferido: diferenciación endotelial
	Q8CAU3	Receptor de la adenosina A2a (fragmento)
20	LGR8_MOUSE	Receptor 2 de la relaxina
	UCN3_MOUSE	Precursor de urocortina III
	Q9D1X2	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides
25	Q9D697	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides
	Q9JJX0	Proteína XLalphas (fragmento)
	Q9QXW5	Nesp
30	Q9QYZ0	Proteína de unión del nucleótido guanina estimulante alfa extra grande (fragmento)
35	Q9WUC0	Polipéptido de unión del nucleótido guanina estimulante alfa extra grande
	Q9Z0H2	Isoforma 2 de la proteína P55 de golgi específica de la neuroendocrina
40	Q9Z0L1	Precursor del receptor unido a la proteína G
	Q9Z1 N8	Proteína G XLALPHAS
45	Q9Z1R7	Proteína de unión del nucleótido guanina
	Adora2a	Receptor de la adenosina A2a
50	Edg6	Diferenciación endotelial, receptor 6 acoplado a la
	proteína	G
	Gnal	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa
55	estimulante,	tipo olfativo
	Gnaq	Proteína de unión del nucleótido guanina, polipéptido
60	alfa	q
	Gnas	Locus complejo de GNAS (proteína de unión del nucleótido guanina, alfa estimulante)
65		

ES 2 330 538 T3

	Simbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	Gnas	Locus complejo de GNAS (proteína de unión del nucleótido guanina, alfa estimulante)
	Gpr106	Receptor 106 unido a la proteína G
10	Ptger4	Receptor 4 de la prostaglandina E (subtipo EP4)
	Tshr	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides
	Ucn3	urocortina 3
15	RAS1	Homólogo de ras
	PiaA	Regulador citosólico de la adenilil ciclase
20	G-salpa60A	G-salpa60A
	Pacap38 F	Pacap38
	DADR_MOUSE	Receptor de la dopamina D(1A)
25	043190	No disponible
	CAL0_HUMAN	Precursor de la calcitonina [contiene: calcitonina; catacalcina
30	GBAS_HUMAN	Proteína de unión del nucleótido guanina G(S),
	subunidad	alfa
	CAL1_HUMAN	Precursor I del péptido relacionado con el gen de la calcitonina
35		
	B2AR_HUMAN	Receptor beta-2 adrenérgico
40	B1AR_HUMAN	Receptor beta-1 adrenérgico
	PACA_HUMAN	Precursor polipeptídico de activación de la adenilato ciclase pituitaria
45	ET1R_HUMAN	Precursor del receptor de la endotelina-1
	AA2A_HUMAN	Receptor de la adenosina A2a
	AA2B_HUMAN	Receptor de la adenosina A2b
50	V2R_HUMAN	Receptor de la vasopresina V2
	CALR_HUMAN	Precursor del receptor de la calcitonina
	AA3R_HUMAN	Receptor de la adenosina A3
55	CRF1_HUMAN	Precursor del receptor 1 del factor liberador de la corticotropina
60	CAP2_HUMAN	Proteína 2 asociada con la adenilil ciclase
	GLP1_HUMAN	Precursor del receptor del péptido 1 de tipo glucagón
	GIPR_HUMAN	Precursor del receptor del polipéptido inhibidor gástrico
65		

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	CAP1_HUMAN	Proteína 1 asociada con la adenilil ciclase
	GRFR_HUMAN	Precursor del receptor de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento
10	GBAF_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(OLF), subunidad alfa (fragmento)
15	GB10_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina, subunidad alfa-
	DADR_MOUSE	Receptor de la dopamina D(1A)
20	B2AR_ONCMY	Receptor beta-2 adrenérgico
	Adcy1	Adenilato ciclase 1
	Adcy2	Adenilato ciclase 2
25	Adcy3	Adenilato ciclase 3
	Adcy4	Adenilato ciclase 4
	Adcy5	Adenilato ciclase 5
30	Adcy6	Adenilato ciclase 6
	Adcy7	Adenilato ciclase 7
	Adcy9	Adenilato ciclase 9
35	Adcyap1	Polipéptido 1 de activación de la adenilato ciclase
	Drd1a	Receptor de la dopamina D1A
40	Gnal	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa estimulante,
	RAS2	Proteína de unión de GTP pequeño
45	Receptor de dopamina, ruta de activación de la adenilato ciclase	
	Q8CH75	Variante P del receptor opioide Mu
	Q8VI69	Variante BII del receptor opioide Mu
50	OPRM_MOUSE	Receptor opioide de tipo Mu
	Q9JIY1	Variante F del receptor opioide Mu
	Q9R0D1	Variante C del receptor opioide Mu
55	Q9R1L9	Receptor opioide Mu MOR1 E
	DADR_MOUSE	Receptor de la dopamina D(1A)
60	DADR_HUMAN	Receptor de la dopamina D(1A)
	DBDR_HUMAN	Receptor de la dopamina D(1B)
	OPRM_MOUSE	Receptor opioide de tipo Mu
65		

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	DADR_MOUSE	Receptor de la dopamina D(1A)
	Q8CAN5	Receptor opioide
	Q8CGW2	Variante del receptor opioide Mu MOR-1 R
10	Q8CH73	Variante R del receptor opioide Mu
	Q8CH74	Variante Q del receptor opioide Mu
	Q8CH75	Variante P del receptor opioide Mu
15	Q8VI69	Variante BII del receptor opioide Mu
	Q8VI70	Variante BI del receptor opioide Mu
20	Q8VI71	Variante A del receptor opioide Mu
	OPR2_MOUSE	Receptor opioide de tipo Mu, isoformas 1G a 1M
	Q9JIY1	Variante F del receptor opioide Mu
25	Q9R0D1	Variante C del receptor opioide Mu
	Q9R0D2	Variante 110222 del receptor opioide Mu (fragmento)
	Q9R1L9	Receptor opioide Mu MOR1E
30	Q9R1M0	Receptor opioide MOR1D
	Drd1a	Receptor de la dopamina D1A
	NOT Oprd1	Receptor opioide, delta 1
35	Oprm	Receptor opioide, mu
	Tar1	Receptor 1 de aminas traza
40	Receptor de la serotonina, ruta de activación de la adenilato ciclasa	
	5-HT7	5-HT7
	5-HT7	5-HT7
45	5-HT7	5-HT7
	Htr7	Receptor 7 de 5-hidroxitriptamina (serotonina)
	Señalización de la proteína G, ruta de inhibición de la adenilato ciclasa	
50	GBI2_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(i),
	subunidad	alfa-2
	Q8CH75	Variante P del receptor opioide Mu
55	Q8VI69	Variante BII del receptor opioide
	SSR2_MOUSE	Receptor de la somatostatina de tipo 2
60	OPRD_MOUSE	Receptor opioide de tipo delta
	Q9DC35	Diferenciación endotelial, receptor 1 unido a la proteína
	G	esfingolipídica

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	OPRM_MOUSE	Receptor opioide de tipo Mu
	Q9JIY1	Variante F del receptor opioide Mu
	Q9R0D1	Variante C del receptor opioide Mu
10	Q9R1L9	Receptor opioide de tipo Mu MOR1E
	Q9Z0U9	Receptor B3 de lisofosfolípidos
15	EDG1_MOUSE	Receptor probable unido a la proteína G Edg-1
	CORT_HUMAN	Precursor de la cortistatina [contiene: cortistatina-29; cortistatina-17]]
20	EDG1_MOUSE	Receptor probable unido a la proteína G Edg-1
	GB12_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(i), subunidad alfa-2
25	NY1R_HUMAN	Receptor de tipo 1 del neuropéptido Y
	SSR2_MOUSE	Receptor de la somatostatina de tipo 2
	OPRD_MOUSE	Receptor opioide de tipo delta
30	OPRK_HUMAN	Receptor opioide de tipo kappa
	OPRX_HUMAN	Receptor de la nociceptina
35	OPRM_MOUSE	Receptor opioide de tipo Mu
	NY2R_HUMAN	Receptor de tipo 2 del neuropéptido Y
	RGS1_HUMAN	Regulador de la señalización 1 de la proteína G
40	Q8BLP9	Receptor opioide de tipo delta
	Q8BP20	Diferenciación endotelial
	Q8C4A3	Diferenciación endotelial, receptor 1 unido a la proteína esfingolipídica
45	G	
	Q8CAN5	Receptor opioide
	Q8CGW2	Variante MOR-1R del receptor opioide Mu
50	Q8CH73	Variante R del receptor opioide Mu
	Q8CH74	Variante Q del receptor opioide Mu
	Q8CH75	Variante P del receptor opioide Mu
55	Q8JZT4	Similar a la proteína de unión del nucleótido guanina, inhibidor 2
60	Q8VI69	Variante BII del receptor opioide Mu
	Q8VI70	Variante BI del receptor opioide Mu
	Q8VI71	Variante A del receptor opioide Mu

65

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
5	<u>Gene Ontology Blast</u>	
	OPR2_MOUSE	Receptor opioide de tipo Mu, isoformas 1G a 1M
	Q922Y6	Proteína hipotética (fragmento)
10	MCR1_HUMAN	Receptor 1 de la hormona de concentración de la melanina
	Q9DC35	Diferenciación endotelial, receptor 1 unido a la proteína
15	G	esfingolipídica
	Q9JIY1	Variante F del receptor opioide Mu
	Q9R0D1	Variante C del receptor opioide Mu
20	Q9R0D2	Variante 110222 del receptor opioide Mu (fragmento)
	Q9R1L9	Receptor opioide Mu MOR1 E
	Q9R1M0	Receptor opioide de MOR1 D
25	Q9R235	Receptor B1 de lisofosfolípidos
	Q9Z0U9	Receptor B3 de lisofosfolípidos
	Edg1	Diferenciación endotelial, receptor 1 unido a la proteína
30	G	esfingolipídica
	Edg3	Diferenciación endotelial, receptor unido a la proteína G
35		esfingolipídica
	Gnai2	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa inhibidor
	2	
40	Npb	Neuropéptido B
	Oprd1	Receptor opioide, delta 1
	Oprm	Receptor opioide, mu
45	Sstr2	Receptor de la somatostatina 2
	Oprm1	"Receptor opioide, mu 1"
	Receptor de la dopamina, ruta de inhibición de la adenilato ciclasa	
50	D2DR_HUMAN	Receptor de la dopamina D(2)
	Receptor de la acetil colina muscarínica, ruta de inhibición de la adenilato ciclasa	
55	ACM2_HUMAN	Receptor M2 de la acetilcolina muscarínica
	ACM5_HUMAN	Receptor M5 de la acetilcolina muscarínica
	Regulación negativa de la actividad de la adenilato ciclasa	
60	MGR8_HUMAN	Precursor del receptor 8 del glutamato metabotrópico
	GALT_HUMAN	Receptor de la galanina de tipo 3

65

ES 2 330 538 T3

Símbolo del gen* del Servidor

Gene Ontology Blast

Nombre completoGBR2_HUMAN

5	Receptor de tipo B del ácido gamma-aminobutírico, subunidad 2	
10	GBI2_HUMAN subunidad	Proteína de unión del nucleótido guanina G(i), alfa-2
15	GBAK_HUMAN subunidad	Proteína de unión del nucleótido guanina G(k), alfa
	A2AA_HUMAN	Receptor alfa-2A adrenérgico
	ETBR_HUMAN	Precursor del receptor de la endotelina B
20	CKR2_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 2
	GALR_HUMAN	Receptor de la galanina de tipo 1
	MGR2_HUMAN	Precursor del receptor 2 del glutamato metabotrópico
25	MGR7_HUMAN	Precursor del receptor 7 del glutamato metabotrópico
	MGR3_HUMAN	Precursor del receptor 3 del glutamato metabotrópico
	MGR4_HUMAN	Precursor del receptor 4 del glutamato metabotrópico
30	Q9NPE5	No disponible
	GBR1_HUMAN	Receptor de tipo B del ácido gamma-aminobutírico, subunidad 1
35	Regulación positiva de la actividad de la adenilato ciclasa dagA	Regulador citosólico de la adenilil ciclasa
40	Receptor de la serotonina, ruta de inhibición de la adenilato ciclasa 5-HT1A	5-HT1A
	5-HT1B	5-HT1 B
45	5HTA_DROME	Receptor 2A de la 5-hidroxitriptamina
	5HTB_DROME	Receptor 2B de la 5-hidroxitriptamina
	Q9V8Q3	CG15113-PA
50	Q9V8Q9	Proteína CG16720
	Señalización de la proteína G, unidos al segundo mensajero nucleótido GMPc	
55	TBL3_HUMAN	Proteína de repetición de WD SAZD
	4933400B15Rik	Gen 4933400B15 del ADNc de RIKEN
	Gnat1	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa
60	transductor1	
	Gnat2	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa
	transductor	2
65		

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	
	<u>Gene Ontology Blast</u>	Nombre completo
5	Tbl3	transducina (beta)-tipo 3
	Símbolo del gen* del Servidor	
	<u>Gene Ontology Blast</u>	Nombre completo
10	Nos2	Óxido nítrico sintasa 2
	Señalización de la proteína G, unidos al segundo mensajero IP3 (activación de la fosfolipasa C)	
15	GB15_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina, subunidad
	alfa-	15
	Q9ERT2	Receptor 2 de la hormona liberadora de la tirotropina
20	GBGD_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(I)/G(S)/G(O)
		subunidad gamma 13
	043190	No disponible
25	076067	No disponible
	ETBR_HUMAN	Precursor del receptor de la endotelina B
	IL8B_HUMAN	Receptor B de interleucina 8 de alta afinidad
30	NK1 R_HUMAN	Receptor de la sustancia P
	NMBR_HUMAN	Receptor de la neuromedina B
	AG2R_HUMAN	Receptor de la angiotensina II de tipo 1
35	PE23_MOUSE	Receptor de la prostaglandina E2, subtipo EP3
	OXYR_HUMAN	Receptor de la oxitocina
40	GB15_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina, subunidad
	alfa-	15
	CCKR_HUMAN	Receptor de la colecistocinina de tipo A
45	GASR_HUMAN	Receptor de la gastrina/colecistocinina de tipo B
	HH1R_HUMAN	Receptor de la histamina H1
	P2Y2_HUMAN	Purinoceptor 2 de P2Y
50	5H2B_HUMAN	Receptor 2B de la 5-hidroxitriptamina
	MC3R_HUMAN	Receptor de la melanocortina-3
	P2YR_HUMAN	Purinoceptor 1 de P2Y
55	P2Y4_HUMAN	Purinoceptor 4 de P2Y
	P2Y6_HUMAN	Purinoceptor 6 de P2Y
60	L4R1_HUMAN	Receptor 1 del leucotrieno B4
	Q61621	Subunidad beta de proteína G (fragmento)

65

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	Q9ERT1	Receptor 2 de la hormona liberadora de la tirotropina (fragmento)
	Q9ERT2	Receptor 2 de la hormona liberadora de la tirotropina
10	GBGD_MOUSE	Proteína de unión del nucleótido guanina G(I)/G(S)/G(O) subunidad gamma 13
	Q9NYK7	Receptor de la CCK-B/gastrina
15	Gna15	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa 15
	Gnb1	Proteína de unión del nucleótido guanina, beta 1
20	Gng13	Proteína de unión del nucleótido guanina, gamma 13
	Ptger3	Receptor 3 de prostaglandina E, (subtipo EP3)
	Trhr2	Receptor 2 de la hormona liberadora de la tirotropina
25	Agtr1a	Receptor 1a de la angiotensina
	Elevación de la concentración citosólica de iones de calcio	
	norpA	norpA
30	Q99L49	Similar a la proteína receptora transitoria 2
	PE23_MOUSE	Receptor de prostaglandina E2, subtipo EP3
	TRP6_MOUSE	Canal potencial 6 del receptor transitorio corto
35	JPH2_MOUSE	Junctofilina 2
	SY28_MOUSE	Precursor de la citosina A28 inducible pequeña
40	CKRA_MOUSE	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 10
	TRP2_MOUSE	Canal potencial 2 del receptor transitorio corto
	043431	No disponible
45	GALS_HUMAN	Receptor de la galanina de tipo 2
	SZ13_HUMAN	Precursor de la citosina inducible pequeña B13
	095977	Receptor unido a la proteína G putativa, precursor
50	EDG6	
	CAL0_HUMAN	Precursor de la calcitonina [contiene: calcitonina; catacalcina
55	CAL1_HUMAN	Precursor del péptido I relacionado con el gen de la calcitonina
60	DADR_HUMAN	Receptor de la dopamina D(1A)
	C5AR_HUMAN	Receptor quimiotáctico de anafilatoxina C5a
	ET1R_HUMAN	Precursor del receptor de la endotelina-1

65

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	BRB2_HUMAN	Receptor de la bradicinina B2
	AG2R_HUMAN	Receptor de la angiotensina II de tipo 1
	PE23_MOUSE	Receptor de prostaglandina E2, subtipo EP3
10	CCR4_HUMAN	Receptor de tipo 4 de la quimiocina C-X-C
	CCKR_HUMAN	Receptor de la colecistocinina de tipo A
15	GASR_HUMAN	Receptor de la gastrina/colecistocinina de tipo B
	CKR1_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 1
	CKR7_HUMAN	Precursor del receptor de tipo 7 de la quimiocina C-C
20	V1AR_HUMAN	Receptor de la vasopresina V1a
	CKR2_HUMAN	Receptor de tipo 2 de la quimiocina C-C
	CXC1_HUMAN	Receptor 1 de la quimiocina XC
25	BRB1_HUMAN	Receptor de la bradicinina B1
	V1BR_HUMAN	Receptor de vasopresina V1b
	CCR3_HUMAN	Receptor de tipo 3 de la quimiocina C-X-C
30	P2Y4_HUMAN	Purinoceptor 4 de P2Y
	CKR3_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 3
	CKR4_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 4
35	CKR5_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 5 (CCR5)
	CKR6_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 6
40	CKR8_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 8
	CKR9_HUMAN	Receptor de la quimiocina C-C de tipo 9
	PAR2_HUMAN	Precursor del receptor 2 activado por la proteinasa
45	C3AR_HUMAN	Receptor quimiotáctico de la anafilatoxina C3a
	Q61057	Proteína 2 relacionada con Trp (fragmento)
	TRP6_MOUSE	Canal potencial 6 de receptor transitorio corto
50	Q8BRU2	Proteína receptora transitoria 2
	Q8CDC6	Proteína receptora transitoria 2
55	Q8CEM7	Proteína receptora transitoria 2 (fragmento)
	EDG2_HUMAN	Receptor del ácido lisofosfatídico Edg-2
	EDG3_HUMAN	Receptor Edg-3 de esfingosina-1-fosfato
60	MCR1_HUMAN	Receptor 1 de la hormona de concentración de melanina
	Q99L49	Similar a la proteína receptora transitoria 2

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	JPH2_MOUSE	Junctofilina 2
	SY28_MOUSE	Precursor de citocina inducible pequeña A28
	CKRA_MOUSE	Receptor de quimiocina C–C de tipo 10
10	Q9NYK7	Receptor de CCK–B/gastrina
	TRP2_MOUSE	Canal potencial 2 del receptor transitorio corto
	EDG7_HUMAN	Receptor Edg–7 del ácido lisofosfatídico
15	CLT1_HUMAN	Receptor 1 de cisteinil–leucotrieno
	Ccl28	Ligando 28 de quimiocina (motivo C–C)
20	Edg3	Diferenciación endotelial, receptor unido a la proteína G esfingolípida, 3
	Gpr2	Receptor 2 unido a la proteína G
25	Jph2	Junctofilina 2
	Ptger3	Receptor 3 de la prostaglandina E, (subtipo EP3)
	Trpc2	Canal catiónico potencial del receptor transitorio, subfamilia C, miembro 2
30		
	Trpc6	Canal catiónico potencial del receptor transitorio, subfamilia C, miembro 6
35		
	Itpr3	Receptor 3" de inositol–1,4,5–trifosfato
	Trrp6	"Canal catiónico potencial del receptor transitorio, subfamilia C, miembro 6"
40		
	itr–1	No disponible
	Receptor del glutamato metabotrópico, ruta de activación de la fosfolipasa C	
45	096003	Proteína SYN47
	MGR5_HUMAN	Precursor del receptor 5 del glutamato metabotrópico
	Grm5	"Receptor del glutamato, metabotrópico 5"
50	Receptor de la acetil colina muscarínica, ruta de activación de la fosfolipasa C	
	ACM2_HUMAN	Receptor de la acetilcolina muscarínica M2
55	ACM1_HUMAN	Receptor de la acetilcolina muscarínica M1 (también denominado en la presente memoria muscarínico M1)
	GB15_HUMAN	Proteína de unión del nucleótido guanina, subunidad
60	alfa–	15
	Chrm3	Receptor colinérgico, muscarínico 3, cardíaco
	Activación de la fosfolipasa C	
65		

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	Galpha49B	Galpha49B
	Gbeta76C	Gbeta76C
	043431	No disponible
10	095977	Receptor unido a la proteína G putativa, precursor
	EDG6	
15	CAL0_HUMAN	Precursor de la calcitonina [contiene: calcitonina; catacalcina
	CAL1_HUMAN	Precursor del péptido I relacionado con el gen de la
20	C5AR_HUMAN	Receptor quimiotáctico de la anafilatoxina C5a
	GBQ_DROME	Proteína de unión del nucleótido guanina G(q),
25	subunidad	alfa
	ET1 R_HUMAN	Precursor del receptor de la endotelina-1
	GBB2_DROME	Proteína de unión del nucleótido guanina, subunidad
30	beta-	2
	GB15_HUMAN	Proteína de unión del nucleótido guanina, subunidad
35	alfa-	15
	CALR_HUMAN	Precursor del receptor de la calcitonina
	GASR_HUMAN	Receptor de la gastrina/colecistocinina de tipo B
40	V1AR_HUMAN	Receptor de la vasopresina V1a
	V1BR_HUMAN	Receptor de la vasopresina V1b
	GBQ_HUMAN	Proteína de unión del nucleótido guanina G(q),
45	subunidad	alfa
	PIB2_HUMAN	1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato-fosfo-diesterasa beta
	2 EDG2_HUMAN	Receptor Edg-2 del ácido lisofosfatídico
50	Edg-2 Q9I7C8	Proteína G alfa 49B
	Q9NYK7	Receptor de CCK-B/gastrina
55	Q9TXA4	Subunidad alfa Q de la proteína G transductora de
	señales	
	Q9VW29	Proteína GBETA76C
60	Adra1a	"Receptor adrenérgico, alfa 1a"
	Adcyap1r1	Receptor 1 del polipeptídico 1 de activación de la
65	adenilato	ciclase

ES 2 330 538 T3

	Símbolo del gen* del Servidor	Nombre completo
	<u>Gene Ontology Blast</u>	
5	Activación de la proteína cinasa C	
	PF14_0681 Pfalciparum	diacilglicerol cinasa, putativa
	GBLP_HUMAN	Proteína 12.3 de tipo de subunidad beta de la proteína
10	de	unión del nucleótido guanina
	PIC1_MOUSE	Proteína de unión de PRKCA
	GBLP_HUMAN	Proteína 12.3 de tipo de subunidad beta de la proteína
15	de	unión del nucleótido guanina
	PIC1_RAT	Proteína de unión de PRKCA
20	KPCN_HUMAN	Proteína cinasa C, tipo nu
	ACM1_HUMAN	Receptor de la acetilcolina muscarínica M1
	NEUM_HUMAN	Neuromodulina
25	CAP7_HUMAN	Precursor de la azurocidina
	ET2_HUMAN	Precursor de la endotelina-2
	GBLP_HUMAN	Proteína 12.3 de tipo de subunidad beta de la proteína
30	de	unión del nucleótido guanina
	143F_HUMAN	Proteína 14-3-3 eta
	PIC1_MOUSE	Proteína de unión de PRKCA
35	Q80VC8	Similar a la proteína que interactúa con la cinasa C 1
	Q8C1W2	Proteína que interactúa con la cinasa C 1
40	PIC1_RAT	Proteína de unión de PRKCA
	PIC1_HUMAN	Proteína de unión de PRKCA
	C130010K08Rik	Gen C130010K08 del ADNc de RIKEN
45	Cerk	ceramida cinasa
	Gnb2-rs1	Proteína de unión del nucleótido guanina, beta 2, secuencia relacionada 1
50	F13G24.120	diacilglicerol cinasa 1 (DGK1)
	F17I23.320	Familia de diacilglicerol cinasa
	F18E5.160	Familia de diacilglicerol cinasa
55	F26K10.10	Proteína del domino accesorio de la diacilglicerol (DAG) cinasa
60	F5H14.13	diacilglicerol cinasa, putativa
	K19M13.8	Familia de la diacilglicerol cinasa
	MBK5.25	diacilglicerol cinasa, putativa

65

ES 2 330 538 T3

Símbolo del gen* del Servidor

Gene Ontology Blast

Nombre completo

5	MRI1.5	diacilglicerol cinasa, putativa
	MSF3.11	diacilglicerol cinasa, putativa
	F13G24.120	diacilglicerol cinasa 1 (DGK1)
10	F26K10.10	Proteína del domino accesorio de la diacilglicerol (DAG) cinasa
15	T3F17.26	Familia de la diacilglicerol cinasa
	Receptor de la serotonina, ruta de activación de la fosfolipasa C	
	5-HT1A	5-HT1A
20	5-HT1A	5-HT1A
	5-HT1 B	5-HT1 B
	5-HT1 B	5-HT1 B
25	5HTA_DROME	Receptor 2A de la 5-hidroxitriptamina
	5HTB_DROME	Receptor 2B de la 5-hidroxitriptamina
	Q9V8Q3	CG15113-PA
30	Q9V8Q9	Proteína CG16720
	Htr2b	Receptor 2B de la 5-hidroxitriptamina (serotonina)

35 El símbolo del gen se refiere al símbolo usado en el Servidor Gene Ontology Blast disponible el 25 de mayo de 2005 en http://godatabase.org/cgi-bin/go.cgi?view=blast&session_id=87201075891145.

40 En otra realización más de la invención, el GPCR está unido a una proteína G, tal como G_Q, que activa la fosfolipasa C. Los ejemplos de tales GPCR se ofrecen en la tabla 3.

45 Se pueden usar otros receptores además de los GPCR con la presente invención, por ejemplo, la molécula de la superficie celular puede ser un receptor seleccionado del grupo constituido por los receptores pertenecientes a la familia de los receptores unidos a las proteínas cinasas y los receptores pertenecientes a la familia de las cinasas receptoras.

La familia de los receptores unidos a las proteínas cinasas incluye, por ejemplo, los receptores de las citocinas, los interferones y el HGF. Estos receptores no tienen actividad cinasa intrínseca, sino que están asociados con una cinasa.

50 La activación de los receptores unidos a proteínas cinasas preferidos da como resultado la activación de AP-1, i.e., un aumento de la transcripción desde los genes que comprenden uno o más sitios AP-1 en sus secuencias reguladoras. Esto se cumple concretamente para los receptores activados por una citocina.

55 Las cinasas receptoras son receptores que tienen una actividad cinasa intrínseca. Frecuentemente, dicha actividad puede estar modulada por la asociación de un ligando. La familia incluye, por ejemplo, los receptores de la insulina, NGF, PDGF, FGF, EGF y GH.

60 La activación de las cinasas receptoras preferidas da como resultado la activación de un SRE, i.e., un aumento de la transcripción desde los genes que comprenden uno o más SRE en sus secuencias reguladoras. Esto se cumple concretamente para las cinasas receptoras activadas por hormonas del crecimiento.

El receptor también puede ser un receptor huérfano, i.e., un receptor para el que todavía no se haya identificado un ligando. Los procedimientos de la presente invención también pueden ser útiles para la identificación de los ligandos de receptores huérfanos.

65 La molécula de la superficie celular puede ser, en una realización de la invención, un canal que sea accesible desde la superficie extracelular, tal como un canal transmembrana. Los ejemplos de canales son los canales iónicos, tales como los canales de Ca²⁺.

Respuesta celular

La invención se refiere a procedimientos para identificar compuestos que modulan, tal como, activan o inhiben, una respuesta celular ligada a un sistema indicador. El sistema indicador puede ser cualquiera de los sistemas indicadores descritos más adelante en la presente memoria. Los procedimientos revelados por la presente invención pueden ser usados para identificar compuestos que modifican cualquier respuesta celular, que esté o pueda estar unida a un sistema indicador que genere un resultado detectable. El experto en la técnica entenderá que los procedimientos específicos revelados en la presente memoria pueden ser adaptados a cualquiera de tales respuestas celulares. Más adelante, se describen ejemplos no restrictivos de respuestas celulares.

En una realización particularmente preferida de la invención, la respuesta celular está mediada por una molécula de la superficie celular, por ejemplo, la respuesta celular puede ser la activación de un receptor. Por consiguiente, la respuesta celular puede ser, por ejemplo, la modulación de una ruta de transducción de señales de una célula, tal como la modulación de una ruta de transducción de señales mediada por una molécula de la superficie celular. "Activación de un receptor" pretende significar que el receptor está influido de una manera que activa las señalizaciones secuencia abajo. Por consiguiente, es posible emplear los procedimientos según la presente invención para identificar agonistas o antagonistas de un receptor.

Los ejemplos incluyen:

- Sobre-regulación o infra-regulación del nivel de un miembro de la ruta.
- Reubicación de un miembro de la ruta.
- Formación de complejos entre los miembros de la ruta o entre los miembros de la ruta con otros compuestos celulares.
- Aumento o disminución de la transcripción desde genes regulados por la ruta.
- Modificación mediante, por ejemplo, la fosforilación de un miembro de la ruta.
- Activación o inhibición de una enzima de la ruta.
- Degradación de compuestos celulares debido a la sobre-regulación o la infra-regulación de la ruta.
- Alteración de la secreción de un compuesto.
- Cambio en el flujo iónico.
- Cambios morfológicos.
- Cambio en la viabilidad.

En una realización preferida, la ruta de transducción de señales es una ruta modulada por cualquiera de los receptores descritos en el apartado anterior de la presente memoria. Por consiguiente, la respuesta celular puede ser, por ejemplo, cualquiera de las siguientes:

- Activación de la adenilato ciclasa; i.e. aumento de la actividad de la adenilato ciclasa.
- Aumento de los niveles de AMPc.
- Aumento de la transcripción de genes regulados por un CRE.
- Inhibición de la adenilato ciclasa; i.e. disminución de la actividad de la adenilato ciclasa.
- Disminución de los niveles de AMPc.
- Disminución de la transcripción de genes regulados por un CRE.
- Aumento de la actividad de la fosfolipasa C.
- Aumento del nivel de inositol-1,4,5-trifosfato.
- Aumento de la actividad de la proteína cinasa C (PKC).
- Fosforilación de proteínas, que son fosforiladas por la proteína cinasa C.

ES 2 330 538 T3

La respuesta celular puede ser en una realización la modulación de la actividad transcripcional, tal como, la activación o la reducción de la transcripción de uno o más genes. En concreto, la activación o la reducción de la transcripción de genes regulados por un elemento de respuesta. Dicho elemento de respuesta podría ser, por ejemplo, seleccionado del grupo constituido por CRE, SRE, TRE y AP-1.

Por consiguiente, la respuesta celular también puede ser un aumento o una disminución del nivel de un determinado ARNm en una célula.

El término “regulada mediante un elemento de respuesta” pretende significar que la transcripción está modulada por dicho elemento de respuesta, pero que, sin embargo, hay otros elementos que también pueden modular la transcripción de dicho gen. El término “activación del elemento de respuesta” pretende significar el aumento de la transcripción de los genes regulados por dicho elemento de respuesta y/o asociados operativamente al mismo.

En otra realización de la invención, la respuesta celular es:

- un cambio en el nivel intracelular de un compuesto; o

- un cambio en el nivel de un compuesto en un compartimiento celular específico, por ejemplo, en el citoplasma, en el sistema de Golgi, en el retículo endoplasmático, en los lisosomas, en los endosomas o en el núcleo.

El compuesto puede ser cualquier compuesto, preferiblemente, un compuesto natural. Frecuentemente, el compuesto es un compuesto endógeno a la célula. El compuesto puede ser, por tanto, por ejemplo, una sal, un ión, un nucleótido o un derivado del mismo, un péptido, un sacárido, un lípido o una biomacromolécula. Las biomacromoléculas incluyen, por ejemplo, ARN tal como ARNm, polipéptidos y proteínas. Un ejemplo de un ión es el Ca^{2+} y un ejemplo de un derivado de nucleótido es el AMPc.

En otra realización más de la invención, la respuesta celular es la reubicación de un compuesto. La reubicación puede ser, por ejemplo:

- La concentración de un compuesto que de lo contrario está dispersado por una o más ubicaciones específicas.

- La reubicación desde un compartimiento celular a otro, por ejemplo, la reubicación de la membrana celular al citoplasma.

- La reubicación desde una ubicación localizada dentro de un compartimiento a otra ubicación localizada en el mismo compartimiento.

- La interiorización de un compuesto extracelular.

El compuesto puede ser cualquier compuesto, tal como cualquiera de los compuestos mencionados en el apartado anterior. En una realización preferida, el compuesto, que es reubicado, es una biomacromolécula, tal como ARN, polipéptidos o proteínas. Por ejemplo, el compuesto puede ser un receptor de la superficie celular (receptor). La respuesta celular puede ser, por tanto, la interiorización de dicho receptor o la reubicación de dicho receptor de la membrana celular al citoplasma.

En una realización de la invención, la respuesta celular es un cambio en la actividad de un compuesto, tal como un aumento o una disminución de la actividad de un compuesto. Dicho compuesto puede ser, por ejemplo, una enzima.

En otra realización de la invención, la respuesta celular es un cambio en la fosforilación de un compuesto.

En otra realización de la invención, la respuesta celular es la formación o la alteración de un complejo entre compuestos.

En otra realización de la invención, la respuesta celular es un cambio en la concentración de un compuesto.

La respuesta celular también puede ser la alteración de la secreción de un compuesto, tal como un aumento o una disminución de la secreción de un compuesto. Dicho compuesto podría ser, por ejemplo, una biomacromolécula, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, una hormona, una citocina o similares.

En otra realización de la invención, la respuesta celular es un cambio en el pH de un compartimiento intracelular, por ejemplo, en el citoplasma.

En otra realización más, la respuesta celular es un cambio en un potencial de membrana, por ejemplo, un cambio en el potencial de membrana frente a la membrana celular o frente a la membrana mitocondrial.

En otra realización más de la invención, la respuesta celular es un cambio en la morfología, tal como un cambio en el tamaño o en la forma. La respuesta celular también puede ser un cambio en la viabilidad (p. ej., la apoptosis o la necrosis) en condiciones específicas.

Los procedimientos según la invención también pueden incluir la identificación de compuestos que modulan más de una respuesta celular, tal como 2, por ejemplo, 3, tal como 4, por ejemplo, 5, tal como más de 5 respuestas celulares diferentes. Dichas respuestas celulares pueden ser cualquiera de las respuestas anteriormente citadas.

5 *Sistema indicador*

El sistema indicador para su uso con la presente invención debería ser seleccionado según la respuesta celular en particular. El sistema indicador debería ser capaz de generar un resultado detectable.

10 En algunas realizaciones de la invención, el sistema indicador puede ser idéntico a la respuesta celular. Esto se da particularmente cuando se puede detectar la respuesta celular sin la ayuda de otro sistema indicador, por ejemplo, cuando la respuesta celular es un aumento/una disminución del nivel de un compuesto, una reubicación de un compuesto, un cambio en el potencial de membrana, un cambio del pH, un cambio en la morfología o similares.

15 Por consiguiente, el sistema indicador puede ser un sistema endógeno a dichas células. Por ejemplo, el sistema indicador puede comprender el sistema endógeno que regula el nivel intracelular de un compuesto endógeno. A modo de ejemplo, el sistema indicador puede ser el sistema endógeno de una célula que regula el nivel de Ca^{2+} intracelular.

20 En otro ejemplo, el sistema indicador comprende la ubicación intracelular de un compuesto endógeno.

Sin embargo, el sistema indicador también puede ser heterólogo a la célula, i.e., un sistema indicador que haya sido insertado en la célula, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes.

25 En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es la modulación de la transcripción desde uno o varios genes regulados por un elemento de respuesta, es preferible que el sistema indicador comprenda un ácido nucleico que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta, cuya actividad está modulada por la respuesta celular.

30 En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales, el sistema indicador puede comprender un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta, cuya actividad está modulada por dicha ruta de transducción de señales.

35 Por ejemplo, si la respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales que influye en la actividad de un CRE y/o SER, entonces el sistema indicador puede comprender un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta seleccionado del grupo constituido por elemento de respuesta al AMPc (CRE) y elemento de respuesta al suero (SER). Los ejemplos de tales rutas de transducción de señales incluyen las rutas de transducción de señales moduladas por los GPCR de la familia de la rodopsina o de la familia de la secretina, y por receptores de las proteínas cinasas y receptores pertenecientes a la familia de las cinasas receptoras. A modo de ejemplo: 1) Si la respuesta celular es la activación de una ruta de transducción de señales activada por un GPCR unido a una G_s (véase información anterior de la presente memoria) que estimula la adenilato ciclasa, entonces el sistema indicador puede ser un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un CRE. 45 La activación de dicho GPCR se puede detectar entonces mediante la detección del aumento de los niveles de dicho polipéptido detectable. 2) Si la respuesta celular es la activación de una ruta de transducción de señales activada por un GPCR unido a una G (véase información anterior de la presente memoria) que inhibe la adenilato ciclasa, entonces el sistema indicador puede ser un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un CRE. La activación de dicho GPCR se puede detectar entonces 50 mediante la detección de la disminución de los niveles de dicho polipéptido detectable.

De manera similar, si la respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales que influye en la actividad de un TRE, entonces el sistema indicador puede comprender un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta a ATP (TRE). 55 Los ejemplos son GPCR que están unidos a la activación de la proteína cinasa C, tales como los receptores unidos a Gq (véase información anterior de la presente memoria).

De manera similar, si la respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales que influye en la actividad de un SRE, entonces el sistema indicador puede comprender un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un SRE. Los ejemplos de tales rutas de transducción de señales incluyen las rutas de transducción de señales moduladas por hormonas del crecimiento o citocinas a través de los receptores de proteínas cinasas y los receptores pertenecientes a la familia de las cinasas receptoras.

65 De manera similar, si la respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales que influye en la actividad de un AP-1, entonces el sistema indicador puede comprender un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un AP-1. Los ejemplos de tales rutas de transducción de señales incluyen las rutas de transducción de señales moduladas por citocinas o citocinas

de factores de crecimiento a través de los receptores de proteínas cinasas y los receptores pertenecientes a la familia de las cinasas receptoras.

El polipéptido detectable puede ser cualquier polipéptido detectable. Sin embargo, es preferible que el polipéptido detectable se seleccione del grupo constituido por proteínas fluorescentes y enzimas.

Las proteínas fluorescentes pueden ser, por ejemplo, la proteína verde fluorescente (GFP) y mutantes fluorescentes de la misma, tales como la proteína amarilla fluorescente (YFP) o la proteína fluorescente cianica (CFP). La proteína fluorescente también puede ser un complejo de proteínas, p. ej., un di-ó tetrámero de una proteína fluorescente, tal como la dsRed. Las enzimas pueden ser seleccionadas, por ejemplo, del grupo constituido por luciferasa, CAT, galactosidasa, fosfatasa alcalina y beta-lactamasa.

En una realización de la invención, el sistema indicador puede comprender un resto bioluminescente. Por ejemplo, si la respuesta celular es una reubicación de un compuesto, entonces el sistema indicador puede ser, por ejemplo, dicho compuesto unido a un resto luminiscente, tal como un resto fluorescente. Por consiguiente, por ejemplo, si la respuesta celular es la reubicación de un polipéptido, el sistema indicador puede ser una proteína quimérica constituida por dicho polipéptido y una proteína fluorescente, tal como GFP, YFP o CFP. En una realización preferida, dicho polipéptido puede ser receptor.

En una realización de la invención, el sistema indicador puede detectar la formación de un complejo entre dos proteínas celulares. Esto se puede conseguir, por ejemplo, uniendo un resto bioluminescente, tal como luciferasa, con una proteína, y un resto fluorescente, tal como una proteína fluorescente, con la otra proteína. Es posible detectar la interacción directa entre dos proteínas tras la expresión de las dos proteínas quiméricas a través de la aparición de BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia). Si las dos proteínas están unidas a restos fluorescentes, es posible detectar la formación del complejo mediante la aparición de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). También se puede detectar la formación de complejos usando análisis del centelleo por proximidad.

Por consiguiente, si la respuesta celular es la reubicación de una molécula de la superficie celular, entonces el sistema indicador puede comprender un resto fluorescente unido covalentemente con dicha molécula de la superficie celular.

En algunas realizaciones de la invención, la respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales que implica la activación de la fosfolipasa C. La fosfolipasa C puede ser activada, por ejemplo, por GPCR unidos a C_Q (véase información anterior de la presente memoria). La activación de la fosfolipasa C conduce en general al aumento del nivel del Ca²⁺ intracelular y, por tanto, en tales realizaciones, el sistema indicador puede ser el nivel de Ca²⁺ intracelular. Este sistema indicador puede ser, por tanto, endógeno a la célula.

Resultado detectable

El resultado detectable puede ser cualquier resultado que sea detectable directa o indirectamente. Por ejemplo, el resultado detectable puede ser la concentración de un compuesto en una célula, la ubicación de un compuesto en una célula, la luminiscencia, la actividad de una enzima, o similares.

En realizaciones preferidas de la invención, el resultado detectable es luminiscencia, tal como fluorescencia, bioluminiscencia, FRET o BRET. La bioluminiscencia se puede detectar mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, con la ayuda de un lector de placas. La BRET se puede realizar según lo descrito anteriormente en la presente memoria. En una realización, se usa la tecnología de BRET2, que está basada en la transferencia de energía entre un donante bioluminescente (una proteína de fusión de luciferasa de Renilla (Rluc)) y un aceptor fluorescente (una proteína de fusión de la proteína verde fluorescente (GFP2)). En presencia de su sustrato DeepBlueCTM (un derivado de coelenteracina), Rluc emite luz azul (-395 nm). La interacción proteína-proteína entre las proteínas de fusión Rluc y GFP2 permite la transferencia de energía hacia GFP2, que vuelve a emitir luz verde (510 nm). La expresión sólo de Rluc, en presencia del sustrato DeepBlueCTM, proporciona un espectro de emisión con un máximo en ~395 nm (línea continua). Con el constructo de fusión Rluc:GFP2, hay una transferencia de energía eficaz entre Rluc y GFP2, y la señal de 510 nm representa un máximo principal (línea discontinua). La señal de BRET2 se expresa como la proporción entre 515 nm y 410 nm, pues para la detección se usan filtros centrados a aquellas longitudes de onda. La tecnología de FRET se basa en la transferencia de energía dependiente de la distancia entre dos grupos de fluorescencia que están cada uno unido a una proteína.

Alternativamente, el resultado detectable puede estar unido preferiblemente (directa o indirectamente) a una señal bioluminiscente.

Sin embargo, el resultado detectable también podría ser radiactividad, un compuesto coloreado o una señal de color, un metal pesado, un potencial eléctrico, un potencial redox o una temperatura, o el resultado detectable puede estar unido a una señal radiactiva, un compuesto coloreado o una señal de color o un metal pesado o un potencial eléctrico o un potencial de redox o una temperatura. Dicha señal radiactiva podría ser, por ejemplo, ³⁵S, ³²P, ³H. El compuesto coloreado podría ser, por ejemplo, el producto de cualquiera de las reacciones enzimáticas descritas en otra parte de la presente memoria. El metal pesado podría ser, por ejemplo, oro.

En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es un cambio en el nivel intracelular de un compuesto o un cambio en el nivel de un compuesto dentro de un compartimiento celular específico, entonces el resultado detectable puede ser dicho nivel de dicho compuesto. En función de la naturaleza del compuesto, dicho nivel puede ser detectado directa o indirectamente.

Si, por ejemplo, el compuesto es un compuesto fluorescente, el nivel de dicho compuesto se puede determinar mediante la determinación de las propiedades de fluorescencia. Esto se puede hacer mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, con la ayuda de un microscopio de fluorescencia, un FACS (Clasificador de células activadas por fluorescencia), un FABS (clasificador de perlas activadas por fluorescencia), un lector de placas de fluorescencia o un espectrómetro de fluorescencia.

Si, por ejemplo, el compuesto es una enzima, entonces el nivel de dicho compuesto se puede determinar mediante la determinación de la actividad de dicha enzima. A modo de ejemplo, si la enzima cataliza una reacción que conduce a un producto que es detectable directamente, por ejemplo, mediante técnicas de detección colorimétricas o quimioluminiscentes, la actividad de dicha enzima puede ser detectada mediante la detección de dicho compuesto. Por ejemplo, si la enzima es la luciferasa, es posible detectar la actividad de dicha enzima detectando la emisión de luz tras la oxidación del sustrato añadido, la luciferina.

Hay otras varias enzimas, tales como CAT, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y betalactamasa que, cuando se proporcionan con sustratos adecuados, son capaces de catalizar reacciones que conducen a productos coloreados o quimioluminiscentes, que pueden ser detectados usando cualquier técnica de detección colorimétrica o quimioluminiscente.

Si el compuesto es, por ejemplo, Ca^{2+} , entonces es posible medir la concentración intracelular de dicho ión usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, insertando en las células compuestos fluorescentes de unión con el Ca^{2+} como Fura-2, Fluo-3 o Fluo-4 (Molecular Probes), que cambian las propiedades fluorescentes según una concentración de Ca^{2+} cambiada. En los ejemplos 13 y 13a que se presentan más adelante en la presente memoria, se ofrecen ejemplos no restrictivos de procedimientos para determinar el Ca^{2+} libre citosólico. Es posible controlar las concentraciones de otros iones usando los compuestos fluorescentes adecuados que, por ejemplo, están disponibles en Molecular Probes Inc.

Si el compuesto es, por ejemplo, una proteína, entonces puede ser detectada, por ejemplo, usando una primera pareja de unión específica. Dicha primera pareja de unión específica podría ser una segunda proteína capaz de interactuar específicamente con dicha proteína, tal como un anticuerpo específico, o dicha primera pareja de unión específica podría ser un aptámero. Dicha primera pareja de unión específica podría estar conjugada con un compuesto directamente detectable, tal como un compuesto fluorescente, un compuesto radiactivo o un metal pesado, o con un compuesto indirectamente detectable, tal como una enzima, que podría ser, por ejemplo, cualquiera de las enzimas mencionadas anteriormente en la presente memoria. También es posible que la primera pareja de unión específica pueda ser detectada con una segunda pareja de unión específica capaz de interactuar específicamente con la primera pareja de unión específica. Dicha segunda pareja de unión específica puede estar conjugada con un compuesto directa o indirectamente detectable de manera similar a la primera pareja de unión específica. Se pueden usar más parejas de unión específicas.

En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es una reubicación de un compuesto, el resultado detectable podría ser un marcador detectable conjugado con dicho compuesto. En concreto, el compuesto puede estar conjugado con un marcador directamente detectable, tal como un marcador fluorescente o un metal pesado. De este modo, la ubicación del compuesto se puede detectar directamente, por ejemplo, usando un microscopio de fluorescencia, un lector de placas fluorescentes, un espectrómetro de fluorescencia, un instrumento FACS o FABS. En una realización preferida, el compuesto es una proteína de fusión que comprende una proteína de interés y una proteína fluorescente, tal como GFP. El compuesto puede ser, por tanto, una sonda fluorescente. De este modo, el resultado detectable puede ser la ubicación de una señal fluorescente. Alternativamente, el compuesto es una proteína de fusión que comprende la proteína de interés y una etiqueta. Dicha etiqueta podría ser una etiqueta que interactúe específicamente con una pareja de unión específica, por ejemplo, la etiqueta podría ser una etiqueta de HA o un dominio de flash. Alternativamente, es posible determinar la ubicación de un compuesto con la ayuda de una pareja de unión específica según lo explicado resumidamente con anterioridad. También se puede detectar la ubicación intracelular usando procedimientos capaces de detectar la distancia entre dos compuestos, por ejemplo, un procedimiento de BRET o de FRET.

En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es un cambio de la actividad de un compuesto, el resultado detectable puede ser un producto de dicha actividad. i.e., cuando dicho compuesto es una enzima, el resultado detectable podría ser un producto de una reacción catalizada por dicha enzima. Dicho producto podría ser, por tanto, un producto coloreado o un producto quimioluminiscente según lo tratado anteriormente en la presente memoria.

En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es un aumento o una reducción de la transcripción desde uno o más genes, entonces la respuesta celular podría ser ARNm transcrito desde dicho gen, una proteína codificada por dicho gen o, en el caso de que la proteína sea una enzima, el resultado detectable podría ser un producto de una reacción catalizada por dicha enzima. La enzima y los productos podrían ser cualquiera de las enzimas o de los productos tratados anteriormente en la presente memoria.

El ARNm puede ser detectado mediante cualquier procedimiento útil, por ejemplo, con la ayuda de una sonda capaz de hibridarse específicamente con dicho ARNm. Dicha sonda podría estar marcada con un marcador directamente detectable, por ejemplo, un compuesto radiactivo, un compuesto fluorescente o un metal pesado, o un marcador indirectamente detectable, tal como una enzima o una pareja de unión específica.

Dicha proteína puede ser detectada con la ayuda de parejas de unión específicas según lo explicado resumidamente anteriormente en la presente memoria. Sin embargo, en una realización preferida, la proteína es una proteína fluorescente, y puede ser detectada directamente. Por consiguiente, el resultado detectable podría ser bioluminiscencia, tal como fluorescencia.

En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es una modificación hecha, por ejemplo, mediante la fosforilación de un compuesto, ésta se puede detectar mediante la unión de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína fosforilada, pudiendo luego ser dicho anticuerpo cuantificado mediante un marcaje de fluorescencia específico. En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es un cambio en el pH en un compartimiento intracelular, el resultado detectable será, en general, dicho pH. El pH se puede determinar usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, usando un indicador del pH o un peachímetro. Es posible determinar el pH, por ejemplo, usando un indicador fluorescente del pH intracelular. Los compuestos adecuados son compuestos con un perfil de excitación fluorescente que depende del pH, tal como BCECF (disponible en Molecular Probes). En realizaciones de la invención en las que la respuesta celular es un cambio en un potencial de membrana, el resultado detectable será, en general, dicho potencial de membrana. El potencial de membrana se puede determinar usando cualquier procedimiento adecuado, tal como aplicando una molécula fluorescente a células que se distribuyan sobre la membrana en función del potencial de membrana. Los ejemplos de tales compuestos son los DiBAC, diversos colorantes ANEP, JC-1 y JC-9 (Molecular Probes). Por ejemplo, JC-1 y JC-9 con colorantes catiónicos que presentan una acumulación dependiente del potencial en la mitocondria que conduce a un desplazamiento en la emisión de la fluorescencia de verde a roja. Por lo tanto, es posible determinar la despolarización mitocondrial, por ejemplo, mediante la disminución de la proporción entre la intensidad de fluorescencia roja y verde (véase también la información del producto de Molecular Probes). Los colorantes ANEP son particularmente útiles para la detección de los cambios en el potencial de membrana. La fluorescencia se puede leer, por ejemplo, con un microscopio de fluorescencia, un lector de placas de fluorescencia, un instrumento FACS o un instrumento FABS.

En una realización de la invención en la que la respuesta celular es un cambio en la morfología, el resultado detectable será, en general, la morfología de la célula. Es posible observar la morfología usando cualquier procedimiento adecuado como, por ejemplo, con la ayuda de un microscopio, usando un FACS o un FABS.

En función del resultado detectable, frecuentemente, será una ventaja fijar las células antes de detectar dicho resultado detectable. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, es preferible que las células no estén fijadas. Es posible fijar las células según cualquier protocolo útil (véanse también las definiciones anteriores de la presente memoria).

40 Selección

Los procedimientos según la invención implican el rastreo de perlas de resina en busca de las perlas que comprenden células que cumplen al menos un criterio de selección predeterminado, estando dicho criterio de selección ligado directa o indirectamente a dicho resultado detectable. Por consiguiente, el criterio de selección dependerá del resultado detectable.

Por ejemplo, el criterio de selección predeterminado puede ser un criterio cuantitativo, tal como un nivel cuantitativo de la bioluminiscencia por encima o por debajo de un valor umbral específico.

En realizaciones de la invención en las que el resultado detectable es la fluorescencia o el resultado detectable puede estar ligado a una señal fluorescente, entonces el criterio de selección predeterminado podría ser cualquier propiedad de fluorescencia. Por ejemplo, el criterio de selección podría ser la intensidad de dicha fluorescencia por encima o por debajo de un valor umbral predeterminado o la emisión de luz de una longitud de onda específica, o la absorción de luz de una longitud de onda específica o la intensidad de luz emitida de una longitud de onda específica por encima o por debajo de un valor umbral predeterminado. El criterio de selección podría también estar basado en la duración de la fluorescencia y/o en la polarización de la fluorescencia. El criterio de selección también podría ser una ubicación específica de la señal fluorescente, tal como la intensidad de una señal fluorescente en un compartimiento celular específico por encima o por debajo de un valor umbral predeterminado. El criterio de selección también podría ser un cambio predeterminado en la duración de la fluorescencia o en la polarización de la fluorescencia. La intensidad y/o la ubicación de la fluorescencia pueden ser determinadas, por ejemplo, usando un procesamiento de imágenes y/o un análisis de imágenes, un microscopio de fluorescencia, un FACS, un FABS o un lector de placas de fluorescencia.

En una realización de la invención, el criterio de selección es una intensidad de fluorescencia alta. Este puede ser el caso, por ejemplo, en el que la respuesta celular es la activación de una ruta de transducción de señales y el sistema indicador comprende un gen que codifica una proteína fluorescente, conduciendo la activación de la ruta de transducción de señales al aumento de la expresión de dicho gen. Las perlas de resina se pueden seleccionar usando un procedimiento que comprende las etapas de:

ES 2 330 538 T3

1. Determinar la intensidad de la fluorescencia de las perlas de resina del control positivo y establecer esta intensidad de fluorescencia como el 100%.
2. Determinar la intensidad de la fluorescencia de las perlas de resina del control negativo y establecer esta intensidad de fluorescencia como el 0%.
3. Seleccionar perlas de resina que tengan una intensidad de fluorescencia correspondiente al menos al 5%, preferiblemente, al menos al 10%, más preferiblemente, al menos al 20%, incluso más preferiblemente, al menos al 30%, tal como al menos al 40%, por ejemplo, al menos al 50%, tal como al menos al 60%, por ejemplo, al menos al 70%, tal como al menos al 80%, por ejemplo, al menos al 90%, tal como en el intervalo del 5 al 100%, por ejemplo, en el intervalo del 10 al 100%, tal como en el intervalo del 20 al 100%, por ejemplo, en el intervalo del 30 al 100%, tal como en el intervalo del 40 al 100%, por ejemplo, en el intervalo del 50 al 100%.

El control positivo puede ser, por ejemplo, una perla de resina (u opcionalmente, varias perlas de resina conservadas en un recipiente o pocillo separado) que comprenda un compuesto conocido por su influencia en la respuesta celular. A modo de ejemplo, si la respuesta celular es la activación de una ruta de transducción de señales mediante un receptor de la superficie celular, entonces el control positivo puede ser una perla de resina que comprende un ligando conocido de dicho receptor, por ejemplo, un ligando natural. El control negativo puede ser una perla de resina (u opcionalmente, varias perlas de resina conservadas en un recipiente o pocillo separado) que comprenda opcionalmente un compuesto de adhesión celular, pero que sin embargo no comprenda ningún miembro del banco ni otro compuesto de prueba.

En otra realización del criterio de selección, éste es una fluorescencia baja. Este puede ser el caso, por ejemplo, en el que la respuesta celular es la inhibición de una ruta de transducción de señales y el sistema indicador comprende un gen que codifica una proteína fluorescente, conduciendo una ruta de transducción de señales activa a la expresión de dicho gen. Las perlas de resina se pueden seleccionar usando un procedimiento que comprende las etapas de:

1. Determinar la intensidad de la fluorescencia de las perlas de resina del control positivo y establecer esta intensidad de la fluorescencia como el 0%.
2. Determinar la intensidad de la fluorescencia de las perlas de resina del control negativo y establecer esta intensidad de la fluorescencia como el 100%.
3. Seleccionar perlas de resina que tengan una intensidad de la fluorescencia correspondiente al menos al 5%, preferiblemente, al menos al 10%, más preferiblemente, al menos al 20%, incluso más preferiblemente, al menos al 30%, tal como al menos al 40%, por ejemplo, al menos al 50%, tal como al menos al 60%, por ejemplo, al menos al 70%, tal como al menos al 80%, por ejemplo, al menos al 90%, tal como en el intervalo del 5 al 100%, por ejemplo, en el intervalo del 10 al 100%, tal como en el intervalo del 20 al 100%, por ejemplo, en el intervalo del 30 al 100%, tal como en el intervalo del 40 al 100%, por ejemplo, en el intervalo del 50 al 100%.

El control positivo puede ser, por ejemplo, una perla de resina (o perlas de resina) que comprenda un compuesto conocido por su influencia en la respuesta celular. A modo de ejemplo, si la respuesta celular es la inhibición de una ruta de transducción de señales mediante un receptor de la superficie celular, entonces el control positivo puede ser una perla de resina que comprende un antagonista conocido de dicho receptor. El control negativo puede ser una perla de resina (o perlas de resina) que comprenda opcionalmente un compuesto de adhesión celular, pero que sin embargo no comprenda ningún miembro del banco ni otro compuesto de prueba.

En la figura 1A, se ilustra un procedimiento de selección de perlas de resina usando un FABS.

En una realización preferida, la selección se realiza manualmente con la ayuda de un microscopio de fluorescencia. En esta realización, la intensidad de la fluorescencia u otras propiedades de fluorescencia son determinadas manualmente.

Cuando el criterio de selección es la intensidad de la fluorescencia de la ubicación, las perlas de resina también se pueden analizar usando un lector de placas o una adquisición de imágenes.

Si el criterio de selección es la ubicación, las perlas de resina son analizadas generalmente mediante un microscopio de fluorescencia o de generación de imágenes. Dicho microscopio puede estar dotado opcionalmente de un micromanipulador capaz de recoger las perlas individuales. Se rastrean las perlas de resina en busca de las células en las que la señal de fluorescencia está ubicada en la ubicación intracelular deseada, y se seleccionan estas perlas de resina. La selección puede ser manual o automática.

En realizaciones de la invención en las que el resultado detectable es la emisión de luz, o el resultado detectable puede estar ligado a una señal de luz, entonces el criterio de selección predeterminado podría ser cualquier propiedad de la luz. Por ejemplo, el criterio de selección podría ser la intensidad de la luz por encima o por debajo de un valor umbral predeterminado. La luz se puede detectar, por ejemplo, a ojo, en un microscopio y, si la luz es emitida mediante bioluminiscencia, se puede medir con un luminómetro.

En las realizaciones de la invención en las que el resultado detectable es una señal radiactiva o el resultado detectable puede estar ligado a una señal radiactiva, entonces el criterio de selección podría ser cualquier propiedad de dicha señal radiactiva, tal como la intensidad por encima o por debajo de un valor umbral predeterminado o la ubicación de la señal radiactiva.

En realizaciones de la invención en las que el resultado detectable es una señal de color, o el resultado detectable puede estar ligado a una señal de color, entonces el criterio de selección podría ser cualquier propiedad de dicha señal de color. Por ejemplo, el criterio de selección predeterminado podría ser una intensidad del color por encima o por debajo de un valor umbral específico, o podría ser un color específico. La señal de color podría ser detectada usando cualquier procedimiento colorimétrico adecuado, tal como un espectrofotómetro.

Se seleccionan las perlas de resina que comprenden células que cumplen al menos un criterio de selección, tal como cualquiera de los criterios de selección anteriormente mencionado en la presente memoria. En ciertas realizaciones de la invención, se seleccionan las perlas de resina que comprenden células que cumplen al menos dos, por ejemplo, 2, tal como 3, por ejemplo, 4, tal como en el intervalo de 5 a 10, por ejemplo, en el intervalo de 10 a 25 criterios de selección.

También es posible en la presente invención seleccionar las perlas de resina que comprenden células que cumplen uno o más criterios de selección predeterminados y, posteriormente, someter dichas perlas a una o más series de selección adicionales, en las que se seleccionan las perlas de resina que comprenden células que cumplen uno o más de los criterios de selección adicionales.

Las perlas de resina que cumplen dicho al menos un criterio de selección predeterminado pueden ser seleccionadas mediante clasificación manual, por ejemplo, con la ayuda de un microscopio, por ejemplo, mediante la clasificación por fluorescencia o por el color o por la morfología en función del resultado detectable y del criterio de selección. Las perlas positivas se pueden recoger directamente bajo el microscopio, tal como bajo un microscopio de fluorescencia, por ejemplo, manualmente o con la ayuda de un micromanipulador. Frecuentemente, se pueden colocar en el intervalo de 100 a 1.000.000, por ejemplo, en el intervalo de 1.000 a 100.000, tal como en el intervalo de 5.000 a 50.000 perlas de resina sobre una superficie adecuada, tal como sobre una placa o un cubreobjeto y, posteriormente, examinarlas al microscopio. Alternativamente, es posible automatizar el procedimiento de clasificación con el uso de clasificadores de perlas comercialmente disponibles especialmente diseñados (Union Biometrica, Sommerville, Mass.), y detectar, por ejemplo, la intensidad de la fluorescencia (Meldal, 2002, *Biopolymers*, 66: 93-100). En general, se pueden clasificar las perlas de resina a una velocidad de aproximadamente 100 perlas por segundo, o incluso más rápidamente en función del equipo usado y de su capacidad de lectura. Generalmente, con los instrumentos conocidos, se usa un intervalo de aproximadamente 5-30 perlas por segundo. Se pueden usar velocidades más bajas para aumentar la exactitud, sin embargo, con la presente invención, es posible usar cualquier velocidad adecuada, tal como velocidades mucho mayores. Se prefiere una velocidad en la que sólo pase una perla de resina cada vez por el detector. También está englobado en la presente invención seleccionar las perlas de resina usando un lector de placas. En general, se colocan en el intervalo de 1 a 1.000, tal como, de 10 a 500, por ejemplo, de 50 a 100 perlas de resina en cada pocillo de una placa de multivaloración y se analizan. Entonces, se pueden seguir examinando las perlas de los pocillos positivos.

En una realización de la invención, es posible seleccionar las perlas de resina mediante la comparación del resultado detectable con el resultado detectable generado por las perlas de resina del control, por ejemplo, las perlas de resina del control positivo y/o negativo. Las perlas de resina del control positivo son perlas que comprenden un compuesto capaz de inducir la respuesta celular deseada, mientras que las perlas de resina del control negativo no comprenden tal compuesto. A modo de ejemplo, si la respuesta celular es la activación de un receptor de la superficie celular con un ligando natural conocido, la perla de resina del control positivo puede comprender dicho ligando, mientras que la perla de resina del control negativo no comprende ningún compuesto, a excepción de que comprenda opcionalmente un compuesto de adhesión celular.

Si el resultado detectable es una señal cuantificable, entonces es posible seleccionar las perlas de resina que comprenden células en las que el resultado detectable es mayor o menor que el resultado detectable de las células unidas a la perla de resina del control positivo o negativo. A modo de ejemplo, si el resultado detectable es la intensidad de la fluorescencia, entonces se podrían seleccionar, por ejemplo, las perlas de resina que comprenden células que presentan una intensidad de la fluorescencia que es mayor que la del control negativo e inferior que la del control positivo.

En las figuras 1 y 2, se ilustran ejemplos no restrictivos de los procedimientos de selección de perlas de resina.

Identificación del compuesto

Una vez seleccionada una perla de resina, es posible identificar el compuesto de dicha perla. Preferiblemente, se usa sólo una perla de resina cada vez. Por lo tanto, si dicha perla de resina sólo comprende un miembro del banco en una o más copia, entonces sólo se identifica un compuesto cada vez.

El procedimiento para la identificación del miembro del banco depende del tipo de banco usado. Para un banco de compuestos fundamentalmente oligoméricos, el miembro del banco puede ser analizado mediante espectroscopia de masas (EM), particularmente, si el banco fue sintetizado de tal modo se captura el historial sintético del compuesto,

por ejemplo, usando un procedimiento de colocación de casquete para generar fragmentos del compuesto que difieren en la masa de un elemento constitutivo (véase, por ejemplo, Youngquist *et al.*, 1995, *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 3900-06). Este procedimiento de colocación de casquetes es más eficaz cuando se hacen reaccionar el casquete y el elemento constitutivo a la vez. El agente de colocación del casquete puede ser cualquier clase de compuesto que tenga al menos un grupo funcional en común con el elemento constitutivo usado para generar el oligómero, tal que tanto el agente de colocación del casquete como el elemento constitutivo puedan reaccionar al ser añadidos a la resina en una proporción adecuada. Alternativamente, el agente de colocación del casquete puede tener dos grupos funcionales en común con el elemento constitutivo en el que uno de los grupos en común, tal como el grupo del elemento constitutivo que se usa para la prolongación del oligómero, esté protegido ortogonalmente. Por ejemplo, en una síntesis de un péptido usando una estrategia con Fmoc, el agente de colocación del casquete podría ser el mismo que el del elemento constitutivo, pero con un grupo Boc que protegiera la amina reactiva en lugar del grupo Fmoc (véase St. Hilaire *et al.*, 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 13312-13320). En otro ejemplo, si el elemento constitutivo es una haloamina protegida, el agente de colocación del casquete podría ser el correspondiente alquilhaluro.

Cuando el banco es sintetizado mediante síntesis en paralelo (un alineamiento paralelo), es posible identificar el compuesto simplemente mediante el conocimiento de qué componentes de reacción específicos se hicieron reaccionar en un determinado compartimiento. Es posible confirmar la estructura mediante la escisión de una pequeña parte del compuesto del soporte sólido y su análisis usando procedimientos habituales de Química Analítica, tales como análisis de infrarrojos (IR), resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de masas (EM) y análisis elementales. Para una descripción de diversos procedimientos analíticos útiles en la Química Combinatoria, véase: Fitch, 1998-99, *Mol. Divers.*, 4: 39-45; y "Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry", M.E. Swartz (Ed), 2000, Marcel Decker: Nueva York.

Sin embargo, en una realización preferida, el banco ha sido sintetizado mediante un enfoque de división-mezcla en el que se desconoce la estructura exacta del compuesto de una perla específica. En esta realización, se puede identificar el miembro del banco usando una variedad de procedimientos. Se puede escindir el compuesto de la perla de resina y luego analizarlo usando IR, EM o RMN. Si el banco está unido a la perla de resina mediante un ligador escindible, entonces el compuesto puede ser escindido mediante la escisión de dicho ligador escindible. Para el análisis de RMN, se usan preferiblemente perlas más grandes que contienen aproximadamente 5 nmoles de material para la adquisición de espectros de RMN monodimensionales (1-D) y bidimensionales (2-D). Además, estos espectros se pueden conseguir usando técnicas de RMN-MAS (resonancia magnética nuclear de rotación al ángulo mágico) de alta resolución. Alternativamente, se pueden adquirir espectros de RMN-MAS de alta resolución cuando el ligando todavía está unido al soporte sólido, según lo descrito, por ejemplo, en Gottfredsen *et al.*, 2000, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1: 1167-71. También se puede identificar el compuesto mediante la liberación del compuesto y la fragmentación mediante EM/EM en el modo MALDI o de electrospray.

Frecuentemente, las perlas de resina usadas para la síntesis de bancos contienen aproximadamente de 100 a 500 pmoles de material, lo que generalmente es suficiente para el análisis directo usando técnicas de RMN. En tales situaciones, los bancos se pueden sintetizar con una codificación especial para facilitar la identificación del miembro del banco. Para consultar las estrategias de codificación empleadas en Química Combinatoria, véase: Barnes *et al.*, 2000, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4: 346-50. La mayoría de las estrategias de codificación incluyen la síntesis en paralelo de la molécula codificante (por ejemplo, ADN, ANP o péptido) junto con los compuestos del banco. Esta estrategia requiere un esquema de los grupos protectores ortogonales bien planificado y que requiere su tiempo. Además, la propia molécula codificante a veces puede influir en la célula, lo que conduce a falsos positivos. Alternativamente, es posible codificar los miembros del banco usando etiquetas de radiofrecuencia o usando una codificación óptica, tal como la codificación de puntos cuánticos, la codificación esférica o la codificación de distancias. Estos procedimientos palian el problema de los falsos positivos surgidos a raíz de las etiquetas de codificación, pero generalmente son sólo útiles para bancos pequeños en un sistema de un compuesto por perla debido a la pura voluminosidad de la etiqueta de radiofrecuencia. Alternativamente, las perlas individuales se pueden analizar de un modo no destructivo usando generación de imágenes infrarrojas. Este procedimiento aporta información limitada y aunque es útil para el pre-rastreo, no está recomendado para obtener una determinación estructural concluyente.

En una realización preferida de la invención el o los miembros del banco comprendidos en las perlas de resina seleccionadas se identifican usando espectrometría de masas (EM). Es posible usar sólo la EM para identificar el miembro del banco. Se puede escindir el miembro del banco de la perla de resina, determinar la masa molecular y, posteriormente, fragmentarlo en subespecies para determinar la estructura de forma concluyente. Los procedimientos de identificación de compuestos basados en la EM son útiles en esta invención, pues requieren muy poco material, y pueden utilizar cantidades pico- a fento-molares del compuesto. Los procedimientos basados en la EM incluyen, por ejemplo, EM/EM Q-TOF, EM/EM o CL/EM-EM Q-TOF.

Tras la identificación del compuesto, puede ser deseable confirmar la actividad de dichos compuestos mediante más análisis *in vitro* y/o *in vivo*. Por ejemplo, se pueden sintetizar perlas de resina que comprenden el compuesto identificado y, opcionalmente, un compuesto de adhesión, y confirmar la respuesta celular. También es posible analizar los compuestos identificados en análisis *in vitro* en ausencia de perlas. Las células se pueden cultivar, por ejemplo, directamente en una placa de cultivo tisular, un matraz o un cubreobjeto, y se puede añadir el compuesto identificado directamente al medio de dichas células. Si hay disponibles varios sistemas indicadores para la respuesta celular concreta, entonces se pueden analizar, preferiblemente, varios análisis de indicadores diferentes *in vitro* para identificar los compuestos muy útiles. Por ejemplo, la inducción de una ruta de transducción de señales mediante un receptor

unido a la proteína G frecuentemente implica la interiorización del receptor unido a la proteína G, así como una respuesta transcripcional. Se pueden analizar, por tanto, los sistemas indicadores tanto para la interiorización como para la transcripción.

5 Multiplexación

Los procedimientos revelados por la presente invención también se pueden usar en procedimientos de multiplexación.

10 Por ejemplo, se pueden usar los procedimientos para identificar los compuestos que modifiquen al menos dos respuestas celulares, tal como 2, por ejemplo, 3, tal como 4, por ejemplo, en el intervalo de 5 a 10, tal como en el intervalo de 10 a 25 respuestas celulares.

15 En tales procedimientos, la etapa c) del procedimiento explicado resumidamente con anterioridad (véase el apartado de "Resumen de la invención") implica, preferiblemente, el rastreo de perlas de resina en busca de perlas que comprenden células que cumplen al menos dos, tal como 2, por ejemplo, 3, tal como 4, por ejemplo en el intervalo de 5 a 10, tal como en el intervalo de 10 a 25 criterios de selección predeterminados, estando preferiblemente cada criterio de selección ligado a un resultado detectable diferente.

20 En tal procedimiento, se puede unir más de una clase de célula a cada perla de resina y se pueden detectar las diferentes respuestas celulares en las diferentes clases de células. Por ejemplo, se pueden unir a una sola perla una primera línea celular que comprende un primer sistema indicador ligado a una primera respuesta celular y una segunda línea celular que comprende un segundo sistema indicador ligado a una segunda respuesta celular y, opcionalmente, una o varias líneas celular más que comprenden uno o varios sistemas indicadores más ligados a una o varias respuestas celulares más. Entonces se pueden seleccionar las perlas de resina que comprenden células que cumplen los criterios de selección ligados a todos los sistemas indicadores diferentes.

30 En función de los resultados detectables, es posible determinar dicho resultado detectable usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente en la presente memoria. En una realización preferida, al menos dos resultados detectables son resultados fluorescentes, preferiblemente, de diferente excitación y/o emisión. Por lo tanto, las perlas de resina que cumplen dichos al menos dos criterios de selección se pueden seleccionar en una etapa usando un FABS con al menos 2 canales tanto en excitación como en emisión. De manera similar, se pueden seleccionar más de dos propiedades fluorescentes diferentes en un FABS adecuado. Los al menos dos resultados detectables pueden estar en la misma línea celular o pueden estar en líneas celulares diferentes.

35 En las figuras 2A y 2B, se ilustran ejemplos de procedimientos de multiplexación.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Rastreo del banco de péptidos de adhesión

45 Se mezclaron aprox. 100 perlas del banco de péptidos de adhesión con 1×10^6 células (BHK, CHO, U2OS, Hek) en cada pocillo de una placa de 12 pocillos Falcon usando 2 ml de medio de crecimiento. El banco de péptidos de adhesión se preparó usando el procedimiento general para la unión de aminoácidos explicado resumidamente en el ejemplo 5 que figura a continuación, e implicó:

- 50 - La unión del ligador de HMBA con resina PEGA
- La unión del aminoácido con el ligador de HMBA
- 55 - La unión mediante SPPS.

60 El banco estaba constituido por heptámeros de D-aminoácidos. Las perlas del banco de péptidos eran perlas de PEGA, cada una unida a un posible péptido de adhesión. Se mezclaron las células y las perlas suavemente cada 15 min durante 2 h. Se retiró el sobrenadante con células no unidas y se añadió nuevo medio de crecimiento. Se incubaron las células/perlas durante otras 16 horas. (37°C; CO₂ al 5%). Se identificaron las perlas adhesivas con células usando un microscopio con un objetivo x10, y se transfirieron las perlas positivas a un papel de filtro (para absorber el medio). Los péptidos fueron identificados mediante una secuenciación de aminoácidos. Los ejemplos de los péptidos útiles se ofrecen en la tabla 2.

65

ES 2 330 538 T3

Ejemplo 1a

Identificación de un péptido de adhesión con propiedades de baja absorción de componentes fluorescentes del medio de crecimiento y alta adhesión

Se sintetizó un banco de péptidos D-amino de adhesión (500.000 miembros) según lo descrito anteriormente en el ejemplo 1 y se rastrearon las propiedades de baja fluorescencia/alta adherencia. Esto se hizo en 4 etapas:

- 1) Selección de perlas poco fluorescentes mediante Clasificación de Perlas Activadas por Fluorescencia (FABS). Se clasificó mediante FABS el banco de péptidos de adhesión de 500.000 miembros y se aislaron 150.000 perlas poco fluorescentes.
- 2) Selección de perlas con buenas propiedades de adhesión celular. Se incubaron las 150.000 perlas poco fluorescentes con células U2OS que expresaban la GFP, tras lo que se realizó una clasificación FABS para alta fluorescencia (adhesión celular elevada). Se aislaron 536 perlas.
- 3) Identificación y aislamiento de perlas con propiedades de alta adherencia a células Hek293. Se aclararon las 536 perlas de células U2OS y se incubaron con células Hek293 que expresaban la GFP. Se aislaron 47 perlas con propiedades de alta adhesión celular usando un microscopio de fluorescencia.
- 4) Dilucidación de la secuencia y re-síntesis de los péptidos seleccionados. Se secuenciaron 22 péptidos y seis de ellos fueron sintetizados de nuevo. En base a la estructura-actividad de los seis péptidos, se sintetizaron cuatro más (AP-7 y AP-10). El péptido definido por SEC ID N.º 35 mostró el mejor rendimiento global.

En el ejemplo 5, apartado "Síntesis de péptido de adhesión", se describe un ejemplo de un procedimiento para preparar una perla de resina que comprende un péptido de adhesión útil.

Ejemplo 2

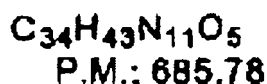
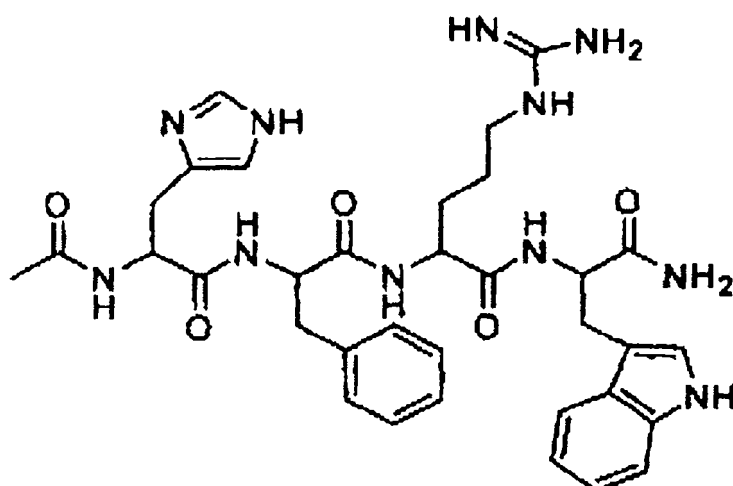
Este ejemplo describe la preparación de perlas de resina que comprenden His-(D)phe-Arg-Trp. Estas perlas son útiles, por ejemplo, como control positivo para los procedimientos de identificación de compuestos que modulan una respuesta celular mediada a través del receptor de la melanocortina 4 (MC4R). La síntesis se ilustra en la figura 4.

Síntesis de Ac-His-(D)phe-Arg-Trp-NH₂

En la figura 4A, se ofrece una perspectiva general de la síntesis.

Se hinchó la resina PEGA (35 mg; 0,056 mmoles) en DMF seco (1 ml) y se trató con ligador de Fmoc-Rink-amida (90,65 mg; 0,168 mmoles, 3 equiv.) en presencia de TBTU (51,77 mg; 0,224 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (28,3 µl; 0,224 mmoles; 4 equiv.). Tras 3 h a temperatura ambiente, se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10) y se secó al vacío. La resina dio negativo en el test de amina de Kaiser, y se observó la reacción cuantitativa midiendo el grupo Fmoc de la resina (5 mg) con solución de piperidina al 20%/DMF (8 ml) durante 30 min a temperatura ambiente.

Se hinchó la resina en DMF seco (1 ml) y se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF (1 ml) durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavó la resina con DMF (x 10) y se unieron los aminoácidos Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-(D)Phe y Fmoc-His(Trt) (3 equiv.) sucesivamente en presencia de TBTU (2,88 equiv.) y NEM (4 equiv.). Tras la incorporación de todos los aminoácidos, se retiró la protección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 ml; 20 min) y se lavó la resina con DMF (x 10). Entonces se acetiló el péptido de la resina con acetanhidruo/piperidina/DMF (2:4:4) (1 ml), y se lavó con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío. Se escindió el péptido de la resina mediante el tratamiento con una solución de TFA (90%), agua (5%), etanoditiol (2%), triisopropilsilano (2%) y tioanisol (1%) durante 3 h a temperatura ambiente. Se filtró la resina y se lavó con TFA (x 2) y DCM (x 2). Se concentró el filtrado combinado al vacío y se precipitó el péptido con éter. Se lavó el péptido con éter (x 10) y se secó al vacío para proporcionar 36,93 mg (96%) de péptido puro.



CLAR: $t_R = 9,61$ min.

IES/EM: calcd $(\text{M}+\text{H})^+ = 686,78$ Da; encontrado $(\text{M}+\text{H})^+ = 686,4$

EM MALDI-TOF: calcd $(\text{M}+\text{H})^+ = 686,78$ Da; encontrado $(\text{M}+\text{H})^+ = 686,98$

^1H -RMN (600 MHz, MeOH-d_4) $\delta = 1,38\text{--}1,64$ (m, 2H, H^β de Arg), $1,10\text{--}1,15$ (m, 2H, H^γ de Arg), $2,00$ (s, 3H, CH_3 de acetilo), $2,96$ (m, 2H, H^δ de Arg), $3,00\text{--}3,09$ (m, 2H, H^β de Phe), $3,24\text{--}3,41$ (m, 2H, H^β de Trp), $3,04\text{--}3,23$ (m, 2H, H^β de His), $4,01$ (m, 1H, H^α de Arg), $4,73$ (m, 1H, H^α de His), $4,51$ (m, 1H, H^α de Phe), $4,71$ (m, 1H, H^α de Trp), $7,04\text{--}7,67$ (s.a., 5H, protones del anillo de Trp), $7,21$; $8,76$ (2H, protones del anillo de His), $7,25\text{--}7,33$ (s.a., 5H, protones del anillo de Phe).

Otro compuesto útil como control positivo en procedimientos de identificación de compuestos que modulan una respuesta celular mediada a través del receptor de la melanocortina 4 (MC4R) es α -MSH de la secuencia Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-OH.

Síntesis de Ac-His-(D)phe-Arg-Trp-Gly-PEGA₁₉₀₀

Estas perlas de resina se usaron como controles positivos en algunos de los ejemplos mencionados más adelante.

En la figura 4B, se ofrece una perspectiva general de la síntesis.

Se hinchó resina del banco de PEGA₁₉₀₀ (100 mg; 0,02 mmoles) en DMF seco (3 ml) y se trató con Fmoc-Gly (17,84 mg; 0,06 mmoles; 3 equiv.) en presencia de TBTU (18,5 mg; 0,058 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (10,2 μl ; 0,08 mmoles; 4 equiv.). Tras 3 h a temperatura ambiente, se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío. La resina dio negativo en el test de amina de Kaiser, y se observó la reacción cuantitativa midiendo el grupo Fmoc de la resina (5 mg) con solución de piperidina al 20%/DMF (8 ml) durante 30 min a temperatura ambiente. La resina del banco de PEGA₁₉₀₀ había sido previamente unida al péptido de adhesión según lo descrito en el ejemplo 5a, apartado "Síntesis del péptido de adhesión".

Se hinchó la resina en DMF seco (1 ml) y se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF (1 ml) durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavó la resina con DMF (x 10) y se unieron los aminoácidos Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-(D)Phe y Fmoc-His(Trt) (3 equiv.) sucesivamente en presencia de TBTU (2,88 equiv.) y NEM (4 equiv.). Tras la incorporación de todos los aminoácidos, se retiró la protección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF (1 ml; 20 min), y se lavó la resina con DMF (x 10). Entonces se acetiló el péptido de la resina con aceticanhidruo/piridina/DMF (2:4:4) (1 ml), y se lavó con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío. Se retiró la protección de las cadenas laterales del péptido mediante el tratamiento con una solución de TFA (90%), agua (5%), etanoditiol (2%), triisopropilsilano (2%) y tioanisol (1%) durante 3 h a temperatura ambiente, y se lavó la resina con DCM (x 10), DMF (x 10) y agua (x 10).

ES 2 330 538 T3

Síntesis de Fmoc-Dap(N₃)OH

En la figura 4C, se ofrece una perspectiva general de la síntesis.

- 5 Se disolvió Fmoc-Dap-OH (980 mg; 3 mmoles) en ácido acético acuoso al 80% (9 ml), y se añadió CuSO₄·5H₂O (15 mg; 0,06 mmoles; 0,02 equiv.) en agua (1 ml). Se ajustó el pH de la solución hasta 9-10 con K₂CO₃. Se añadieron agua (15 ml), MeOH (32 ml) y azida de trifluorometanosulfonilo (6 mmoles) en DCM (25 ml), y se volvió a ajustar el pH hasta 9-10 con K₂CO₃. Se agitó vigorosamente el sistema bifásico durante 20 h. Se separaron las capas mediante la adición de DCM y se lavó la fase orgánica con agua (2 x 40 ml), y luego se acidificaron las fases acuosas combinadas con HCl 3M (acuoso) hasta un pH 2. Se extrajo la fase acuosa con DCM (4 x 50 ml) y se secaron las fases orgánicas combinadas sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron al vacío (0,934 g; 88,2%).

CLAR: t_R = 10,08 min

- 15 IES-EM: calcd (M+H)⁺ = 353,34 Da; encontrado (M+H)⁺ = 353,1

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): δ = 3,75 (d, 2H), 4,14-4,9 (t, 1H), 4,36-4,39 (d, 2H), 4,50-4,54 (m, 1H), 5,50-5,54 (2H, NH y OH), 7,22-7,28 (4H, anillo aromático), 7,51-7,54 (d, 2H, anillo aromático), 7,68-7,71 (d, 2H, anillo aromático).

Ejemplo 3

- 25 El ejemplo describe la síntesis de perlas de resina que comprenden un compuesto cíclico que es capaz de activar, por ejemplo, el receptor de melanocortina 4. En la figura 5A, se ofrece una perspectiva general de la síntesis.

Síntesis de Fmoc-Lys(Boc)-Dap(N₃)-His(Trt)-(D)phe-Arg(Pmc)-Trp(Boc)-Pra-Met-HMBA-Gly-PEGA

- 30 Se hinchó resina roja PEGA (150 mg; 0,24 mmoles) en DMF seco (5 ml) y se trató con Fmoc-Gly (215 mg; 0,72 mmoles; 3 equiv.) en presencia de TBTU (222 mg; 0,69 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (121,8 μl; 0,96 mmoles; 4 equiv.). Tras 3 h a temperatura ambiente, se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío. La resina dio negativo en el test de amina de Kaiser, y se observó la reacción cuantitativa midiendo el grupo Fmoc de la resina (5 mg) con solución de piperidina al 20%/DMF (8 ml) durante 30 min a temperatura ambiente.

- 35 Se hinchó resina en DMF seco (5 ml) y retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF, y se trató con ligador de HMBA (109,5 mg; 0,72 mmoles; 3 equiv.) en presencia de TBTU (222 mg; 0,69 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (121,8 μl; 0,96 mmoles; 4 equiv.). Tras 3 h a temperatura ambiente, se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío. La resina dio negativo en el test de amina de Kaiser.

- 40 Se hinchó la resina en DMF seco (2 ml) y se añadieron Fmoc-Met (267,5 mg; 0,72 mmoles; 3 equiv.), MSNT (213,4 mg; 0,72 mmoles; 3 equiv.) y Melm (43 μl; 0,54 mmoles; 2,25 equiv.). Tras 1 h, se filtró la resina y se lavó con DCM (x 10), MeOH (x 10) y DMF (x 10). Se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF (1 ml) durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavó la resina con DMF (x 10) y se unieron los aminoácidos Fmoc-Pra, Fmoc-Trp (Boc), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-(D)Phe, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Dap(N₃) y Fmoc-Lys(Boc) (3 equiv.) sucesivamente en presencia de TBTU (2,88 equiv.) y NEM (4 equiv.). Tras la incorporación de todos los aminoácidos, se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío.

Ciclación de Fmoc-Lys(Boc)-Dap(N₃)-His(Trt)-(D)Phe-Arg(Pmc)-Trp(Boc)-Pra-Met-HMBA-Gly-PEGA

- 50 a. Se trató la resina de peptidilo (20 mg) con una solución de TFA (90%), agua (5%), etanoditiol (2%), triisopropilsilano (2%) y tioanisol (1%) durante 3 h a temperatura ambiente para retirar todos los grupos protectores de cadena lateral. Se lavó la resina con DCM (x 10), MeOH (x 10) y DMF (x 10). Se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (2 ml) y se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10) y THF (x 10). Se añadieron a la resina DIPEA (61 μl; 0,35 mmoles; 50 equiv.) y CuI (2,66 mg; 0,014 mmoles; 2 equiv.) en THF (300 μl). Se dejó la reacción durante 16 h y luego se lavó con THF, agua, DMF, MeOH, DCM y se secó al vacío.
- 55 b. Se trató la resina de peptidilo (20 mg) con DIPEA (61 μl; 0,35 mmoles; 50 equiv.) y se añadieron a la misma CuI (2,66 mg; 0,014 mmoles; 2 equiv.) en THF (300 μl). Se dejó la reacción durante 16 h, y luego se lavó con THF, agua, DMF, MeOH, DCM, y se secó al vacío.
- 60 c. Desprotección del péptido cíclico. Se añadió a la resina una solución de TFA (90%), agua (5%), etanoditiol (2%), triisopropilsilano (2%) y tioanisol (1%) para retirar todos los grupos protectores de las cadenas laterales (3 h a temperatura ambiente). Se lavó la resina con DCM (x 10), MeOH (x 10) y DMF (x 10). Se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF (2 ml) y se lavó la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se secó al vacío.
- 65

ES 2 330 538 T3

Escisión del péptido de la resina

Se trató la resina con NaOH 0,1M (100 μ l) durante 2 h a temperatura ambiente. Se filtró la resina y se neutralizó el filtrado con HCl 0,1M (100 μ l).

(a) Producción = 8,1 mg (82,5%)

(b) Producción = 7,8 mg (79%)

CLAR: t_R = 10,89 min.

ES EM/EM: calcd (M+H)⁺ = 1112,29 Da; encontrado (M+H)⁺ = 1112,56 Da

¹H-RMN (600 MHz, DMSO-d₆): 1,259-1,273 (m, 2H, H ^{γ} de Arg), 1,311-1,332 (m, 2H, H ^{γ} de Lys), 1,508-1,514 (m, 2H, H ^{δ} de Lys), 1,416-1,616 (m, 2H, H ^{β} de Arg), 1,650-1,669 (m, 2H, H ^{β} de Lys), 1,852-1,979 (m, 2H, H ^{β} de Met), 2,022 (s, 3H, CH₃ de Met), 2,461 (t, 2H, H ^{γ} de Met), 2,484-2,577 (m, 2H, H ^{β} de Pra), 2,671-2,848 (m, 2H, H ^{β} de His), 2,721-2,944 (m, 2H, H ^{β} de Phe), 2,728-2,734 (t, 2H, H ^{ϵ} de Lys), 2,961-3,157 (m, 2H, H ^{β} de Trp), 2,998-3,004 (m, 2H, H ^{δ} de Arg), 3,366-3,568 (m, 2H, H ^{β} de Dap), 3,794 (m, 1H, H ^{α} de Lys), 4,282 (m, 1H, H ^{α} de Arg), 4,309 (m, 1H, H ^{α} de Met), 4,417 (m, 1H, H ^{α} de Pra), 4,521 (m, 1H, H ^{α} de Dap), 4,568 (m, 1H, H ^{α} de Trp), 4,584 (m, 1H, H ^{α} de His), 4,662 (m, 1H, H ^{α} de Phe), 7,164-7,239 (s.a., 5H, protones del anillo de Phe), 7,201, 8,211 (2H, protones de anillo de His), 7,447 (s, 1H, Arg -NH), 6,955-7,312 (s.a., 5H, protones del anillo de Trp), 8,240 (s, 1H, protones del anillo de triazol), 8,094 (1H, H amida de Trp), 8,185 (1H, H amida de Met), 8,213 (1H, H amida de Phe), 8,250 (1H, H amida de Pra), 8,329 (1H, H amida de Arg), 8,408 (1H, H amida de His), 8,805 (1H, H amida de Dap), 10,697 (1H, NH del anillo de Trp).

Ejemplo 4

Síntesis del banco de péptidos cíclicos

El banco de péptidos cíclicos del ejemplo 4 es útil, por ejemplo, para la identificación de compuestos capaces de modular una respuesta celular mediada a través del receptor de la melanocortina 4.

Fmoc-Lys(Boc)-Dap(N₃)-Aa1-Aa2-Aa3-Aa4-Pra-Met-HMBA-Gly-PEGA-NH-Gly-Alloc

Se hincha la resina PEGA (1,5 g; 0,3 mmoles) en DMF seco (15 ml) y se trata con una mezcla de Fmoc-Gly (268 mg; 0,9 mmoles; 3 equiv.) y Alloc-Gly (143 mg; 0,9 mmoles; 3 equiv.) mediante la preactivación con TBTU (277 mg; 0,86 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (152 μ l; 1,2 mmoles; 4 equiv.) y la lenta adición de la mezcla activada a la resina. Tras 3 h a temperatura ambiente, se lava la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se seca al vacío. La resina da negativo en el test de amina de Kaiser, y se observa una proporción de 1:2 de Alloc:Fmoc mediante la medición del grupo Fmoc de la resina (5 mg) con solución de piperidina al 20%/DMF (15 ml) durante 30 min a temperatura ambiente y la determinación de la absorción del eluido a 305 nm.

Se hincha la resina en DMF seco (15 ml) y se retira el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF, y se trata con ligador de HMBA (92 mg; 0,6 mmoles; 3 equiv.) en presencia de TBTU (185 mg; 0,58 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (102 μ l; 0,8 mmoles; 4 equiv.). Tras 3 h a temperatura ambiente, se lava la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se seca al vacío. La resina da negativo en el test de amina de Kaiser.

Se hincha la resina en DMF seco (2 ml) y se añaden Fmoc-Met-OH (223 mg; 0,6 mmoles; 3 equiv.), MSNT (178 mg; 0,6 mmoles; 3 equiv.) y Melm (36 μ l; 0,45 mmoles; 2,25 equiv.). Tras 1 h, se filtra la resina y se lava con DCM (x 10), MeOH (x 10) y DMF (x 10). Se retira el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF (15 ml) durante 20 min a temperatura ambiente. Se lava la resina con DMF (x 10) y se une Fmoc-Para a la resina en presencia de TBTU y NEM. Se transfiere la resina a un sintetizador de péptidos de múltiples columnas y 20 pocillos y se distribuye igualmente en cada pocillo. Se unen los aminoácidos Fmoc-Aa4-OH, Fmoc-Aa3-OH, Fmoc-Aa2-OH, Fmoc-Aa1-OH, Fmoc-Dap(N₃) y Fmoc-Lys(Boc) (3 equiv.) sucesivamente en presencia de TBTU (2,88 equiv.) y NEM (4 equiv.). Tras la incorporación de todos los aminoácidos, se lava la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se seca al vacío.

La síntesis se ilustra en la figura 5B.

Fmoc-NH-CH(R₁)-CO puede ser cualquier aminoácido natural unido a Fmoc.

Fmoc-NH-CH(R₂)-CO; Fmoc-NH-CH(R₃)-CO; Fmoc-NH-CH(R₄)-CO pueden ser cualquiera de los siguientes aminoácidos unidos a Fmoc: Cys, Phe, His, Lys, Met, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr, alanina homofenilica, Tic, ácido 4-fenil-pirrolidona-2-carboxílico, ácido 1-aminociclohexano-carboxílico, 4-Piridil-alanina, (D)-Om Hyp, ácido 4-fenil-piperidin-carboxílico.

ES 2 330 538 T3

Ciclación de Fmoc-Lys(Boc)-Dap(N₃)-Aa1-Aa2- Aa3-Aa4-Pra-Met-HMBA-Gly-PEGA-NH-Alloc

Se trata la resina de peptidilo con una solución de TFA (90%), agua (5%), etanoditiol (2%), triisopropilsilano (2%) y tioanisol (1%) durante 3 h a temperatura ambiente para retirar todos los grupos protectores de las cadenas laterales. Se lava la resina con DCM (x 10), MeOH (x 10) y DMF (x 10). Se retira el grupo Fmoc con piperidina al 20%/DMF (15 ml) y se lava la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10) y THF (x 10). Se añaden a la resina DIPEA (1,75 ml; 10 mmoles; 50 equiv.) y CuI (76,2 mg; 0,4 mmoles; 2 equiv.) en THF (10 ml). Se deja la reacción durante 16 h y luego se lava con THF, agua, DMF, MeOH, DCM, y se seca al vacío.

El procedimiento de ciclación se ilustra en la figura 5B.

Síntesis del péptido de adhesión ((D)Arg-(D)Arg-(D)Ile-(D)Arg-Gly) sobre perlas del banco de péptidos cíclicos

a. Desprotección de Alloc

Se disuelve Pd(PPh₃)₄ (346,5 mg; 0,3 mmoles; 3 equiv) en ácido acético (5%) y NEM (2,5%) en cloroformo (15 ml), y se desgasifica purgando con Ar durante 10 min. Se añade la mezcla de reacción a la resina liofilizada bajo una atmósfera de Ar y se mantiene durante 20 min a temperatura ambiente.

b. Síntesis del péptido de adhesión

Se lava la resina con DMF (x 10) y se une Fmoc-Lys(Boc) (141 mg; 0,3 mmoles; 3 equiv.) usando TBTU (92 mg; 0,288 mmoles; 2,88 equiv.) y NEM (51 µl; 0,4 mmoles; 4 equiv.). Se lava la resina con DMF (x 10) y se retiran las protecciones de α-Fmoc y Boc de las cadenas laterales con piridina al 20% (15 ml) y TFA al 30% en DCM (20 ml), respectivamente. Se vuelve a tratar la resina con Fmoc-Lys(Boc) (282 mg; 0,6 mmoles; 3 equiv.) y TBTU (184 mg; 0,576 mmoles; 2,88 equiv.), y se retiran las protecciones de Fmoc y Boc con piridina al 20% en DMF y TFA al 30% en DCM. Se lava la resina con DMF (x 10) y se unen dos residuos de Ahx mediante la adición de Fmoc-Ahx activado con TBTU (425 mg; 1,2 mmoles; 3 equiv.). Se unen los aminoácidos Fmoc-Gly, Fmoc-(D) Arg(Pmc) y Fmoc-(D) Ile (3 equiv.) según la secuencia en presencia de TBTU (2,88 equiv) y NEM (4 equiv.). Tras la incorporación de todos los aminoácidos, se retira el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20%/DMF (15 ml) y se lava la resina con DMF (x 10), MeOH (x 10), DCM (x 10), y se seca al vacío.

Se trata la resina de peptidilo con una solución de TFA (90%), agua (5%), etanoditiol (2%), triisopropilsilano (2%) y tioanisol (1%) durante 3 h a temperatura ambiente para eliminar todos los grupos protectores de las cadenas laterales. Se lava la resina con DCM (x 10), MeOH (x 10) y DMF (x 10), y se seca al vacío.

Ejemplo 5

Banco de ureas oligocíclicas como peptidomeméticos

Este banco es útil, por ejemplo, para la identificación de compuestos que modulan una respuesta celular mediada a través del receptor unido a proteína G (GPCR).

Síntesis del banco combinatorio de un posible agonista del GPCR de urea a través de la SPPS y la reacción de Pictet-Spengler:

Apartado experimental:

General:

Todos los compuestos químicos descritos, a parte de los carbamatos de O-Pfp constitutivos se encuentran comercialmente disponibles y se usan sin mayor purificación. Los carbamatos de O-Pfp constitutivos se preparan según lo descrito en: Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M.; J. *Combi. Chem.* y QSAR. 2004, 23, 1-15. Todos los disolventes son aptos para una CLAR. La resina PEGA₉₀₀ se adquiere en VersaMatrix A/S. Todas las etapas de lavado duran 2 minutos a no ser que se establezca lo contrario.

Unión del ligador de HMBA con resina PEGA₉₀₀:

Se hincha la resina PEGA₉₀₀ con DCM y se lava con DMF (x 3). Se mezclan 3,0 equiv. de HMBA, 2,9 equiv. de TBTU y 3,0 equiv. de NEM en DMF apropiado y se dejan reaccionar durante 10 min. Se añade la mezcla a la resina y tras 2 h, se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6) y se liofiliza.

ES 2 330 538 T3

Procedimiento general para la unión del aminoácido al ligador de HMBA

Se hincha la resina PEGA₉₀₀ seca con ligador de HMBA en DCM. Se mezclan 3,0 equiv. de aminoácido protegido con Fmoc, 2,25 equiv. de Melm y 3,0 equiv. de MSNT en una cantidad apropiada de DCM, y se añaden a la resina. Tras 1 h, se lava la resina con DCM (x 3), y se repite la unión según lo anterior una vez. Tras la unión durante 1 h, se lava la resina con DCM (x 6), DMF (x 6) y se liofiliza.

Procedimiento general de unión mediante SPPS

Se retira el grupo protector Fmoc del aminoácido terminal de la resina mediante el tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 2 min + 1 x 18 min) seguido por el lavado con DMF (x 6). Se mezclan 3,0 equiv. de aminoácido protegido con Fmoc, 2,9 equiv. de TBTU y 3,0 equiv. de NEM en una cantidad apropiada de DMF, y se deja reaccionar durante 10 min. Se añade la mezcla a la resina y tras 2 h, se lava la resina con DMF (x 6).

Procedimiento general de unión de elementos constitutivos

Se retira el grupo protector Fmoc del aminoácido terminal de la resina PEGA₉₀₀ con ligador de HMBA y tetrapéptido mediante el tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 2 min + 1 x 17 min), seguido por el lavado con DMF (x 6). Se disuelven 3,0 equiv. del elemento constitutivo carbamato de O-Pfp en una cantidad apropiada de DMF y se añade la solución a la resina. Una vez finalizada la unión, se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6) y se liofiliza.

Procedimiento general de la reacción de Pictet-Spengler

Se hincha resina PEGA₉₀₀ seca con ligador de HMBA, péptido y elemento constitutivo en TFA al 10% (ac.) (1 x 1 h y 1 x 11 h). Se lava la resina con H₂O hasta que el agua de lavado tiene un pH = 6-7, y se lava con DMF (x 6), DCM (x 6) y se liofiliza.

Procedimiento general de desprotección de cadenas laterales

Se hincha resina PEGA₉₀₀ seca con ligador de HMBA, péptido y el producto de Pictet-Spengler en H₂O, y se desprotegen las cadenas laterales con TFA al 95% (ac.) (2 x 15 min). Se lava la resina con H₂O hasta que el agua de lavado tiene un pH = 5-7. Entonces se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6), y se liofiliza.

Procedimiento general de escisión de HMBA

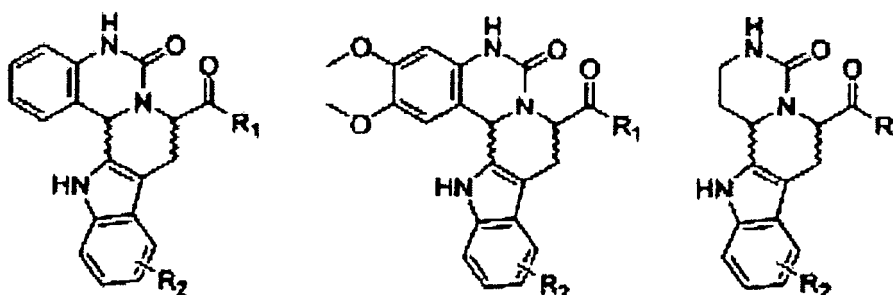
Se hincha la resina PEGA₉₀₀ seca con ligador de HMBA y compuesto unido en agua y se añade NaOH (ac.) 0,1M. Tras 2 h, se usa HCl (ac.) 0,1M para la neutralización y luego se añade AcN hasta que la proporción de H₂O/AcN es 1:1 en volumen. Se filtra la resina y se usa el líquido directamente para una CLAR en fase inversa y/o un análisis de EM Q-TOF.

Síntesis del banco combinatorio:

Se une resina PEGA₉₀₀ seca (1,0 g; 0,2 mmoles) con ligador de HMBA según lo descrito en la “unión de ligador de HMBA con resina PEGA₉₀₀”. Se une luego una mezcla equimolar de Fmoc-glicina y glicina de Alloc con la resina PEGA₉₀₀ funcionalizada con HMBA según lo descrito en el “procedimiento general para la unión de aminoácido con el ligador de HMBA”. Se escinde una muestra analítica mediante el “procedimiento general de escisión de HMBA” y se analiza mediante CLAR de fase inversa. Se hincha la resina de Fmoc-Gly-HMBA-PEGA₉₀₀ en DCM, se lava con DMF (x 6) y se divide en los pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos. Los 10 aminoácidos diferentes se unen con la glicina usando el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se vuelve a mezclar la resina de todos los pocillos y se divide entre los pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos, y se unen los 10 aminoácidos diferentes con el aminoácido terminal usando el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se vuelven a mezclar las resinas de todos los pocillos y se dividen entre los pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos, y se unen los 10 derivados de triptófano diferentes con el aminoácido terminal usando el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se vuelven a mezclar las resinas de todos los pocillos y se dividen entre los pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos, y se unen los 10 elementos constitutivos diferentes con el aminoácido terminal usando el “procedimiento general de unión de elementos constitutivos”. Se vuelve a mezclar la resina de todos los pocillos y se realiza la reacción de Pictet-Spengler según lo descrito en el “procedimiento general de la reacción de Pictet-Spengler”. Se retira el grupo Alloc de los grupos amino con Pd(P(Ph₃))₄ al 5% molar en DMF que contiene acetato de morfolinio al 1%. Se une el péptido de adhesión 4 protegido con Boc/tBu/Pcm (2 equiv.) usando una preactivación con TBTU/NEM (5 min, 0°C) durante 14 h, hasta que el test de Kaiser muestra que la reacción se ha completado. A esto le sigue una desprotección de Boc, But y Pmc según lo descrito en el “procedimiento general de la desprotección de cadenas laterales”. Finalmente, se escinden las muestras analíticas de las perlas individuales mediante el “procedimiento general de la escisión de HMBA” y se analizan mediante análisis de EM Q-TOF y EM/EM.

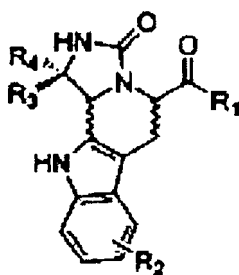
ES 2 330 538 T3

La estructura de los miembros del banco resultante se ofrece a continuación.



R_1 = dipéptido. Cualquier combinación de Gly, L-Trp, L-Arg, D-Arg, L-His, L-Phe, O-Phe, L-Lys, L-Asn, 4-amino-L-Phe.

R_2 = H, 5-OH, 5-Br, 6-F, 7-N3, 5-OMe



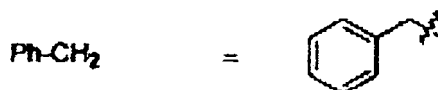
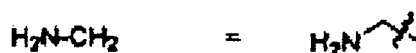
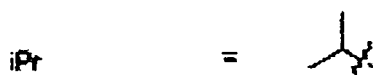
R_1 = dipéptido. Cualquier combinación de Gly, L-Trp, L-Arg, D-Arg, L-His, L-Phe, D-Phe, L-Lys, L-Asn, 4-amino-L-Phe.

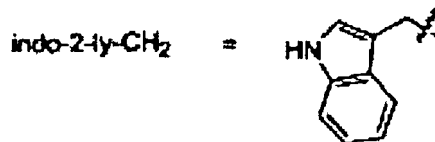
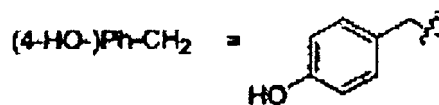
R_2 = H, 5-OH, 5-Br, 6-F, 7-N3, 5-OMe

$R_3 = R_4 = \text{Me}$

o

$R_3 = \text{H}$ y $R_4 = \text{H}$, iPr, $\text{H}_2\text{N-CH}_2$, Ph-CH_2 , (4-HO-)Ph-CH₂ o indo-2-ly-CH₂ $R_3 = \text{H}$ y $R_4 = \text{H}$





Ejemplo 5a

Banco de ureas oligocíclicas como peptidomiméticos 2

Este banco es útil, por ejemplo, para la identificación de compuestos que modulan una respuesta celular mediada a través del receptor unido a la proteína G.

Síntesis del banco combinatorio de posible agonista del GPCR de la urea mediante la SPPS y la reacción de Pictet-Spengler:

Apartado experimental:

General:

Todos los compuestos químicos descritos, a parte de los carbamatos de O-Pfp constitutivos se encuentran comercialmente disponibles y se usan sin mayor purificación. Los carbamatos de O-Pfp constitutivos se preparan según lo descrito en: Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M.; J. *Combi. Chem.* y QSAR. 2004, 23,1-15. Todos los disolventes son aptos para una CLAR. La resina PEGA₉₀₀ se adquiere en VersaMatrix A/S, Dinamarca. Todas las etapas de lavado duran 2 minutos a no ser que se establezca lo contrario.

Procedimiento general de unión mediante SPPS

Se retira el grupo protector Fmoc del aminoácido terminal de la resina mediante el tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 2 min + 1 x 18 min) seguido por el lavado con DMF (x 6). Se mezclan 3,0 equiv. de aminoácido protegido con Fmoc, 2,9 equiv. de TBTU y 4,0 equiv. de NEM en una cantidad apropiada de DMF, y se deja reaccionar durante 10 min. Se añade la mezcla a la resina y tras 2 h, se lava la resina con DMF (x 6).

Procedimiento general para la unión del aminoácido con el ligador de HMBA

Se hincha la resina PEGA₁₉₀₀ seca con ligador de HMBA en DCM. Se mezclan 3,0 equiv. de aminoácido protegido con Fmoc, 2,25 equiv. de MELM y 3,0 equiv. de MSNT en una cantidad apropiada de DCM, y se añaden a la resina. Tras 1 h, se lava la resina con DCM (x 3), y se repite la unión según lo anterior una vez. Tras la unión durante 1 h, se lava la resina con DCM (x 6), DMF (x 6), DCM (x 6) y se liofiliza.

Procedimiento general de la unión de los elementos constitutivos

Se retira el grupo protector Fmoc del aminoácido terminal de la resina PEGA₁₉₀₀ con ligador de HMBA y tetrapéptido mediante el tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 2 min + 1 x 17 min) seguido por el lavado con DMF (x 6). Se disuelven 3,0 equiv. del elemento constitutivo de carbamato de O-Pfp en una cantidad apropiada de DMF y se añade la solución a la resina. Una vez finalizada la unión, se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6) y se liofiliza.

Procedimiento general de la reacción de Pictet-Spengler

Se hincha la resina PEGA₉₀₀ seca con ligador de HMBA, péptido y elemento constitutivo en TFA al 10% (ac.) (1 x 1 h y 1 x 11 h). Se lava la resina con H₂O hasta que el agua de lavado tiene un pH = 6-7, y se lava con DMF (x 6), DCM (x 6) y se liofiliza.

ES 2 330 538 T3

Procedimiento general de desprotección de cadenas laterales

Se hincha la resina PEGA₁₉₀₀ seca con ligador de HMBA y los productos unidos en H₂O, y se desprotegen las cadenas laterales con TFA al 95% (ac.) (2 x 15 min). Se lava la resina con H₂O hasta que el agua de lavado tiene un pH = 5-7. Entonces se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6), y se liofiliza.

Procedimiento general de escisión de HMBA

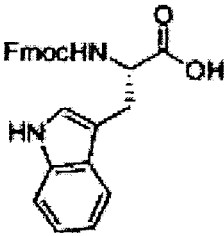
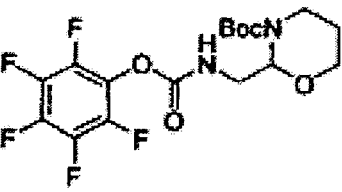
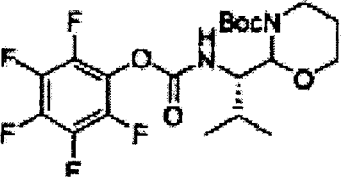
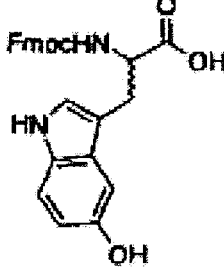
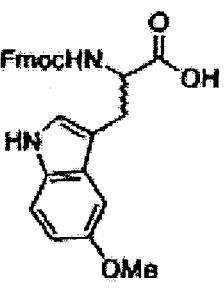
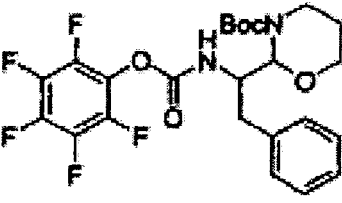
Se hincha la resina PEGA₁₉₀₀ seca con ligador de HMBA y compuestos unidos en agua y se añade NaOH (ac.) 0,1M. Tras 2 h, se usa HCl (ac.) 0,1M para la neutralización y luego se añade AcN hasta que la proporción de H₂O/AcN es 1:1 en volumen. Se filtra la resina y se usa en líquido directamente para una CLAR en fase inversa y/p un análisis EM Q-TOF.

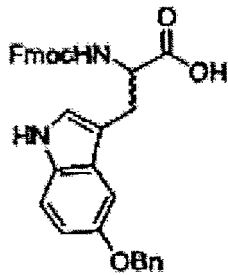
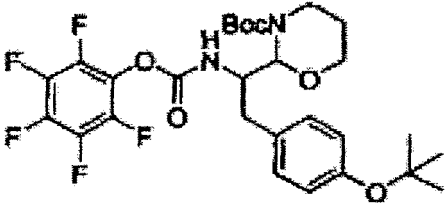
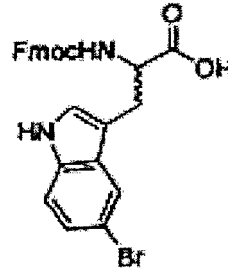
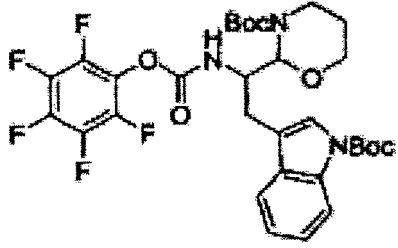
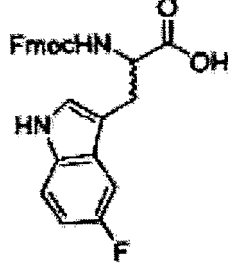
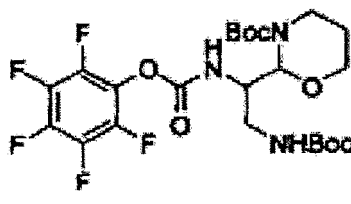
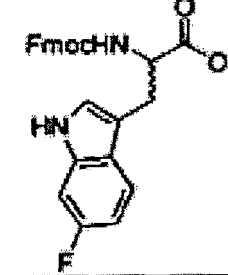
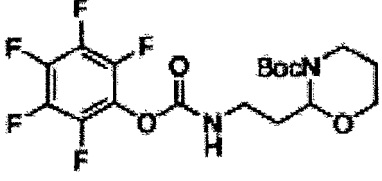
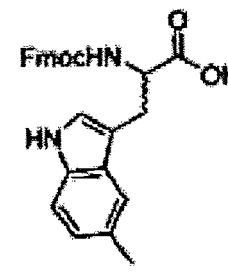
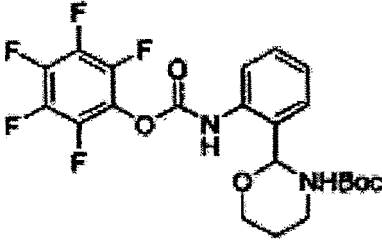
Síntesis del banco combinatorio:

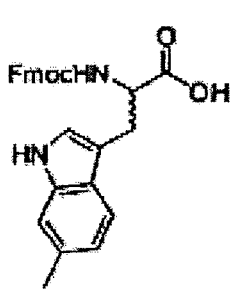
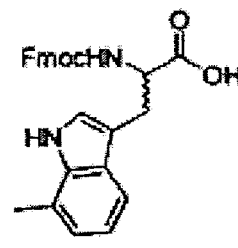
Se une la resina PEGA₁₉₀₀ (1,0 g; 0,2 mmoles) con una mezcla equimolar de Fmoc-glicina y glicina de Alloc según lo descrito en el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. El HMBA se une según lo descrito en el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se une luego Fmoc-glicina con la resina PEGA₁₉₀₀ funcionalizada con HMBA según lo descrito en el “procedimiento general de unión del aminoácido con el ligador de HMBA”. Se hincha la resina de Fmoc-Gly-HMBA-Gly-PEGA₁₉₀₀-Gly-Alloc en DCM, se lava con DMF (x 6) y se divide entre los pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos. Los 20 L-aminoácidos naturales diferentes se unen con la glicina usando el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se vuelve a mezclar la resina de todos los pocillos y se divide entre los pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos, y se unen los 20 L-aminoácidos naturales diferentes con el aminoácido terminal usando el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se vuelven a mezclar las resinas de todos los pocillos y se dividen entre 10 pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos, y se unen los 10 derivados de triptófano protegidos con Fmoc diferentes (mostrados en la tabla 6) con el aminoácido terminal usando el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Se vuelven a mezclar las resinas de todos los pocillos y se dividen entre 8 pocillos de un sintetizador de péptidos de 20 pocillos, y se unen los 8 elementos constitutivos diferentes (mostrados en la tabla 6) con el aminoácido terminal usando el “procedimiento general de unión de elementos constitutivos”. Se transfiere la resina de cada pocillo a una jeringa con un filtro en el fondo. Se retira el grupo Alloc de la glicina unida a la resina usando Pd(PPh₃)₄ al 5% molar en cloroformo que contiene AcOH al 5% y NEM al 2,5% bajo argón durante 12 h. Entonces se lava la resina con cloroformo (x 6), Et₂NCS₂Na·3H₂O al 0,5% y DIPEA al 0,5% en DMF (x 6) y DMF (x 10). Se mezclan 1,5 equiv. del péptido de adhesión protegido (AP4), 1,4 equiv. de TBTU y 2,0 equiv. de NEM en una cantidad apropiada de DMF, y se deja reaccionar durante 10 min. Se añade la mezcla a la resina. Cuando el test de Kaiser muestra que la reacción se ha completado, se lava la resina con DMF (x 6) y DCM (x 6). La reacción de Pictet-Spengler se lleva a cabo según lo descrito en el “procedimiento general de la reacción de Pictet-Spengler”. A esto le sigue una desprotección de las cadenas laterales según lo descrito en el “procedimiento general de la desprotección de cadenas laterales”. Finalmente, se escinden las muestras analíticas de las perlas individuales mediante el “procedimiento general de la escisión de HMBA” y se analizan mediante análisis de EM Q-TOF y EM/EM.

(Tabla pasa a página siguiente)

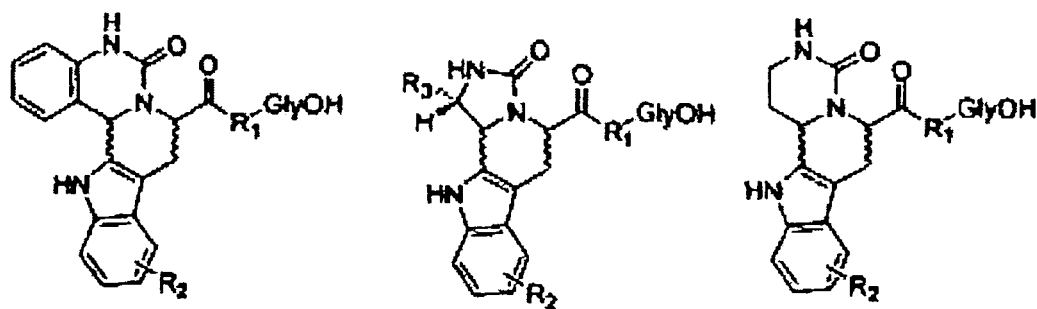
TABLA 6

Derivados de triptófano	Elementos constitutivos
	
	
	
	

Derivados de triptófano	Elementos constitutivos
	
	
	
	
	

Derivados de triptófano	Elementos constitutivos
	
	

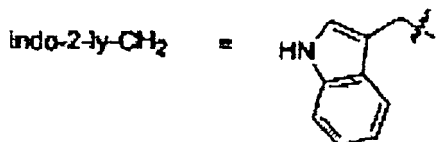
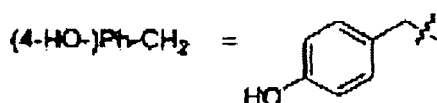
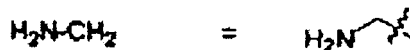
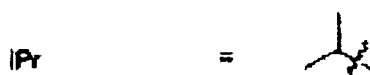
La estructura de los miembros del banco resultante se ofrece a continuación.



R_1 = dipéptido. Cualquier combinación de los 20 L-aminoácidos naturales.

R_2 = H, 5-OH, 5-OMe, 5-OBn, 5-Br, 5-F, 6-F, 5-Me, 6-Me, 7-Me.

R_3 =H, iPr, H_2N-CH_2 , $Ph-CH_2$, (4-HO-)Ph- CH_2 o indo-2-ly- CH_2 .



Síntesis del péptido de adhesión protegido

Se hincha la resina PEGA₉₀₀ en DMF. Se mezclan 3,0 equiv. de HMBA, 2,9 equiv. de TBTU y 4,0 equiv. de NEM en una cantidad apropiada de DMF, y se dejan reaccionar durante 5 min. Se añade la mezcla a la resina y tras 2 h, se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6), y se liofiliza. Se hincha la resina en DCM y se mezclan 3,0 equiv. de Fmoc-Gly-OH, 2,25 equiv. de MELM y 3,0 equiv. de MSNT en una cantidad apropiada de DCM, y se añaden a la resina. Tras 1 h, se lava la resina con DCM (x 3), y se repite la unión según lo anterior una vez. Tras la unión durante 1 h, se lava la resina con DCM (x 6), DMF (x 6), DCM (x 6), y se liofiliza. Se hincha la resina en DMF y se une una secuencia de Fmoc-gln(trt)-OH, Fmoc-arg(Pmc)-OH, Fmoc-ile-OH, Fmoc-arg(Pmc)-OH, Fmoc-lys(Boc)-OH y Boc-ala-OH según lo descrito en el “procedimiento general de unión mediante SPPS”. Entonces se lava la resina con DMF (x 6), DCM (x 6), y se liofiliza. Se escinde el péptido final (Boc-ala-arg(Pmc)-lys(Boc)-arg(Pmc)-ile-arg(Pmc)-gln(trt)-GlyOH) de la resina según lo descrito en el “procedimiento general de escisión de HMBA”.

Ejemplo 6a

Banco de peptidomiméticos multi-heterocíclicos para los receptores GPCR (banco 6a)

El banco es útil, por ejemplo, para la identificación de compuestos que modulan una respuesta celular mediada a través del receptor unido a la proteína G.

Diseño y síntesis del banco

Toda la metodología de la reacción de Pictet-Spengler ha sido desarrollada y analizada en la síntesis de la resina PEGA₈₀₀,¹ de ahí que se elija una resina PEGA₁₉₀₀ de un banco análogo para la síntesis del banco. Para ras- trear los compuestos activos, se prepara el banco siguiendo una estrategia de “dos compuestos por perla”. Esto se realiza tratando la resina funcionalizada con amino con una mezcla de Fmoc-Gly-OH:Alloc-Gly-OH (10:1) activada mediante el procedimiento con TBTU² para proporcionar sitios de reacción ortogonales para (a) la síntesis de un banco mediante división y mezcla (por medio del espaciador Fmoc); y (b) la unión de una molécula de adhesión (MA) (medio del espaciador Alloc). La síntesis del banco del precursor 1 de la reacción de Pictet-Spengler se lleva a cabo según los protocolos estándar de unión de aminoácidos con Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida (Fig. 6a). Debido a la necesidad de condiciones de reacción ácidas para la etapa de la reacción de Pictet-Spengler (q), se emplea el ligador de HMBA (ácido hidroximetilbenzoico) de base lábil. Antes de la unión de HMBA con H₂N-Gly-PEGA₁₉₀₀ mediante el procedimiento de activación de TBTU, se retira el grupo protector Fmoc mediante un tratamiento estándar con pi- peridina. El ligador de HMBA proporciona un sitio de escisión conveniente para la liberación cuantitativa del soporte

sólido mediante una hidrólisis básica. La escisión del producto de una perla individual se realiza habitualmente mediante el tratamiento de la perla con NaOH 0,1M (ac.) durante una noche, proporcionando así cantidades de material suficientes para dilucidar la estructura mediante un análisis de ES Q-TOF-EM/EM. Tras dividir la parte de la resina en 10 pocillos diferentes, el espaciador hidroxilo del ligador es esterificado mediante el tratamiento con 10 aminoácidos Fmoc activados con MSNT (Fmoc-AA₁-OH)³, uniendo así el primer residuo de aminoácido de la secuencia peptidomimética. La posterior síntesis análoga mediante división y mezcla y los 3 ciclos de desprotección de Fmoc/uniones mediadas por TBTU de 10 aminoácidos de Fmoc como segundo residuo de aminoácido (Fmoc-AA₂-OH), 15 aminoácidos de Fmoc que incorporan la cadena lateral aromático reactiva (Fmoc-AA₃-OH) y 7 elementos constitutivos de aldehído enmascarado (R⁴-MABB-OH) (Tabla 5a), preparados según lo comunicado anteriormente,^{4,5} proporcionan el precursor 1 de la reacción de Pictet-Spengler. En esta secuencia de unión, se retira un quinto de la resina antes de la unión de Fmoc-AA₂-OH (etapas e y f) y se vuelve a mezclar con la resina restante a partir de la etapa g en adelante. En última instancia, esto proporciona un banco compuesto por subestructuras tripeptoidales (n = 0) y tetrapeptoidales (n = 1). Se retira el grupo protector Alloc de 1 con Pd(PPh₃)₄ y la posterior unión con TBTU de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH/desprotección de Fmoc (x 2) proporcionó los espaciadores amino para la unión de la molécula de adhesión MA, lo que se realiza mediante el procedimiento de activación con TBTU. La molécula de adhesión se sintetiza mediante una síntesis de péptidos en fase sólida estándar y se purifica mediante CLAR preparativa antes de la unión a la resina. Para finalizar la síntesis del banco, se trata la resina 2 con TFA al 10% (ac.), que simultáneamente facilita la reacción de Pictet-Spengler del *N*-aciliminio intramolecular y la eliminación de los grupos protectores Boc de las cadenas laterales de AA₁ (R¹) y AA₂ (R²). Como consecuencia de los heterociclos aromáticos estructuralmente diversos sometidos a la reacción de Pictet-Spengler del *N*-aciliminio intramolecular, el banco está representado gráficamente por los seis sub-bancos (Ia-VIa) que se presentan a continuación (Fig. 6a). Teóricamente, el banco está compuesto por 11.270 compuestos diferentes (32.890 si se cuentan todos los estereoisómeros).

En la figura 6a, se ofrece una perspectiva general de la síntesis de un banco combinatorio mediante la reacción de Pictet-Spengler del *N*-aciliminio intramolecular ^{a,b}. Los aminoácidos y los elementos constitutivos usados para la síntesis del banco se indican en la tabla 5a.

Reactivos y condiciones: (a) Fmoc-Gly-OH:Alloc-Gly-OH (9:1), TBTU, NEM, DMF; (b) piperidina al 20% (DMF); (c) HMBA, TBTU, NEM, DMF; (d) Fmoc-AA₁-OH, MSNT, Melm, CH₂Cl₂; (e) piperidina al 20% (DMF); (f) Fmoc-AA₂-OH, TBTU, NEM, DMF; (g) piperidina al 20% (DMF); (h) Fmoc-AA₃-OH, TBTU, NEM, DMF; (i) piperidina al 20% (DMF); (j) R⁴-MABB-OH, TBTU, NEM, DMF; (k) Pd(PPh₃)₄ (CHCl₃:AcOH:NEM (925:50:25)); (l) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, TBTU, NEM, DMF; (m) piperidina al 20% (DMF); (n) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, TBTU, NEM, DMF; (o) piperidina al 20% (DMF); (p) AM-OH, TBTU, NEM, DMF; (q) TFA al 10% (ac.); ^aSub-bancos Ia, IIIa, IVa, Va y VIa, cada uno constituido por 700 compuestos diferentes (1.300 si se cuentan todos los estereoisómeros) con n = 1, y 70 compuestos diferentes (130 si se cuentan todos los estereoisómeros) con n = 0; ^bEl sub-banco IIa consta de 7.000 compuestos diferentes (23.400 si se cuentan todos los estereoisómeros) con n = 1 y 700 compuestos diferentes (2.340 si se cuentan todos los estereoisómeros) con n = 0.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 5a. Aminoácidos y elementos constitutivos para la síntesis del banco combinatorio

Fmoc-AA ₁ -OH	Fmoc-AA ₂ -OH	Fmoc-AA ₃ -OH	rac-R ⁴ -MABB-OH
AA ₁	AA ₂	AA ₃ (est. del sub-banco)	R ⁴
D-Phe	Phe	L-3,4-Dimetoxife (Ia)	H
D-Tyr(t-Bu)	Tyr(t-Bu)	Trp (IIa)	Me
D-Arg(Boc) ₂	Arg(Boc) ₂	D/L-(5-Br)Trp (IIa)	i-Bu
D-Lys(Boc)	Lys(Boc)	L-(5-OH)Trp (IIa)	Bn
D-His(Boc)	His(Boc)	D/L-(5-MeO)Trp (IIa)	Ph
D-Trp	Trp	D/L-(4-Me)Trp (IIa)	4-Br-Ph
L-(1-Np)Ala	L-(1-Np)Ala	D/L-(5-Me)Trp (IIa)	3-CF ₃ -Ph
L-Homofe	L-Homofe	D/L-(6-Me)Trp (IIa)	
L-(3-CN)Phe	L-(3-CN)Phe	D/L-(5-BnO)Trp (IIa)	
L-(4-CF ₃)Phe	L-(4-CF ₃)Phe	D/L-(5-F)Trp (IIa)	
D/L-(6-F)Trp (IIa)			
L-(2-Thi)Ala (IIIa)			
L-(3-Thi)Ala (IVa)			
L-(2-Fur)Ala (Va)			
L-(3-BzThi)Ala (VIa)			

Procedimientos generales. Todos los disolventes son adecuados para una CLAR y están almacenados sobre tamices moleculares. La química combinatoria orgánica en fase sólida se lleva a cabo habitualmente usando un sintetizador de péptidos de 20 pocillos dotado de filtros sinterizados de teflón (poros de 50 μm), tubos de teflón y válvulas, que permiten la aplicación de la succión por debajo de los pocillos. Para todas las reacciones llevadas a cabo sobre soporte sólido, se usa resina PEGA₁₉₀₀ (0,2 mmoles/g; VersaMatrix A/S). Antes de su uso, se lava la resina con metanol (x 6), DMF (x 6) y CH_2Cl_2 (x 6). Todos los reactivos comercialmente disponibles se usan como se reciben, sin mayor purificación. El análisis de todas las reacciones en fase sólida se realiza tras la escisión de los productos en sus ácidos libres de la resina. Se trata una perla individual con NaOH acuoso 0,1M (10 μl) en un tubo Eppendorf de 0,5 ml durante una noche, luego se diluye con CH_3CN (20 μl), antes de filtrar la solución, proporcionando así una muestra para el análisis de ES EM/EM en un espectrómetro de masas para Q-TOF Global Ultima de MicroMass (fase móvil de CH_3CN al 50% (ac.), 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$), empleando un ascenso lineal de la energía de colisión. Se analizan los espectros (fig. 7) generando las diferencias de la masa exacta entre los iones de los fragmentos y se tabulan (fig. 8) para proporcionar la ruta de fragmentación (fig. 9), y a partir de ahí, la estructura del compuesto liberado desde la perla individual.

Síntesis del banco combinatorio en fase sólida (6a)

La unión de Fmoc-Gly-OH/Alloc-Gly-OH con la resina PEGA₁₉₀₀ amino-funcionalizada (1,00 g) se lleva a cabo mezclando previamente Fmoc-Gly-OH (0,62 mmoles, 185 mg), Alloc-Gly-OH (0,07 mmoles; 9,9 mg) (9:1, 3,0 equiv. en total), *N*-etil-morfolina (NEM, 0,92 mmoles, 106 mg, 4,0 equiv.) y *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-il)-(dimetilamin)metiten]-*N*-metilmetanaminio-tetrafluoroborato (TBTU, 0,66 mmoles; 213 mg; 0,88 equiv) durante 5 min en DMF. Se añade la solución resultante a la resina previamente hinchada en DMF y se deja reaccionar durante 5 h, tras lo que se lava con DMF (x 6) y CH_2Cl_2 (x 6). La finalización de la reacción se controla usando el test de Kaiser. Antes de la unión del ligador de HMBA mediante el procedimiento anterior, se realizó la desprotección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF, primero durante 2 min y luego durante 18 min, seguida por el lavado con DMF (x 6). La unión del primer aminoácido (Fmoc-AA₁-OH) con la resina derivada de HMBA se realiza tratando la resina recién liofilizada, dividida en 20 (2 x 10) pocillos con CH_2Cl_2 seco, con una mezcla de Fmoc-AA₂-OH (4,5 equiv), Melm (3,4 equiv), y MSNT (4,5 equiv) en CH_2Cl_2 :THF (5:1). ³La unión se lleva a cabo durante 1 h. Cuando se divide en 20 pocillos, se supone que cada pocillo contiene aprox. 50 mg de resina y, por consiguiente, reactivos añadidos con respecto a 0,01 mmoles del material sobre la fase sólida. Se retiran los reactivos en exceso con succión bajo cada pocillo, seguida por un lavado con DMF seco (x 1) y CH_2Cl_2 seco (x 1), antes de repetir la unión con MSNT de Fmoc-AA₁-OH una vez. Las síntesis de péptidos mediante división y mezcla con Fmoc-AA₂-OH, Fmoc-AA₃-OH y R⁴-MABB-OH, respectivamente, se realizan posteriormente siguiendo el procedimiento de unión descrito anteriormente para la unión de Fmoc-Gly-OH (mediante TBTU y NEM en DMF). ²Tras cada etapa de unión y desprotección se utilizó el protocolo habitual de lavado, y todas las uniones fueron comprobadas mediante el test de Kaiser. Se retira el grupo Alloc de 1 tratando la resina con $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0,06 mmoles; 69 mg; 3,0 equiv.) en CHCl_3 :AcOH:NEM (925:50:25) durante 2 h. El lavado se lleva a cabo con CHCl_3 (x 6), una mezcla de dietilditiocarbamato de sodio trihidratado al 5% y DIPEA al 5% en DMF (x 2) y DMF (x 10). Se une el grupo amino libre de la resina (aprox. 0,02 mmoles) con Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0,06 mmoles; 35 mg; 3,0 equiv.) mediante el procedimiento de activación con TBTU, usando TBTU (0,058 mmoles; 19 mg; 2,88 equiv.) y NEM (0,08 mmoles; 9 mg; 4,0 equiv). Tras la desprotección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF, primero durante 2 min y luego durante 18 min, seguida por el lavado con DMF (x 6), se unen los dos espaciadores amino recién liberados con Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0,12 mmoles; 71 mg; 3,0 equiv. por espaciador amino) mediante el procedimiento de activación con TBTU, usando TBTU (0,115 mmoles; 37 mg; 2,88 equiv.) y NEM (0,16 mmoles; 18 mg; 4,0 equiv). Otra serie de desprotección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF, primero durante 2 min y luego durante 18 min, seguida por el lavado con DMF (x 6), proporcionó cuatro espaciadores amino que son unidos a la molécula de adhesión MA-OH (0,24 mmoles; 534 mg; 3,0 equiv.) mediante el procedimiento de activación con TBTU, usando TBTU (0,23 mmoles; 73 mg; 2,88 equiv.) y NEM (0,32 mmoles; 37 mg; 4,0 equiv.). Se lava la resina con DMF (x 6) y CH_2Cl_2 (x 6), y se liofiliza durante una noche. Finalmente, se termina la síntesis del banco mediante el tratamiento de la resina con TFA al 10% (ac.) durante 24 h, seguido por un lavado con agua (x 6), DMF (x 6) y CH_2Cl_2 (x 6). Se liofiliza la resina durante una noche y se mantiene en el congelador (-18°C).

Ejemplo 6b

Banco de peptidomiméticos multi-heterocíclicos para los receptores GPCR (banco 6b)

Este banco es útil, por ejemplo, para la identificación de compuestos que modulan una respuesta celular mediada a través del receptor unido a la proteína G.

Diseño y síntesis del banco

Toda la metodología de la reacción de Pictet-Spengler ha sido desarrollada y analizada en la síntesis de resina PEGA₈₀₀, ¹de ahí que se elija una resina PEGA₁₉₀₀ de un banco análogo para la síntesis del banco. Para rastrear los compuestos activos, se prepara el banco siguiendo una estrategia de "dos compuestos por perla". Esto se realiza tratando la resina funcionalizada con amino con una mezcla de Fmoc-Gly-OH:Alloc-Gly-OH (1:1) activada mediante el procedimiento con TBTU² para proporcionar sitios de reacción ortogonales para (a) la síntesis de un banco mediante división y mezcla (por medio del espaciador Fmoc); y (b) la unión de una molécula de adhesión (MA) (por medio del

espaciador Alloc). La síntesis del banco de los precursores 3 de la reacción de Pictet-Spengler se lleva a cabo según los protocolos estándar de unión de aminoácidos Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida (Fig. 6b). Debido a la necesidad de condiciones de reacción ácidas para la etapa de la reacción de Pictet-Spengler (q), se emplea el ligador de HMBA (ácido hidroximetilbenzoico) de base lábil. Antes de la unión de HMBA con H₂N-Gly-PEG_A₁₉₀₀ mediante el procedimiento de activación con TBTU, se retira el grupo protector Fmoc mediante un tratamiento estándar con piperidina. El ligador de HMBA proporciona un sitio de escisión conveniente para la liberación cuantitativa del soporte sólido mediante una hidrólisis básica. La escisión del producto de una perla individual se realiza habitualmente mediante el tratamiento de la perla con NaOH 0,1M (ac.) durante una noche, proporcionando así cantidades de material suficientes para dilucidar la estructura mediante un análisis de Es Q-TOF-EM/EM. Se esterifica el espaciador hidroxilo del ligador mediante el tratamiento con Fmoc-Gly-OH³ activado con MSNT, colocando así la glicina como el primer residuo de aminoácido de la secuencia peptidomimética. La posterior síntesis análoga mediante división y mezcla y los 4 ciclos de desprotección de Fmoc/uniones mediadas por TBTU de 20 aminoácidos Fmoc como el primer residuo de aminoácido (Fmoc-AA₁-OH), 20 aminoácidos Fmoc como el segundo residuo de aminoácido (Fmoc-AA₂-OH), 15 aminoácidos Fmoc que incorporan la cadena lateral aromática reactiva (Fmoc-AA₃-OH) y 6 elementos constitutivos de aldehído enmascarado (R⁴-MABB-OH) (Tabla 5b), preparados según lo comunicado anteriormente,^{4,5} proporcionan el precursor 3 de la reacción de Pictet-Spengler. Se retira el grupo protector Alloc de 3 con Pd(PPh₃)₄ y la posterior unión con TBTU de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH/desprotección de Fmoc proporcionó los espaciadores amino para la unión de la molécula de adhesión MA, lo que se realiza mediante el procedimiento de activación con TBTU. La molécula de adhesión se sintetiza mediante una síntesis de péptidos en fase sólida estándar y se purifica mediante CLAR preparativa antes de la unión con la resina. Para finalizar la síntesis del banco, se trata la resina 4 con TFA al 10% (ac.), para facilitar la reacción de Pictet-Spengler del *N*-aciliminio intramolecular y TFA:CH₂Cl₂:H₂O:MeSPh:(CH₂SH)₂:TIPS (66,5:20:5:5:2,5:1) para eliminar los grupos protectores residuales de las cadenas laterales de AA₁ (R¹) y AA₂ (R²). Como consecuencia de los heterociclos aromáticos estructuralmente diversos sometidos a la reacción de Pictet-Spengler del *N*-aciliminio intramolecular, el banco está representado gráficamente por los seis sub-bancos (Ib-VIb) que se presentan a continuación (Fig. 6b). Teóricamente, el banco está compuesto por 38.400 compuestos diferentes (118.800 compuestos diferentes si se cuentan todos los estereoisómeros).

En la figura 6b, se ofrece una perspectiva general de la síntesis de un banco combinatorio mediante la reacción de Pictet-Spengler del *N*-aciliminio intramolecular^{a,b,c}. Los aminoácidos y los elementos constitutivos usados para la síntesis del banco se indican en la tabla 5b.

Reactivos y condiciones: (a) Fmoc-Gly-OH:Alloc-Gly-OH (1:1), TBTU, NEM, DMF; (b) piperidina al 20% (DMF); (c) HMBA, TBTU, NEM, DMF; (d) Fmoc-Gly-OH, MSNT, Melm, CH₂Cl₂; (e) piperidina al 20% (DMF); (f) Fmoc-AA₁-OH, TBTU, NEM, DMF; (g) piperidina al 20% (DMF); (h) Fmoc-AA₂-OH, TBTU, NEM, DMF; (i) piperidina al 20% (DMF); (j) Fmoc-AA₃-OH, TBTU, NEM, DMF; (k) piperidina al 20% (DMF); (l) R⁴-MABB-OH, TBTU, NEM, DMF; (m) Pd(PPh₃)₄ (CHCl₃:AcOH:NEM (925:50:25); (n) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, TBTU, NEM, DMF; (o) piperidina al 20% (DMF); (p) AM-OH, TBTU, NEM, DMF, 20 h; (q) TFA al 10% (ac.); (r) TFA:CH₂Cl₂:H₂:H₂O:MeSPh:(CH₂SH)₂:TIPS (66,5:20:5:5:2,5:1). ^aEl sub-banco Ib consta de 26.400 compuestos diferentes (92.400 si se cuentan todos los estereoisómeros). ^bLos sub-bancos IIb, IIIb, IVb y Vb constan de 2.400 compuestos diferentes (4.400 si se cuentan todos los estereoisómeros). El sub-banco VIb consta de 2.400 compuestos diferentes (8.800 si se cuentan todos los estereoisómeros).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 5b. Aminoácidos y elementos constitutivos para la síntesis del banco combinatorio

Fmoc-AA ₁ -OH	Fmoc-AA ₂ -OH	Fmoc-AA ₃ -OH	rac-R ⁴ -MABB-OH
AA ₁	AA ₂	AA ₃ (est. del sub-banco)	R ⁴
His(Boc)	His(Boc)	Trp (Ib)	H
Asp(t-Bu)	Asp(t-Bu)	D/L-(5-Br)Trp (Ib)	Me
Arg(Pmc)	Arg(Pmc)	L-(5-OH)Trp (Ib)	i-Bu
Phe	Phe	D/L-(5-MeO)Trp (Ib)	Bn
Ala	Ala	D/L-(4-Me)Trp (Ib)	Ph
Cys(Trt)	Cys(Trt)	D/L-(5-Me)Trp (Ib)	CH ₂ OH
Gly	Gly	D/L-(6-Me)Trp (Ib)	
Gln(Trt)	Gln(Trt)	D/L-(5-BnO)Trp (Ib)	
Glu(t-Bu)	Glu(t-Bu)	D/L-(5-F)Trp (Ib)	
Lys(Boc)	Lys(Boc)	D/L-(6-F)Trp (Ib)	
Leu	Leu	L-(2-Thi)Ala (IIb)	
Met	Met	L-(3-Thi)Ala (IIIb)	
Asn(Trt)	Asn(Trt)	L-(2-Fur)Ala (IVb)	
Ser(t-Bu)	Ser(t-Bu)	L-(3-BzThi)Ala (Vb)	
Tyr(t-Bu)	Tyr(t-Bu)	D/L-(7-Aza)Trp (VIb)	
Thr(f-Bu)	Thr(t-Bu)		
Ile	Ile		

Fmoc-AA ₁ -OH	Fmoc-AA ₂ -OH	Fmoc-AA ₃ -OH	rac-R ⁴ -MABB-OH
AA ₁	AA ₂	AA ₃ (est. del sub-banco)	R ⁴
Trp(Boc)	Trp(Boc)		
Pro	Pro		
Val	Val		

Procedimientos generales. Todos los disolventes son adecuados para la CLAR y están almacenados sobre tamices moleculares. La química combinatoria orgánica en fase sólida se lleva a cabo habitualmente usando un sintetizador de péptidos de 20 pocillos dotado de filtros sinterizados de teflón (poros de 50 μm), tubos de teflón y válvulas, que permiten la aplicación de la succión por debajo de los pocillos. Para todas las reacciones llevadas a cabo sobre soporte sólido, se usa resina PEGA₁₉₀₀ (0,24 mmoles/g; VersaMatrix A/S). Antes de su uso, se lava la resina con metanol (x 6), DMF (x 6) y CH₂Cl₂ (x 6). Todos los reactivos comercialmente disponibles se usan como se reciben, sin mayor purificación.

El análisis de todas las reacciones en fase sólida se realiza tras la escisión de los productos en sus ácidos libres de la resina. Se trata una perla individual con NaOH acuoso 0,1M (10 μl) en un tubo Eppendorf de 0,5 ml durante una noche, luego se diluye con CH₃CN (20 μl), antes de filtrar la solución, proporcionando así una muestra para el análisis de ES EM/EM en un espectrómetro de masas para Q-TOF Global Ultima de MicroMass (fase móvil de CH₃CN al 50% (ac.), 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$), empleando un ascenso lineal de la energía de colisión. Se analizan los espectros (fig. 7) generando las diferencias de las masas exactas entre los iones de los fragmentos y se tabulan (fig. 8) para proporcionar la ruta de fragmentación (fig. 9), y a partir de ahí, la estructura del compuesto liberado desde la perla individual.

Síntesis del banco combinatorio en fase sólida (6b). Unión de Fmoc-Gly-OH/Alloc-Gly-OH con la resina PEGA₁₉₀₀ amino-funcionalizada (0,24 mmoles/g; 1,68 mmoles; 7,00 g). Se añaden a la resina hinchada en DMF las soluciones (i) + (ii) de glicinas N-protegidas activadas con TBTU; (i) Fmoc-Gly-OH (1,5 equiv.; 2,52 mmoles; 749 mg) + NEM (2,0 equiv.; 3,36 mmoles; 426 ml) + TBTU (1,44 equiv.; 2,42 mmoles; 809 mg) en 5 ml de DMF (activación del modo habitual); e (ii) Alloc-Gly-OH (1,5 equiv.; 2,52 mmoles; 401 mg) + NEM (2,0 equiv.; 3,36 mmoles; 426 ml) + TBTU (1,44 equiv.; 2,42 mmoles; 809 mg) en 5 ml de DMF (activación del modo habitual). Ambas soluciones son añadidas simultáneamente a la resina en partes de 100 x 50 μl con una agitación vigorosa, manteniendo la velocidad a 1 adición de cada solución por minuto. Tras la adición de las soluciones (i) e (ii), se sigue agitando la mezcla de reacción durante 30 min tras lo que se lava con DMF (x 6) y CH₂Cl₂ (x 6) en una jeringa con un filtro de teflón. La finalización de la reacción se controla usando el test de Kaiser. Antes de la unión del ligador de HMBA mediante el procedimiento anterior, se realiza la desprotección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF, primero durante 2 min y luego durante 18 min, seguida por el lavado con DMF (x 6). La unión del primer aminoácido (Fmoc-Gly-OH) con la resina derivada de HMBA se realiza mediante el tratamiento de la resina recién liofilizada (0,84 mmoles) con una mezcla de Fmoc-Gly-OH (4 equiv.; 3,4 mmoles; 999 mg), Melm (8 equiv.; 6,8 mmoles; 533 μl) y MSNT (4 equiv.; 3,4 mmoles; 996 mg) en CH₂Cl₂ seco (30 ml). ³La unión se lleva a cabo durante 2 h, luego se lava la resina con DMF seco (x 1) y CH₂Cl₂ seco (x 1), antes de repetir una vez la unión con MSNT de Fmoc-Gly-OH. Se lava la resina con DMF (x 6) y CH₂Cl₂ (x 6) antes de la liofilización para eliminar todas las trazas de disolvente. Se somete un lote de resina (1,00 g) a síntesis de péptidos mediante división y mezcla con Fmoc-AA₁-OH y Fmoc-AA₂-OH, Fmoc-AA₃-OH y R⁴-MABB-OH, respectivamente, siguiendo el procedimiento de unión descrito anteriormente para la unión de Fmoc-Gly-OH (mediante TBTU y NEM en DMF). ²Tras cada etapa de unión y desprotección, se usa el protocolo habitual de lavado, y todas las uniones son comprobadas mediante el test de Kaiser. Se retira el grupo Alloc de 3 tratando el lote de resina con Pd(PPh₃)₄ (3,0 equiv.; 0,36 mmoles; 416 mg) en CHCl₃:AcOH:NEM (925:50:25) durante 3 h. El lavado fue llevado a cabo con CHCl₃ (x 6) y DMF (x 10). Se unió el grupo amino libre de la resina (0,12 mmoles) con Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (3,0 equiv.; 0,36 mmoles; 210 mg) mediante el procedimiento de activación con TBTU, usando TBTU (2,88 equiv.; 0,348 mmoles; 114 mg) y NEM (4,0 equiv.; 0,48 mmoles; 54 mg). Tras la desprotección de Fmoc con piperidina al 20% en DMF, primero durante 2 min y luego durante 18 min, seguida por el lavado con DMF (x 6), se une el espaciador amino recién liberado con la molécula de adhesión MA-OH (1,5 equiv.; 0,36 mmoles; 801 mg) mediante el procedimiento de activación con TBTU, usando TBTU (2,88 equiv.; 0,691 mmoles; 222 mg) y NEM (4,0 equiv.; 0,96 mmoles; 122 μl). Se lava la resina con DMF (x 6) y CH₂Cl₂ (x 6), y se liofiliza durante una noche. Se finalizó la síntesis del banco tratando primero la resina con TFA al 10% (ac.) durante 24 h, siguiendo con el lavado con agua (x 6), DMF (x 6) y CH₂Cl₂ (x 6), y finalmente con TFA:CH₂Cl₂:H₂O:MeSPh:(CH₂SH)₂:TIPS (66,5:20:5:5:2,5:1) durante 5 h, antes de lavar con CH₂Cl₂ (x 6), DMF (x 6), agua (x 6), DMF (x 6) y CH₂Cl₂ (x 6). Se liofilizó la resina durante una noche y se almacenó en el congelador (-18°C).

Referencias

- (1) Meldal, M. *Tetrahedron Lett.* 1993, 33, 3077-3080,
- (2) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 1927-1930,
- (3) Blankemeyer-Menge, B.; Nimtz, M.; Frank, R. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 1701-1704,
- (4) Groth, T.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* 2001, 3, 34-44,
- (5) Nielsen, T. E.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 3765-3773.

Ejemplo 7

Receptor unido a Gs (MC4R): Análisis de agonistas (Análisis del indicador Cre-GFP detectado con un clasificador de perlas activadas por fluorescencia)

5 *Cre-GFP*

Cre-GFP se encuentra comercialmente disponible en Clontech (pCre-d2eGFP). El vector contiene tres copias de la secuencia de unión de Cre fusionadas con un promotor de tipo TATA. El vector porta un gen de resistencia a la neomicina. En la figura 3, se muestra un mapa del vector.

10 *MC4R*

Se introduce ADN que codifica el MC4R amplificado por PCR en el vector de entrada Gateway® (pENTR) mediante la unión mediada por topoisomerasa. Posteriormente, se recombina el ADN en el Vector de destino pDEST12.2 (pDEST12.2MC4R).

Establecimiento de la línea celular

20 Se transfectan células U2OS con pDEST1.2.2MC4R usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con G418 durante 4 semanas para obtener una línea celular que expresa establemente el MC4R.

Se vuelve a transfectar la línea celular U2OS que expresa establemente el MC4R humano (receptor de melancortina-4) con Cre-GFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA del ejemplo 2) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

30 *Preparación de las perlas/células*

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas de PEGA en medio de crecimiento (DMEM que contiene SFB al 10% en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento/5.000 perlas).

- 35 1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.
- 2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.
- 40 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas, usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las células se conservan y se fijan a las perlas.

50 *Clasificación de las perlas*

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación de 488 nm de un láser de Argón multilínea y un filtro de emisión de 500-650 nm, así como capacidad de clasificación en placas de 96 pocillos para identificar y aislar las perlas con resultados positivos. Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos (un aumento de la fluorescencia de la GFP) mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo preparadas según lo descrito en el ejemplo 2 como S_{max} (respuesta máxima) y perlas de control negativo que sólo comprenden el péptido de adhesión celular como S_{min} (respuesta mínima). Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de respuesta en comparación con las perlas de control negativo. Se separan los resultados positivos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y tras ello, se preparan para la dilucidación de los compuestos, para repetir la síntesis y el análisis, así como para analizar los efectos en otros análisis.

Este análisis también se puede realizar usando células HEK esencialmente según lo descrito en el ejemplo 7a que se presenta a continuación en la presente memoria, a excepción de que las células HEK deberían ser transfectadas con los constructos Cre-GFP y pDEST1.2.2MC4R. También se pueden seleccionar, preferiblemente, las perlas de resina positivas usando un microscopio de fluorescencia según lo descrito en el ejemplo 7a.

ES 2 330 538 T3

Ejemplo 7a

Receptor unido a Gs (MC4R): Análisis de agonistas (interiorización de MC4R-GFP: microscopía)

5 *Construcción de MC4R-GFP*

Se insertan 996 pb de la secuencia del ORF de MC4R sin el codón de terminación en el vector pGFP2-N1 (N.º de cat. Biosignal Packard: 6310013-001) con los sitios de clonación EcoRI/BamHI.

10 *Establecimiento de la línea celular*

Se transfectan células Hek293 con MC4R-GFP usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el MC4R-GFP.

15 *Preparación de las perlas/célula*

Las células fueron cultivadas, respectivamente, sobre 1) perlas de control negativo (preparadas según lo descrito en el ejemplo 1); 2) perlas de control positivo (preparadas según lo descrito en el ejemplo 2; Ac-His-(D)phe-Arg-Trp-Gly-PEGA₁₉₀₀) y perlas del banco (preparadas según lo descrito en el ejemplo 6b). Cada lote de perlas fue tratado por separado. Se tripsinizaron las células y se mezclaron con perlas de control negativo/perlas de control positivo/perlas del banco en medio de crecimiento (Hams F12 que contiene SFB al 5%).

25 - Se añaden 500 perlas en 500 ul de Hams a un tubo Nunc de 14 ml.

- Se añaden 2.500 ul de suspensión celular de 1×10^6 /ml de Hams con SFB al 5%.

- Se deja el tubo verticalmente en una incubadora (37°C, CO₂ al 5%) durante 16-24 h. Se mece el tubo suavemente cada 15 min durante la primera hora.

30 - Se retira el medio. Se lavan las células sueltas suavemente añadiendo y retirando 4 ml de Hams x 2 (se vuelve a hacer girar el tubo hacia arriba y hacia abajo. En cuanto las perlas se hayan sedimentado, se extrae el medio).

- Se añaden 2 ml de Hams con SFB al 5%.

35 - Se incuba o/n a 37°C, CO₂ al 5%.

- Se decantan las perlas en un portaobjeto compartimentado de Lab-Tek de 1 pocillo (n.º 155361).

40 *Identificación y aislamiento de resultados*

Se colocó el portaobjeto compartimentado de 1 pocillo de Lab-Tek en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 dotado de filtros óptimos para la fluorescencia de la GFP. El microscopio estaba dotado además de un micromanipulador (Eppendorf Transferrman NK2) capaz de recoger las perlas individuales. Con cámaras de objetivos x40, se rastrearon las perlas con resultados positivos que aparecían como células con puntos verdes ubicados en el citoplasma, al contrario de las perlas negativas, en las que la GFP está ubicada en la membrana plasmática de las células. Se usaron perlas de control positivo y negativo para establecer el corte para las perlas de resultados positivos. Tales perlas con resultados pueden ser recogidas usando un micromanipulador. Se cuantificó la interiorización de MC4R-GFP, y los resultados se muestran en la fig. 11.

50

Ejemplo 8

55 *Receptor unido a Gs (MC4R): Análisis de agonistas (interiorización multiplexada de MC4R-GFP e indicador Cre-YFP: FABS y microscopía)*

Construcción de pCRE-d2EYFP

60 Se unen 732 pb del fragmento EYFP de pd2EYFP-1 (n.º de cat. Clontech: 6912-1) con un fragmento de 3,5 kb de pCRE-d2EGFP (n.º de cat. Clontech 6034-1). Se escinden ambos fragmentos de los dos vectores mediante una digestión común con enzimas de restricción.

Construcción de MC4R-GFP

65 Se insertan 996 pb de la secuencia del ORF de MC4R sin el codón de terminación en el vector pGFP2-N1 (N.º de cat. Biosignal Packard: 6310013-001) con los sitios de clonación EcoRI/BamHI.

Establecimiento de la línea celular

Se transfectan células U2OS con MC4R-GFP usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el MC4R-GFP. Se vuelve a transfectar la línea celular U2OS que expresa establemente el MC4R-GFP humano (receptor de melanocortina-4-GFP) con Cre-GFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA del ejemplo 2) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

Preparación de las perlas/células

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas en medio de crecimiento (DMEM que contiene SFB al 10% en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento/5.000 perlas).

- 1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.
- 2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.
- 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las células se conservan y se fijan a las perlas.

Clasificación de las perlas en cuanto a la respuesta a Cre-YFP

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación láser de 514 nm y un filtro de emisión de 528-572 nm para identificar y aislar las perlas con resultados positivos. Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos (un aumento de la fluorescencia de la YFP) mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo como S_{max} (respuesta máxima) y perlas de control negativo como S_{min} (respuesta mínima). Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de respuesta en comparación con las perlas de control negativo. Se aíslan las perlas de resultados positivos en una cámara Nunc de 1 pocillo y, tras ello, se preparan para analizar la interiorización del receptor.

Interiorización de MC4R-GFP: análisis de microscopía

Se coloca una cámara Nunc con resultados positivos en Cre-YFP sobre un microscopio de generación de imágenes (Zeiss Axiovert 200M) dotado de filtros que permiten la separación entre YFP y GFP. El microscopio está dotado además de un micromanipulador (Eppendorf Transferman NK2) capaz de recoger las perlas individuales. Con un objetivo x20, se rastrea la cámara en cuanto a la interiorización de MC4R-GFP positiva (aparece como puntos intracelulares en comparación con la distribución por la membrana en la interiorización de MC4R-GFP no positiva), y se recogen tales perlas con resultados usando un micromanipulador para la dilucidación de la estructura de los compuestos.

Se espera que un rastreo multiplexado como éste proporcione una tasa muy baja de resultados falsos positivos, pues los resultados recogidos para dilucidar la estructura están dando lugar tanto a la activación del receptor específico (interiorización del receptor) como a una respuesta funcional (activación de la transcripción de Cre-YFP).

Ejemplo 9

Receptor unido a Gs (MC4R): Análisis de agonistas (interiorización de HA-MC4R e indicador Cre-YFP: FABS y microscopía)

Construcción de pCRE-d2EYFP

Se unen 732 pb de un fragmento EYFP de pd2EYFP-1 (n.º de cat. Clontech: 6912-1) con un fragmento de 3,5 kb de pCRE-d2EGFP (n.º de cat. Clontech 6034-1). Se escinden ambos fragmentos de los dos vectores mediante una digestión común con enzimas de restricción.

ES 2 330 538 T3

Construcción de HA-MC4R

Primero se insertan 999 pb de la secuencia del ORF de MC4R en el vector pCMV-HA (n.º de cat. Clontech 6003-1) con los sitios de clonación EcoRI/XhoI, luego se clona además el fragmento de fusión de HA-MC4R en
5 pcDNA3.1/Zeo (n.º de cat. Invitrogen V86520) con los sitios de clonación HindIII/XhoI.

Establecimiento de la línea celular

Se transfectan células U2OS con HA-MC4R usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene
10 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el HA-MC4R. Se vuelve a transfectar la línea celular U2OS que expresa establemente el HA-MC4R humano (receptor de melanocortina-4-GFP) con Cre-YFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA del ejemplo 2) y 3) compuestos del banco. Los
15 tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

Preparación de las perlas/células

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas en medio de crecimiento (DMEM que contiene SFB al 10%
20 en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento/5.000 perlas).

- 1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.
- 25 2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.
- 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el
30 cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las
35 células se conservan y se fijan a las perlas.

Clasificación de las perlas en cuanto a la respuesta a Cre-YFP

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de un láser de Argón multilínea ajustado
40 a la línea de excitación de 514 nm y un filtro de emisión de 528-572 nm para identificar y aislar las perlas con resultados positivos. Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos (un aumento de la fluorescencia de la YFP) mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo como Smax (respuesta máxima) y perlas de control negativo como Smin (respuesta mínima). Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de respuesta en comparación con las perlas de control negativo. Se aíslan las
45 perlas de resultados positivos en una cámara Nunc de 1 pocillo y, tras ello, se preparan para analizar la interiorización del receptor.

Interiorización de HA-MC4R: análisis de microscopía

Se tratan las perlas aisladas como resultados positivos en el análisis del indicador de la transcripción de Cre-YFP
50 mediante FABS con Triton-x para permeabilizar las células, tras lo que se incuban con anticuerpo policlonal marcado con HA y se tiñen con un anticuerpo secundario conjugado con TRITC apropiado. Se coloca una cámara Nunc de un pocillo que porta perlas marcadas sobre un microscopio de generación de imágenes (Zeiss Axiovert 200M) dotado de filtros que permiten la separación entre YFP y TRITC. El microscopio está dotado además de un micromanipulador
55 (Eppendorf Transferrman NK2) capaz de recoger las perlas individuales. Con un objetivo x20, se rastrea la cámara en cuanto a la interiorización positiva de HA positiva (aparece como puntos intracelulares en comparación con la distribución por la membrana en la interiorización no positiva de HA-MC4R), y se recogen tales perlas con resultados para la dilucidación de la estructura de los compuestos.

Se espera que un rastreo multiplexado como ésta proporcione una tasa muy baja de resultados falsos positivos,
60 pues los resultados recogidos para dilucidar la estructura están dando lugar tanto a la activación del receptor específico (observada como la interiorización del receptor) como a una respuesta funcional (observada como la transcripción del constructo Cre-YFP).

65

Ejemplo 10

Receptor unido a Gs (MC4R): Análisis de agonistas (interiorización de HA-MC4R e indicador Cre-YFP: FABS + FABS)

Construcción de pCRE-d2EYFP

Se unen 732 pb de un fragmento EYFP de pd2EYFP-1 (n.º de cat. Clontech: 6912-1) con un fragmento de 3,5 kb de pCRE-d2EGFP (n.º de cat. Clontech 6034-1). Se escinden ambos fragmentos de los dos vectores mediante una digestión común con enzimas de restricción.

Construcción de HA-MC4R

Primero se insertan 999 pb de la secuencia del ORF de MC4R en el vector pCMV-HA (n.º de cat. Clontech 6003-1) con los sitios de clonación EcoRI/XhoI, luego se clona además el fragmento de fusión de HA-MC4R en pcDNA3.1/Zeo (n.º de cat. Invitrogen V86520) con los sitios de clonación HindIII/XhoI.

Establecimiento de la línea celular

Se transfectan células U2OS con HA-MC4R usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el HA-MC4R. Se vuelve a transfectar la línea celular U2OS que expresa establemente el HA-MC4R humano (receptor de melanocortina-4-HA) con Cre-YFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA del ejemplo 2) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

Preparación de las perlas/células

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas en medio de crecimiento (DMEM que contiene SFB al 10% en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento/5.000 perlas).

1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.

2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.

3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las células se conservan y se fijan a las perlas.

Clasificación de las perlas en cuanto a la respuesta a Cre-YFP

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación láser de 514 nm y un filtro de emisión de 528-572 nm para identificar y aislar las perlas con resultados positivos. Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos (un aumento de la fluorescencia de la YFP) mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo como Smax (respuesta máxima) y perlas de control negativo como Smin (respuesta mínima). Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de respuesta en comparación con las perlas de control negativo. Se aíslan las perlas de resultados positivos en un tubo de 10 ml y, tras ello, se preparan para analizar la interiorización del receptor.

Interiorización de HA-MC4R: análisis de FABS

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación láser de 568 nm y un filtro de emisión de 584-640 nm para identificar y aislar las perlas con resultados positivos.

Las perlas aisladas como resultados positivos en el análisis del indicador de la transcripción de Cre-YFP mediante FABS, así como las perlas de control positivo y negativo, se incuban con anticuerpo policlonal marcado con HA, tras lo que se tiñen con un anticuerpo secundario conjugado con TRITC apropiado. Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo como Smax (respuesta máxima) y perlas de control negativo como Smin (respuesta mínima). Se

ES 2 330 538 T3

fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de respuesta en comparación con las perlas de control negativo. Los resultados positivos están dando menos fluorescencia de TRITC que los resultados negativos provocados por la interiorización del receptor que da como resultado la incapacidad del anticuerpo sec. conjugado con TRITC de llegar a la etiqueta de HA (carencia de permeabilización de la membrana plasmática). Se separan los resultados positivos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y tras ello, se preparan para la dilucidación de los compuestos, para repetir la síntesis y el análisis, así como para analizar los efectos en otros análisis.

Se espera que un rastreo multiplexado como ésta proporcione una tasa muy baja de resultados falsos positivos, pues los resultados recogidos para dilucidar la estructura están dando lugar tanto a la activación del receptor específico como a una respuesta funcional.

Ejemplo 11

15 *Receptor unido a Gs (β 2AR): Análisis de antagonistas (indicador de Cre)*

Cre-GFP

20 Cre-GFP (elemento de respuesta a AMPc-Proteína verde fluorescente) se encuentra comercialmente disponible en Clontech (pCred2eGFP). El vector contiene tres copias de la secuencia de unión de Cre fusionadas con un promotor de tipo TATA. El vector porta un gen de resistencia a la neomicina. En la figura 3, se muestra un mapa del vector.

Receptor β 2 adrenérgico (β 2AR)

25 Se amplifica por PCR un fragmento de ADNc de 1.776 pb que contiene la secuencia del ORF de β 2AR procedente de bancos de ADNc de riñón humano y cerebro fetal (n.º de cat. Clontech 639305, 6393029) usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de ARNm del β 2AR (n.º de acceso: NM_000024), y se clona en el vector pCR-XL-TOPO (Invitrogen). Se clona además un fragmento de 1.274 pb del gen de β 2AR que contiene una secuencia de Kozak y un codón de terminación en el vector pcDNA3.1/zeo(+) (Invitrogen) con los sitios de restricción HindIII/XhoI. El gen de β 2AR se confirma mediante secuenciación.

Establecimiento de la línea celular

35 Se transfectan células U2OS con β 2AR usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el β 2AR. Se transfecta además la línea celular U2OS que expresa establemente el β 2AR humano con Cre-GFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión e isoproterenol) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

Preparación de las perlas/células

45 Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas en medio de crecimiento (DMEM que contiene SFB 10%), se añade isoproterenol 10 uM en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento con isoproterenol 10 uM/5.000 perlas.

- 1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento con proterenol 10 uM + 5.000 perlas de control positivo + 2 x 10⁷ células.
- 2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento con proterenol 10 uM + 5.000 perlas de control negativo + 2 x 10⁷ células.
- 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento con proterenol 10 uM + 100.000 perlas del banco + 4 x 10⁸ células.

60 Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las células se conservan y se fijan a las perlas.

65 *Clasificación de las perlas*

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación láser de 488 nm y un filtro de emisión de 500-550 nm para identificar y aislar las perlas con resultados positivos (= la inhibición

ES 2 330 538 T3

del isoproterenol inducida por la transcripción de Cre-GFP = disminución de la fluorescencia en comparación con el control negativo). Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo como Smax (inhibición máxima = fluorescencia mínima) y perlas de control negativo como Smin (inhibición mínima = fluorescencia máxima). Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de la inhibición en comparación con las perlas de control negativo. Se separan los resultados positivos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y tras ello, se preparan para la dilucidación de los compuestos, para repetir la síntesis y el análisis, así como para analizar los efectos en otros análisis.

10 Ejemplo 12

Receptor unido a Gi (CCR5): Análisis de agonistas (indicador Cre-GFP)

Cre-GFP

Cre-GFP se encuentra comercialmente disponible en Clontech (pCre-d2eGFP). El vector contiene tres copias de la secuencia de unión de Cre fusionadas con un promotor de tipo TATA. El vector porta un gen de resistencia a la neomicina. En la figura 3, se muestra un mapa del vector.

Receptor 5 de la quimiocina C-C (CCR5): n.º de acceso AAB57793

Se transfectan células U2OS con CCR5 usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el CCR5. Se vuelve a transfectar la línea celular U2OS que expresa establemente el CCR5 humano con Cre-GFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA con péptido de adhesión y RANTES) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

Preparación de las perlas/células

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas en DMEM que contiene SFB al 10%, forskolina 10 uM e IBMX 500 uM en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de DMEM/5.000 perlas.

- 1) Control positivo: 50 ml de DMEM + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.
- 2) Control negativo: 50 ml de DMEM + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.
- 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de DMEM + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las células se conservan y se fijan a las perlas.

Clasificación de las perlas

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación láser de 488 nm y un filtro de emisión de 500-550 nm, así como capacidad de clasificación en placas de 96 pocillos para identificar y aislar las perlas con resultados positivos. Se calibra el FABS para identificar y aislar las perlas con resultados positivos (disminución de la fluorescencia de GFP en comparación con el control negativo) mediante la determinación del intervalo dinámico del análisis usando las perlas de control positivo (RANTES) como Smax (respuesta máxima = fluorescencia mínima) y perlas de control negativo como Smin (respuesta mínima = fluorescencia máxima). Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de respuesta en comparación con las perlas de control negativo. Se separan los resultados positivos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y tras ello, se preparan para la dilucidación de los compuestos, para repetir la síntesis y el análisis, así como para analizar los efectos en otros análisis.

Ejemplo 13

*Receptor unido a Gq (Muscarínico M1): Análisis de antagonistas (movilización del Ca^{++} usando Fluo-4)*5 *Análisis de antagonistas del Ca^{++}*

Este análisis está diseñado para identificar los compuestos antagonistas muscarínicos M1. La lectura está constituida por los cambios en la concentración del Ca^{++} intracelular detectados usando una sonda Fluo-4 de Molecular Probes (véase la descripción en otra parte de la memoria). Los resultados positivos son compuestos que inhiben el aumento inducido por el carbacol (agonista muscarínico M1) en el Ca^{++} intracelular.

Se transfectan células U2OS con receptor muscarínico M1 usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el receptor muscarínico M1. Las células U2OS que expresan el receptor muscarínico M1 son cultivadas sobre perlas de PEGA que presentan péptido de adhesión y respectivamente 1) control negativo (perlas que sólo comprenden compuesto de adhesión celular); 2) control positivo (perlas que comprenden compuesto de adhesión celular y atropina) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

20 *Preparación de las perlas/células*

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas en medio DMEM que contiene SFB al 10% en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento/5.000 perlas.

- 25 1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.
- 2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.
- 30 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO_2 al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min.

Medición de los cambios en la concentración de calcio libre citoplasmático $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añade Fluo-4 1 μM (Molecular Probes F-14201) a la que se añaden 10 ml de tampón de Krebs Ringer (KRW: KrebsRingerWollheim, pH 7,4: NaCl 0,14M; KCl 3,6 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; D-Glucosa 6 mM; CaCl_2 1,5 mM; HEPES 10 mM) + Pluronic al 0,02% (Molecular Probes F-127) por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se incuban las células/perlas a 37°C durante 30 min. Después, se lavan las perlas con 10 ml de KRW/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Las células cargadas en Fluo-4 ya están preparadas para la detección de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se controla la fluorescencia bien en un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) (COPAS de Union Biometrica, EE.UU.) que está dotado de múltiples líneas de excitación láser (476 nm, 483 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm, 520 nm, 568 nm, 647 nm, 676 nm) o un lector de placas de fluorescencia (Polarstar Optima de BMG Labtech, Alemania) que está dotado de una lámpara Blitz de xenón flash. La fluorescencia de Fluo4 se detecta en el FABS mediante la excitación con 488 nm y la recogida de la luz emitida sobre un PMT a través de un filtro de emisión de 530 ± 30 nm, y en el lector de placas, se excitan las células a través de un filtro de excitación de 490 ± 5 nm y la emisión es recogida a través de un filtro de emisión de 510 ± 5 nm. Para calcular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ exacta, se convierte la intensidad de la fluorescencia en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ usando la ecuación $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D [(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)]$, en la que la constante de disociación K_D es 345 nM, F es la intensidad de fluorescencia, $F_{\min}$ es la fluorescencia total en ausencia de Ca^{2+} y $F_{\max}$ es la fluorescencia total cuando Fluo3 está saturada de Ca^{2+} . Para obtener la $F_{\min}$, se preincuban las células en un tampón bajo en calcio (pH 7,4: NaCl 0,14M; KCl 3,6 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; D-Glucosa 6 mM; EGTA 1,5 mM; HEPES 10 mM) y se desafían con ionomicina 1 μM , inmediatamente antes de la detección de la fluorescencia. Para obtener la $F_{\max}$, se suspenden las células en un tampón saturado de calcio (pH 7,4: NaCl 0,14M; KCl 3,6 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; D-Glucosa 6 mM; CaCl_2 1,5 mM; HEPES 10 mM) y se desafían con ionomicina 1 μM , inmediatamente antes de la detección. En varios de nuestros análisis de rastreo, no se usa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ iónica exacta, sino que la respuesta de los compuestos de rastreo se expresa en relación con los compuestos control (véase más adelante).

Clasificación de las perlas en cuanto a la señal de Fluo-4

Se usa un clasificador de perlas activadas por fluorescencia (FABS) dotado de una línea de excitación láser de 488 nm y un filtro de emisión de 528-572 nm y capacidad de inyección para identificar y aislar las perlas con resultados positivos (= la inhibición del respuesta del Ca^{++} inducida por Carbacol = disminución de la fluorescencia en comparación con el control negativo). Se calibra el FABS para identificar y aislar perlas con resultados positivos mediante la

determinación del intervalo dinámico del análisis usando perlas de control positivo como S_{max} (inhibición máxima = fluorescencia mínima) y perlas de control negativo como S_{min} (inhibición mínima = fluorescencia máxima). Se inyecta carbachol 1 μM en el flujo de vapor dando como resultado un aumento de la fluorescencia para las perlas de control negativo y una carencia de variación o un aumento menor de la fluorescencia de las perlas de control positivo. Se fija como umbral para una perla de respuesta positiva un corte en un 30% de la inhibición en comparación con las perlas de control negativo. Las perlas con resultados positivos pueden ser identificadas preferiblemente usando un lector de placas esencialmente según lo descrito en el ejemplo 13a que se presenta a continuación en la presente memoria.

Se separan los resultados positivos en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y tras ello, se preparan para la dilucidación de los compuestos, para repetir la síntesis y el análisis, así como para analizar los efectos en otros análisis.

Ejemplo 13a

Receptor unido a Gq (Muscarínico M1): Análisis de antagonistas (movilización del Ca^{++} usando Fluo-4)

Análisis de antagonistas del Ca^{++}

Este análisis está diseñado para identificar los compuestos antagonistas muscarínicos M1. La lectura está constituida por los cambios en la concentración del Ca^{++} intracelular detectados usando una sonda Fluo-4 de Molecular Probes. Los resultados positivos son compuestos que inhiben el aumento inducido por el carbachol (agonista muscarínico M1) en el Ca^{++} intracelular. Para calcular la $[Ca^{2+}]_i$ exacta, se convierte la intensidad de la fluorescencia en $[Ca^{2+}]_i$ usando la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_D[(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$, en la que la constante de disociación K_D es 345 nM, F es la intensidad de fluorescencia, F_{min} es la fluorescencia total en ausencia de Ca^{2+} y F_{max} es la fluorescencia total cuando Fluo4 está saturada de Ca^{2+} . Para obtener la F_{min} , se pre-incuban las células en un tampón bajo en calcio (pH 7,4: NaCl 0,14M; KCl 3,6 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,5 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 mM; $NaHCO_3 \cdot 2H_2O$ 1,5 mM; D-Glucosa 6 mM; EGTA 1,5 mM; HEPES 10 mM; probenecid 2 mM) y se desafían con ionomicina 1 μM , inmediatamente antes de la detección de la fluorescencia. De manera similar, F_{max} se obtiene suspendiendo las células en un tampón saturado de calcio (pH 7,4: NaCl 0,14M; KCl 3,6 mM; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0,5 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 mM; $NaHCO_3 \cdot 2H_2O$ 1,5 mM; D-Glucosa 6 mM; $CaCl_2$ 1,5 mM; HEPES 10 mM; probenecid 2 mM) y se desafían con ionomicina 1 μM , inmediatamente antes de la detección.

En general, no es necesario usar la $[Ca^{2+}]_i$ iónica exacta. Más bien, la respuesta de los compuestos de rastreo se puede expresar en relación con los compuestos control (véase más adelante).

Establecimiento de la línea celular

Se transfectan células BHK con el receptor muscarínico M1 usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con G418 durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el receptor muscarínico M1.

Preparación de las perlas/células

Las células BHK que expresan el receptor muscarínico M1 son cultivadas sobre perlas de control negativo (preparadas según lo descrito en el ejemplo 1) usando el siguiente procedimiento:

- Se tripsinizan las células y se ajusta la concentración de las células a 1×10^6 /ml de medio de crecimiento de Hams F12.
- Se añaden 500 perlas en 500 μl de Hams a un tubo Nunc de 14 ml.
- Se añaden 2.500 μl de suspensión celular de 1×10^6 /ml de Hams con SFB al 5%.
- Se deja el tubo verticalmente en una incubadora (37°C, CO_2 al 5%) durante 16-24 h. Se mece el tubo suavemente cada 15 min durante la primera hora.
- Se retira el medio. Se lavan las células sueltas suavemente añadiendo y retirando 4 ml de Hams F12 dos veces (se vuelve a hacer girar el tubo hacia arriba y hacia abajo. En cuanto las perlas se hayan sedimentado, se extrae el medio).
- Se añaden 2 ml de Hams F12 con SFB al 10%.
- Se incuba o/n a 37°C, CO_2 al 10%.

Medición de los cambios en la concentración de calcio libre citoplasmático $[Ca^{2+}]_i$:

- Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta.

ES 2 330 538 T3

- Se añade Fluo-4 1 μ M (Molecular Probes F-14201) a la que se añaden 2 ml de tampón de Krebs Ringer (KRW: KrebsRingerWollheim, pH 7,4; NaCl 0,14M; KCl 3,6 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM; $\text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM; D-Glucosa 6 mM; CaCl_2 1,5 mM; HEPES 10 mM; probenecid 2 mM) + Pluronic al 0,02% (Molecular Probes F-127) por cada 500 perlas, se mezcla suavemente y se incuban las células/perlas a 37°C durante 30 min.
- Después, se lavan las perlas con 5 ml de KRW/500 perlas x 2 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Las células cargadas en Fluo-4 ya están preparadas para la detección de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Se controla la fluorescencia bien en un lector de placas de fluorescencia (Polarstar Optima de BMG Labtech, Alemania) que está dotado de una lámpara Blitz de xenón flash y un filtro de excitación de 490 ± 5 nm y un filtro de emisión de 510 ± 5 nm. El lector de placas está dotado además de un dispensador que permite la inyección del agonista. La medición se puede realizar igualmente bien en un microscopio dotado de un iluminador de fluorescencia (p. ej., una lámpara de 100 W HBO) y un filtro de excitación de 480/30 nm, un espejo dicróico LP de 505 nm y un filtro de emisión de 535/40 nm. Se pipetea aprox. 50 perlas cubiertas con células BHK que expresan el receptor M1 ahora cargado con el indicador del Ca^{++} fluorescente Fluo-4 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se coloca la placa en un lector de placas de fluorescencia y se inyecta carbacol 1 μ M dando como resultado un aumento de la fluorescencia para las perlas de control negativo.

Este análisis se puede usar para rastrear los inhibidores del carbacol. Los resultados positivos son compuestos que inhiben el carbacol (agonista muscarínico M1).

La fig. 12 muestra la movilización del Ca^{++} intracelular en células BHK-M1 sobre perlas tratadas con carbamilcolina 100 μ M frente al control (tampón).

Ejemplo 14

Receptor unido a Gs (MC4R): Análisis de agonistas (Análisis del indicador Cre-GFP detectado con un lector de placas de fluorescencia o un equipo de generación de imágenes fluorescentes)

Cre-GFP

Cre-GFP se encuentra comercialmente disponible en Clontech (pCre-d2eGFP). El vector contiene tres copias de la secuencia de unión de Cre fusionadas con un promotor de tipo TATA. El vector porta un gen de resistencia a la neomicina. En la figura 3, se muestra un mapa del vector.

MC4R

Se introduce ADN que codifica el MC4R amplificado por PCR en el vector de entrada Gateway® (pENTR) mediante la unión mediada por topoisomerasa. Posteriormente, se recombina el ADN en el Vector de destino pDEST12.2 (pDEST12.2MC4R).

Establecimiento de la línea celular

Se transfectan células U2OS con pDEST12.2MC4R usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con G418 durante 4 semanas para obtener una línea celular que expresa establemente el MC4R. Se vuelve a transfectar la línea celular U2OS que expresa establemente el MC4R humano (receptor de melanocortina-4) con Cre-GFP el día de antes de cultivarla sobre perlas de PEGA que presentan el péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión, pero sin compuesto del banco), 2) control positivo (perlas de PEGA del ejemplo 2) y 3) compuestos del banco. Los tres cultivos son tratados por separado cada uno en su matraz de cultivo.

Preparación de las perlas/células

Se tripsinizan las células y se mezclan con las perlas de PEGA en medio de crecimiento (DMEM que contiene SFB al 10% en la proporción de 4.000 células/perla y aprox. 50 ml de medio de crecimiento/5.000 perlas).

- 1) Control positivo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control positivo + 2×10^7 células.
- 2) Control negativo: 50 ml de medio de crecimiento + 5.000 perlas de control negativo + 2×10^7 células.
- 3) Banco para el rastreo (p. ej., 100.000 compuestos): 1.000 ml de medio de crecimiento + 100.000 perlas del banco + 4×10^8 células.

ES 2 330 538 T3

Se colocan los tres matraces de cultivo sobre una plataforma de agitación magnética (Techne) diseñada para el cultivo celular en suspensión y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 16-24 horas usando un intervalo de centrifugación de 30 rpm, una agitación de 3 min y una pausa de 10 min. Se dejan sedimentar las perlas ahora cubiertas por células durante 10 min (no es necesaria la centrifugación) y se retira el medio de crecimiento usando una pipeta de 50 ml. Se añaden 10 ml de EtOH al 99% por cada 5.000 perlas, se mezcla suavemente y se deja durante 15 min. Se lavan las perlas con 10 ml de PBS/5.000 perlas x 3 permitiendo la sedimentación durante 10 min entre cada lavado. Ahora las células se conservan y se fijan a las perlas.

Análisis con un lector de placas

Se siembran perlas control, así como perlas del banco en placas negras de 384 pocillos (p. ej., Nunc) con el fondo claro a aprox. 20 perlas por pocillo. Se colocan los controles positivo y negativo en los pocillos destinados a ellos en dos veces por 4 duplicados en cada extremo de la placa. Control negativo = 20 perlas de control negativo; control positivo = una perla de control positivo + 19 perlas de control negativo. Se miden las placas en un lector de placas de fluorescencia (PolarStar Optima de BMG) usando un filtro de excitación de 490±6 nm y un filtro de emisión de 510±5 nm. Los pocillos con control positivo se usan para determinar la S_{max} (respuesta máxima) = 100% de actividad, y los pocillos con control negativo, para determinar la S_{min} (respuesta mínima) = 0% de actividad. Se recogen las perlas de los pocillos que muestran una actividad > 30% en un tubo para volver a realizar la siembra en una nueva placa de 384 pocillos, esta vez con una perla por pocillo. S_{min} = una perla de control negativo y S_{max} = una perla de control positivo. Se leen las placas en un lector de placas y se identifican las perlas con resultados usando el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Análisis de adquisición de imágenes

Se siembran perlas control, así como perlas del banco en placas negras de 384 pocillos (p. ej., Nunc) con el fondo claro a aprox. 20 perlas por pocillo. Se colocan las perlas de los controles positivo y negativo en los pocillos destinados a ellos en 2 veces por 4 duplicados en cada extremo de la placa. Control negativo = 20 perlas de control negativo; control positivo = una perla de control positivo + 19 perlas de control negativo. Se colocan las placas en un microscopio (Zeiss Axiovert 200M) dotado de filtros que permiten la generación de imágenes fluorescentes de eGFP (excitación: 490 nm; emisión: 510 nm), objetivo x10 y fase controlada. Se adquiere una imagen por cada pocillo seguida por el análisis de la imagen (Metamorph) para la identificación de las perlas con resultado (verde). Se siembran las perlas de los pocillos con resultado en una nueva placa de 384 pocillos que esta vez tiene una perla por pocillo. S_{min} = una perla de control negativo y S_{max} = una perla de control positivo. Se repite la adquisición de imágenes y el análisis descritos anteriormente, y se identifican las perlas con resultado finales.

Alternativamente, se siembran aproximadamente 5.000 perlas en un sistema de cubreobjetos compartimentados de Lab-Tech (n.º 155361; Nalge Nunc International), se realiza el análisis de adquisición de imágenes usando el equipo de fluorescencia descrito anteriormente y se aíslan las perlas individuales que presentan las propiedades de fluorescencia requeridas usando un sistema micromanipulador (Eppendorf Injectman NK). Se prefiere este procedimiento.

Ejemplo 14a

Rastreo de agonistas del receptor unido a Gs (MC4R) (análisis del indicador Cre-YFP detectado usando un microscopio de fluorescencia)

pCre-d2YFP

Se unen 732 pb de un fragmento EYFP de pd2EYFP-1 (n.º de cat. Clontech: 6912-1) con un fragmento de 3,5 kb de pCRE-d2EGFP (n.º de cat. Clontech 6034-1). Se escinden ambos fragmentos de los dos vectores mediante una digestión común con enzimas de restricción.

MC4R

Se introduce ADN que codifica el MC4R amplificado por PCR en el vector de entrada Gateway® (pENTR) mediante la unión mediada por topoisomerasa. Posteriormente, se recombina el ADN en el Vector de destino pDEST12.2 (pDEST12.2MC4R).

Establecimiento de la línea celular

Se cotransfectan células Hek293 con pDEST1.2.2MC4R y Cre-YFP (usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6), y se cultivan las células sobre perlas de PEGA que presentan péptido de adhesión y, respectivamente, 1) control negativo (perlas de PEGA con péptido de adhesión), 2) control positivo (perlas de PEGA del ejemplo 2), mezclando aprox. 400 perlas con 400.000 células en 1 ml de medio de Hams F12 que contiene SFB al 10% en un tubo Eppendorf de 1,8 ml. Se agitan suavemente los tubos cada 15 min durante 2 h. Se incuban las células/perlas en una incubadora de CO₂ (CO₂ al 5%; 37°C) durante 20 h. El nivel de la expresión de Cre-YFP fue detectado usando un microscopio Zeiss Axiovert 200M dotado de filtros apropiados para la detección de la YFP (excitacoPm 500/20 nm; dicróico 515 LP EM 535/30).

ES 2 330 538 T3

Se observó una mayor señal para las células Hek293 células en comparación con las células U2OS, y por ello se usaron la Hek293 para los experimentos posteriores (véase la Fig. 13).

Rastreo del banco

Síntesis del banco y perlas control

Se sintetizaron dos bancos según los ejemplos 6a y 6b. Las perlas control fueron sintetizadas según lo descrito en el ejemplo 5a, apartado “Síntesis del péptido de adhesión”.

Establecimiento de la línea celular

Se cotransfectan células Hek293 con pDEST1.2.2MC4R y pCRE-d2EYFP, y se ponen bajo la selección con G418 durante 3 semanas. Después de ello, se clasificaron las células mediante FACS (clasificación de perlas activadas por fluorescencia) en cuanto a una expresión alta de la YFP tras la estimulación con aMSH 100 nM y TSA 0,4 μ M (tricostatina A) durante 20 h. Se extendieron las células y se subcultivaron durante 2 meses, tras lo que se volvió a realizar una clasificación mediante FACS en cuanto a la alta expresión de la YFP inducida por aMSH/TSA.

Preparación de las perlas/células

Las células fueron cultivadas, respectivamente, sobre 1) perlas de control negativo (preparadas según lo descrito en el ejemplo 1); 2) perlas de control positivo (preparadas según lo descrito en el ejemplo 2) y perlas del banco (preparadas según lo descrito en el ejemplo 6b). Cada lote de perlas fue tratado por separado. Se tripsinizaron las células y se mezclaron con perlas de control negativo/perlas de control positivo/perlas del banco en medio de crecimiento (Hams F12 que contiene SFB al 5%):

Perlas control

- Se añaden 500 perlas en 500 μ l de Hams a un tubo Nunc de 14 ml.
- Se añaden 2.500 μ l de suspensión celular de 1×10^6 /ml de Hams con SFB al 5%.
- Se deja el tubo verticalmente en una incubadora (37°C, CO₂ al 5%) durante 16-24 h. Se mece el tubo suavemente cada 15 min durante la primera hora.
- Se retira el medio. Se lavan las células sueltas suavemente añadiendo y retirando 4 ml de Hams x 2 (se vuelve a hacer girar el tubo hacia arriba y hacia abajo. En cuanto las perlas se hayan sedimentado, se extrae el medio).
- Se añaden 2 ml de Hams con SFB al 5% y TSA (tricostatina A) 0,4 μ M.
- Se incuba o/n a 37°C, CO₂ al 5%.
- Se decantan las perlas en un portaobjeto compartimentado de Lab-Tek de 1 pocillo (n.º 155361).

Perlas del banco

- Se añaden 10.000 perlas en 500 μ l de Hams a un tubo Nunc de 50 ml.
- Se añaden 25 ml de suspensión celular de 2×10^6 /ml de Hams con SFB al 5%.
- Se deja el tubo verticalmente en una incubadora (37°C, CO₂ al 5%) durante 16-24 h. Se mece el tubo suavemente cada 15 min durante la primera hora.
- Se retira el medio. Se lavan las células sueltas suavemente añadiendo y retirando 25 ml de Hams x 2 (se vuelve a hacer girar el tubo hacia arriba y hacia abajo. En cuanto las perlas se hayan sedimentado, se extrae el medio).
- Se añaden 25 ml de Hams con SFB al 5% y TSA (tricostatina A) 0,4 μ M.
- Se incuba o/n a 37°C, CO₂ al 5%.
- Se decantan las perlas en 2 portaobjetos compartimentados de Lab-Tek de 1 pocillo (n.º 155361).

Identificación y aislamiento de resultados

Se colocó el portaobjeto compartimentado de 1 pocillo de Lab-Tek en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 dotado de filtros óptimos para la fluorescencia de la YFP. El microscopio estaba dotado además de un

ES 2 330 538 T3

micromanipulador (Eppendorf Transferman NK2) capaz de recoger las perlas individuales. Con cámaras de objetivos x10, se rastrearon las perlas con resultados positivos que aparecían como perlas con puntos verdes producidos por las células que expresaban Cre-YFP. Se usaron perlas de control positivo y negativo para establecer el corte para las perlas de resultados positivos. Tales perlas con resultados fueron recogidas usando un micromanipulador para un posterior análisis en un análisis de especificidad (interiorización del receptor) antes de la dilucidación de la estructura final. Para esta campaña de rastreo, se prefiere la detección con un microscopio. El rendimiento de este procedimiento basado en microscopía fue de aprox. 40.000 perlas al día. Se rastrearon 90.000 perlas en total. Se identificaron y se aislaron 35 resultados, de los cuales se dilucidó la estructura de y se volvieron a sintetizar 15.

En la Fig. 14, se muestra una señal obtenida de una sub-fracción de los resultados identificados.

Dilucidación de la estructura y repetición de la síntesis

Se dilucida la estructura de las perlas con resultados usando el procedimiento descrito en el ejemplo 15. Como ejemplo ilustrativo, se describe la identificación del resultado denominado TEN-636-33-26 en el ejemplo 15b. Se pueden identificar otros resultados usando un procedimiento similar.

Rastreo de la especificidad

Se analizan los resultados para la especificidad del receptor MC4 usando una línea celular Hek293 que expresa establemente el MC4R-GFP según lo descrito en el ejemplo 7a en el apartado del establecimiento de la línea celular. Se siembran las células en Hams F12 con SFB al 10% en un portaobjeto compartimentado de Lab-Tek de 8 pocillos para proporcionar una confluencia del 75% 24 h después de la siembra. Se desafían las células con compuestos con resultados durante 30 min a 37°C. Se coloca la cámara en un Zeiss Axiovert 200M dotado de filtros adaptados a la fluorescencia de GFP y se examinan las células en cuanto a la interiorización de MC4R-GFP usando una adquisición de imágenes (x20) seguida de un análisis de las imágenes. Los controles negativo y positivo son respectivamente Hams F12 y α MSH 100 nM.

Rastreo de la selectividad (interiorización del receptor β 2-adrenérgico (β 2-AR)-GFP)

Se siguen analizando los resultados en cuanto a la selectividad del receptor usando una línea celular Hek293 que expresa establemente el receptor β 2-adrenérgico fusionado con GFP (β 2-AR-GFP). Se analizan las células según lo descrito anteriormente en cuanto a la “Determinación de la especificidad”. Los resultados específicos de MC4R son aquellos que muestran una respuesta positiva en el análisis del indicador Cre-YFP, una respuesta positiva en el análisis de interiorización de MC4R-GFP (especificidad) y una respuesta negativa en el análisis de interiorización de β 2-AR-GFP (selectividad).

Ejemplo 15

Identificación del compuesto

Una vez seleccionada una perla de resina, se identifica el compuesto comprendido en la perla. Se trata la perla de resina individual seleccionada con NaOH acuoso 0,1M (10 μ l) en un tubo Eppendorf de 0,5 ml durante una noche, luego se diluye con CH₃CN (20 μ l), antes de filtrar la solución, proporcionando así una muestra para el análisis de ES EM/EM en un espectrómetro de masas para Q-TOF Global Ultima de MicroMass (fase móvil de CH₃CN al 50% (ac.), 0,1 μ l/min), empleando un ascenso lineal de la energía de colisión. Se analizan los espectros generando las diferencias de las masas exactas entre los iones de los fragmentos y se tabulan para proporcionar la ruta de fragmentación, y a partir de ahí, se dilucida la estructura del compuesto liberado desde la perla seleccionada.

Ejemplo 15b

Identificación del resultado TEN-636-33-26 (procedente del banco preparado según lo descrito en el ejemplo 6b) del análisis del GPCR

Los resultados seleccionados del análisis del GPCR exigen una asignación inequívoca de la estructura. Se prefiere la pureza elevada de los compuestos generados sobre el soporte sólido durante la síntesis del banco para el análisis de perlas individuales. Por ejemplo, para la química utilizada en el ejemplo 6a-b (patente indsat evt. ref til scaffold), se ha demostrado que las cantidades del material escindido de la síntesis individual y de las perlas del banco se pueden analizar e identificar mediante EM/EM Q-TOF (ES). Primero se detecta la señal procedente del ión molecular (M+H), y luego se lleva a cabo una EM/EM para obtener un patrón de fragmentación específico.

Se lava un resultado (perla) seleccionado en el análisis (figura 15a) cuidadosamente con TFA (ac.) al 10% y agua MiliQ mediante sucesivas series de decantación. Se coloca la perla en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se trata con NaOH 0,1M (3 ml) preparado del modo habitual a partir de sedimentos de NaOH sólidos y agua MiliQ. Se efectúa una hidrólisis durante 2 a 24 h en un tubo cerrado herméticamente. Tras la hidrólisis, se añade HCl 0,1M (3 ml) para neutralizar la mezcla de escisión alcalina, seguido de la adición de agua MiliQ (40 μ l). Antes de la carga, se lavaron

cuidadosamente los pocillos de la placa de elución OASIS con 3 x CH₃CN:H₂O (4:1; HCOOH al 0,1%), luego con 3 x H₂O (HCOOH al 0,1%) y con 3 x H₂O. Se carga el pocillo seleccionado con la solución de muestra aplicando una succión suave. Entonces se lavan las sales con agua (70 µl) y HCOOH al 0,1% (70 ml), antes de eluir el compuesto con CH₃CN:H₂O (4:1; HCOOH al 0,1%) (200 µl). Se retira el eluyente sobre el Speed-Vac® y se eleva el residuo resultante en CH₃CN:H₂O (19:1; TFA al 0,05%) (50 µl) antes del análisis mediante CL/EM-EM Q-TOF (figura 15b).

Identificación del compuesto (procedente de los bancos descritos en los ejemplos 6a-b)

Los bancos que contienen andamios heterocíclicos unidos a secuencias peptídicas (véanse los ejemplos 6a-b) son de gran aplicación en el análisis de perlas individuales por EM/EM (material escindido de perlas individuales del banco). Esta clase de compuesto presenta generalmente una propensión alta a proporcionar fragmentos detectables únicos correspondientes a las estructuras nucleares de andamio heterocíclico. Mediante el reconocimiento de este máximo en el análisis de EM/EM del ión molecular anticipado y en base a la tendencia general de los péptidos a fragmentarse por los enlaces amida, está surgiendo un patrón de fragmentación predecible (véase la figura 16), pues cada posición de aminoácido aleatorizada es ofrecida por su masa única (con pares de leucina/isoleucina y glutamina/lisina como las únicas excepciones).

Ejemplo 16

Receptores GPCR múltiples

Receptor β2-adrenérgico (β2AR)-GFP (para estudios de interiorización)

Se transfectan células Hek293 con receptor β2-adrenérgico (β2AR)-GFP usando un procedimiento estándar para la transfección con FuGene 6. Se ponen las células bajo la selección con zeocina durante 4 semanas para obtener una línea celular que exprese establemente el receptor β2-adrenérgico (β2AR)-GFP.

Preparación de las perlas/células

Se siembran células Hek293 que expresan establemente β2AR-GFP en un portaobjeto compartimentado de 8 pocillos Nunc en Hams F12 con SFB al 10%, y se incuban a 37°C, CO₂ al 5% durante 20 horas. Se estimulan las células con isoproterenol 100 uM (control positivo) y con medio (control negativo) durante 30 min. Se generan imágenes de las células en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M dotado de filtros óptimos para GFP. Para el control negativo, el receptor β2-adrenérgico (β2AR)-GFP se ubica en la membrana, mientras que para el control positivo el receptor β2-adrenérgico (β2AR)-GFP se ubica en puntos intracelulares como indicio de la activación del receptor y la posterior interiorización.

Los compuestos que modulan el β2AR se pueden identificar de una manera similar mediante el crecimiento de las células anteriormente mencionadas sobre perlas de resina que comprenden compuestos del banco, tales como las perlas de resina usadas en el ejemplo 14a.

Abreviaturas

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

NGF: Factor de crecimiento nervioso

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

GH: Hormona del crecimiento

TRE: Elemento de respuesta al ATP

SRE: Elemento de respuesta al suero

CRE: Elemento de respuesta al AMPc

AcN: acetonitrilo

Boc: *tert*-butoxicarbonilo

But: *tert*-butilo

ES 2 330 538 T3

DCM: diclorometano

DMF: dimetilformamida

5 Fmoc: 9-fluorenilmetoxycarbonilo

HMBA: Ácido 4-hidroximetilbenzoico

10 EM Q-TOF: Espectrometría de masas por tiempo de vuelo y cuádruplo

Melm: *N*-metil-imidazol

MSNT: 1-(mesitilen-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol

15 NEM: 4-etil-morfolina

PEGA: Resina de polietilenglicol-polidimetilacrilamida

20 Pfp: pentafluorofenilo

Pmc: 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo

CLAR en fase inversa: Cromatografía en fase líquida de alta resolución en fase inversa

25 SPPS: Síntesis de péptidos en fase sólida

TBTU: *O*-(benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrafluoroborato de tetrametiluronio

30 TFA: Ácido trifluoro-acético

Thi: tienilo

Fur: furanilo

35 BzThi: benzotienilo

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un compuesto que modifica al menos una respuesta celular, estando cada respuesta celular ligada a diferentes sistemas indicadores que generan resultados detectables, dicho procedimiento comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar múltiples soportes sólidos capaces de mantener la adherencia y el crecimiento de células, estando cada soporte sólido acoplado a un miembro de un banco de compuestos de prueba y comprendiendo al menos dos soportes sólidos diferentes miembros del banco; y
 - (b) unir las células que comprenden dicho(s) sistema(s) indicador(es) sobre dicho soporte sólido; en el que
 - las células están unidas directamente al soporte sólido y/o
 - al menos el 10% de los soportes sólidos comprende moléculas de adhesión celular, así como dicho miembro del banco, y las células se adhieren a dichas moléculas de adhesión celular; y
 - (c) rastrear dichos soportes sólidos en cuanto a los soportes sólidos que comprenden células que cumplen al menos un criterio de selección predeterminado, estando dicho criterio de selección ligado directa o indirectamente a dicho resultado detectable; y
 - (d) seleccionar los soportes sólidos que comprenden células que cumplen dicho al menos un criterio de selección; e
 - (e) identificar dicho miembro del banco, identificando de ese modo un compuesto que modifica dicha al menos una respuesta celular.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha adherencia está mediada por un compuesto de adhesión celular acoplado a dicho soporte sólido, compuesto de adhesión celular que permite a dicho soporte sólido mantener el crecimiento de células.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que los soportes sólidos son perlas de resina.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que los soportes sólidos son zonas o regiones sobre una superficie o un gel emplacado o una membrana.
5. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho compuesto de adhesión celular es un péptido con una carga neta global positiva.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho compuesto de adhesión celular se selecciona del grupo constituido por SEC ID: 1, SEC ID: 2, SEC ID: 3, SEC ID: 4, SEC ID: 5, SEC ID: 6, SEC ID: 7, SEC ID: 8, SEC ID: 9, SEC ID: 10, SEC ID: 11, SEC ID: 12, SEC ID: 13, SEC ID: 14, SEC ID: 15, SEC ID: 16, SEC ID: 17, SEC ID: 18, SEC ID: 19, SEC ID: 20, SEC ID: 21, SEC ID: 22, SEC ID: 23, SEC ID: 24, SEC ID: 25, SEC ID: 26, SEC ID: 27, SEC ID: 28, SEC ID: 29, SEC ID: 30, SEC ID: 31, SEC ID: 32, SEC ID: 33, SEC ID: 34, SEC ID: 35, SEC ID: 46, SEC ID: 47, SEC ID: 48, SEC ID: 49, SEC ID: 50, SEC ID: 51, SEC ID: 52, SEC ID: 53, SEC ID: 54, SEC ID: 55, SEC ID: 56, SEC ID: 57, SEC ID: 58, SEC ID: 59, SEC ID: 60, SEC ID: 61, SEC ID: 62, SEC ID: 63, SEC ID: 64, SEC ID: 65, SEC ID: 66, SEC ID: 67, SEC ID: 68, SEC ID: 69 y SEC ID: 70.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta celular es la modulación de una ruta de transducción de señales mediada por una molécula de la superficie celular.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha molécula de la superficie celular es un receptor unido a la proteína G (GPCR).
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho GPCR se selecciona del grupo constituido por los GPCR de la tabla 3.
10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la respuesta celular es la modulación de la actividad transcripcional.
11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la respuesta celular es un cambio en el nivel intracelular de un compuesto.
12. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la respuesta celular es la reubicación de un compuesto.

ES 2 330 538 T3

13. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el sistema indicador es un sistema endógeno a dichas células.

14. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el sistema indicador comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta, cuya actividad está modulada por la respuesta celular.

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y 14, en el que el sistema indicador comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta seleccionado del grupo constituido por elemento de respuesta al AMPc (CRE) y elemento de respuesta al suero (SER).

16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y 14, en el que el sistema indicador comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable ligado operativamente a un elemento de respuesta transcripcional (TRE).

17. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho polipéptido detectable se selecciona del grupo constituido por proteínas fluorescentes y enzimas.

18. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el sistema indicador comprende un resto bioluminescente.

19. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que un criterio de selección predeterminado es un nivel cuantitativo de dicha bioluminiscencia por encima o por debajo de un umbral específico.

20. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el criterio de selección predeterminado es la ubicación específica de una señal fluorescente.

21. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células son seleccionadas del grupo constituido por células de mamífero.

22. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 y 14 a 16, en el que las células unidas a las perlas de resina comprenden un ácido nucleico que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica dicha molécula de la superficie celular ligada operativamente con una segunda secuencia de nucleótidos que no está asociada de manera natural con ella, dirigiendo la expresión de dicha primera secuencia.

23. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se proporcionan al menos 100 perlas de resina que comprenden diferentes miembros del banco.

24. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el banco se selecciona del grupo constituido por bancos de oligómeros naturales, tales como péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN) u oligosacáridos; oligómeros no naturales, tales como péptidos, glicopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN) u oligosacáridos modificados químicamente; y moléculas orgánicas pequeñas.

25. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el banco es un banco de moléculas orgánicas pequeñas.

26. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que se identifican compuestos que modifican al menos dos respuestas celulares, en el que la etapa c) implica el rastreo de dichas perlas de resina en busca de las perlas que comprenden células que cumplen al menos dos criterios de selección predeterminados, estando cada criterio de selección ligado a un resultado detectable diferente.

27. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la perla de resina comprende o consta de polietilenglicol.

28. Un compuesto de adhesión celular seleccionado bien entre:

i) el grupo constituido por péptidos de: SEC ID: 1, SEC ID: 2, SEC ID: 3, SEC ID: 4, SEC ID: 5, SEC ID: 6, SEC ID: 7, SEC ID: 8, SEC ID: 9, SEC ID: 10, SEC ID: 11, SEC ID: 12, SEC ID: 13, SEC ID: 14, SEC ID: 15, SEC ID: 16, SEC ID: 17, SEC ID: 18, SEC ID: 19, SEC ID: 20, SEC ID: 21, SEC ID: 22, SEC ID: 23, SEC ID: 26, SEC ID: 27, SEC ID: 28, SEC ID: 29, SEC ID: 30, SEC ID: 31, SEC ID: 32, SEC ID: 33, SEC ID: 34, SEC ID: 35, SEC ID: 46, SEC ID: 47, SEC ID: 48, SEC ID: 49, SEC ID: 50, SEC ID: 51, SEC ID: 52, SEC ID: 53, SEC ID: 54, SEC ID: 55, SEC ID: 56, SEC ID: 57, SEC ID: 58, SEC ID: 59, SEC ID: 60, SEC ID: 61, SEC ID: 62, SEC ID: 63, SEC ID: 64, SEC ID: 65, SEC ID: 66, SEC ID: 67, SEC ID: 68, SEC ID: 69 y SEC ID: 70; o

ii) un péptido que comprende al menos un aminoácido en forma D, siendo dicho péptido seleccionado del grupo constituido por SEC ID: 1, SEC ID: 2, SEC ID: 3, SEC ID: 4, SEC ID: 5, SEC ID: 6, SEC ID: 7, SEC ID: 8, SEC ID: 9, SEC ID: 10, SEC ID: 11, SEC ID: 12, SEC ID: 13, SEC ID: 14, SEC ID: 15, SEC ID: 16, SEC ID: 17, SEC ID: 18, SEC ID: 19, SEC ID: 20, SEC ID: 21, SEC ID: 22, SEC ID: 23, SEC ID: 24, SEC ID: 25, SEC ID: 26, SEC ID: 27, SEC ID: 28, SEC ID: 29, SEC ID: 30, SEC ID: 31, SEC ID: 32,

ES 2 330 538 T3

SEC ID: 33, SEC ID: 34, SEC ID: 35, SEC ID: 46, SEC ID: 47, SEC ID: 48, SEC ID: 49, SEC ID: 50, SEC ID: 51, SEC ID: 52, SEC ID: 53, SEC ID: 54, SEC ID: 55, SEC ID: 56, SEC ID: 57, SEC ID: 58, SEC ID: 59, SEC ID: 60, SEC ID: 61, SEC ID: 62, SEC ID: 63, SEC ID: 64, SEC ID: 65, SEC ID: 66, SEC ID: 67, SEC ID: 68, SEC ID: 69 y SEC ID: 70.

5

29. Una perla de resina que comprende un compuesto de adhesión celular seleccionado del grupo constituido por SEC ID: 1, SEC ID: 2, SEC ID: 3, SEC ID: 4, SEC ID: 5, SEC ID: 6, SEC ID: 7, SEC ID: 8, SEC ID: 9, SEC ID: 10, SEC ID: 11, SEC ID: 12, SEC ID: 13, SEC ID: 14, SEC ID: 15, SEC ID: 16, SEC ID: 17, SEC ID: 18, SEC ID: 19, SEC ID: 20, SEC ID: 21, SEC ID: 22, SEC ID: 23, SEC ID: 24, SEC ID: 25, SEC ID: 26, SEC ID: 27, SEC ID: 28; SEC ID: 29, SEC ID: 30, SEC ID: 31, SEC ID: 32, SEC ID: 33, SEC ID: 34, SEC ID: 35, SEC ID: 46, SEC ID: 47, SEC ID: 48, SEC ID: 49, SEC ID: 50, SEC ID: 51, SEC ID: 52, SEC ID: 53, SEC ID: 54, SEC ID: 55, SEC ID: 56, SEC ID: 57, SEC ID: 58, SEC ID: 59, SEC ID: 60, SEC ID: 61, SEC ID: 62, SEC ID: 63, SEC ID: 64, SEC ID: 65, SEC ID: 66, SEC ID: 67, SEC ID: 68, SEC ID: 69 y SEC ID: 70.

10

15 30. La perla de resina según la reivindicación 29, en la que dicha perla de resina comprende polietilenglicol.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1A

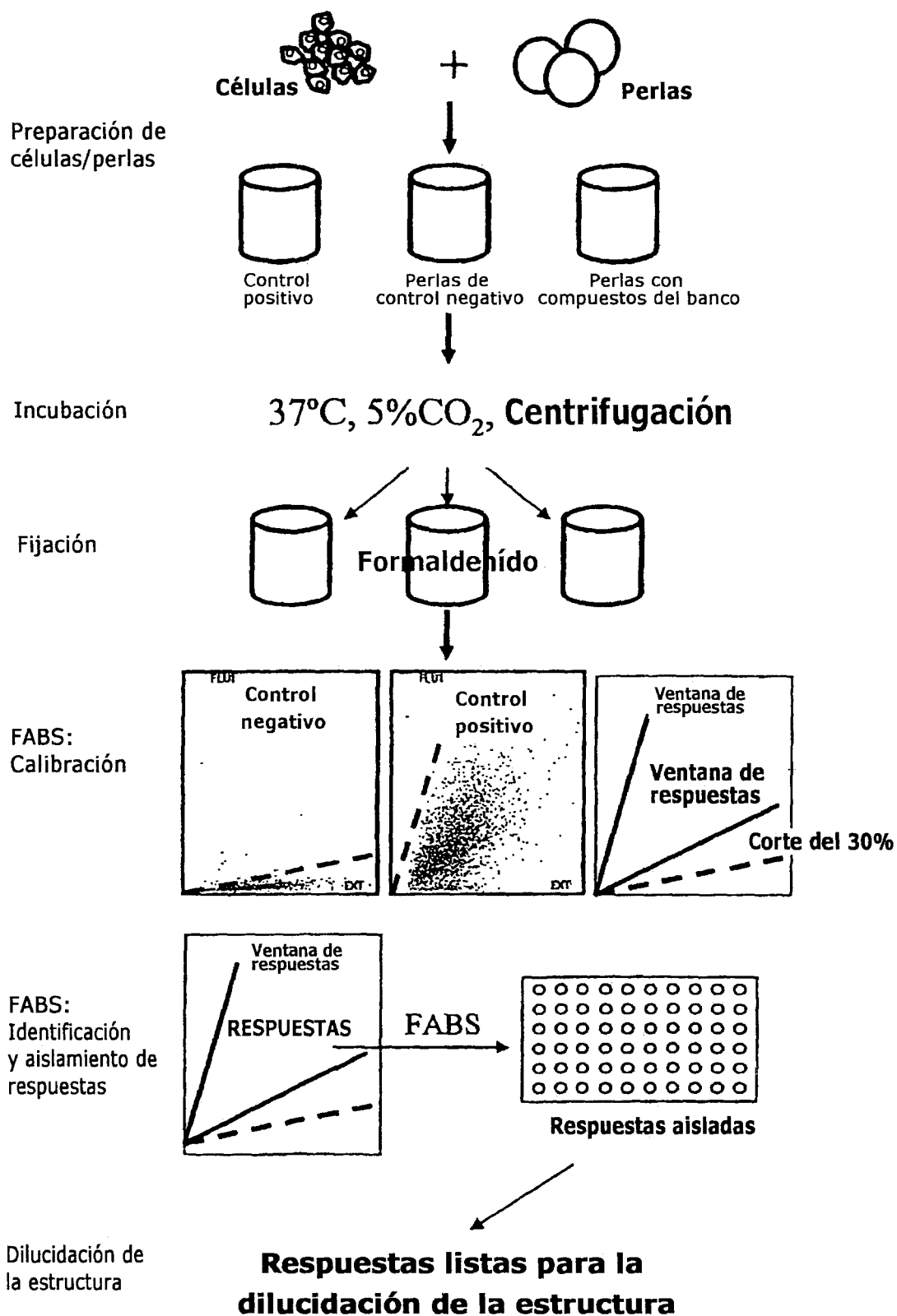


Fig. 2A

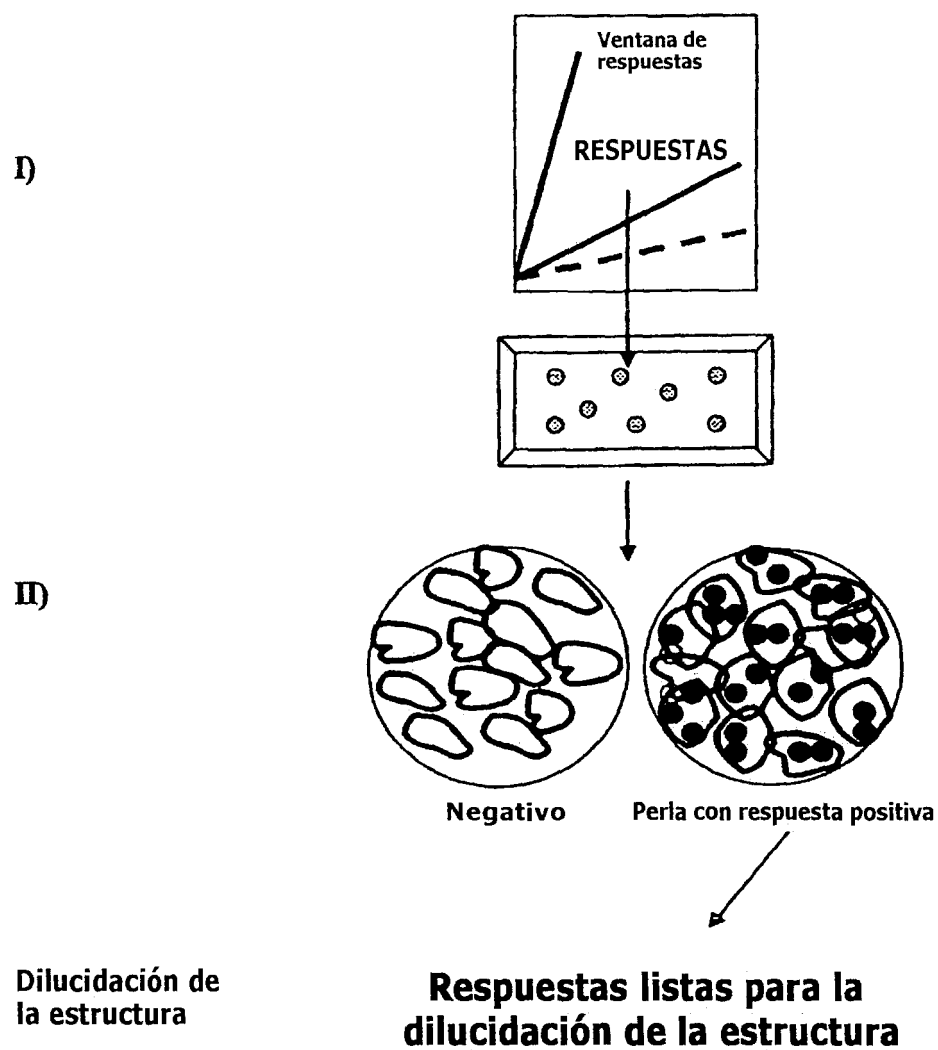
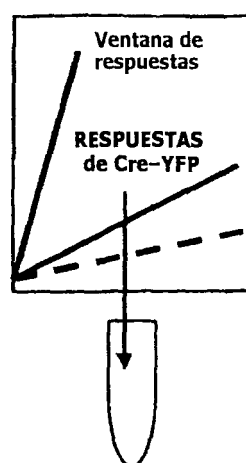
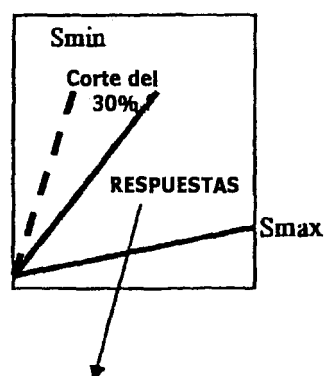


Fig. 2B

I)



II)



Dilucidación de la estructura

Respuestas listas para la dilucidación de la estructura

Fig. 3

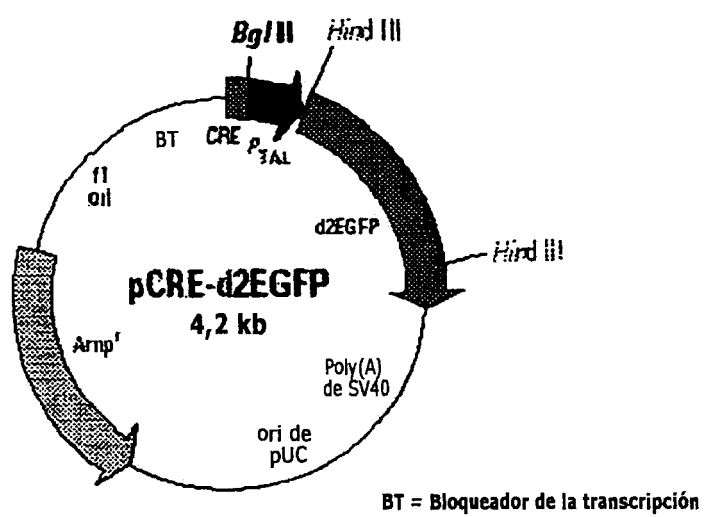
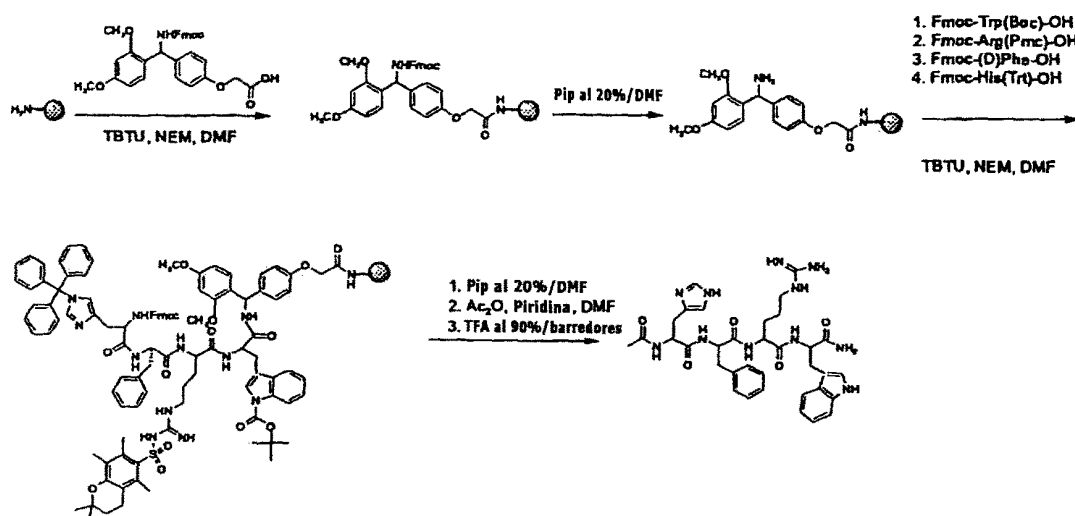


Fig. 4

A



B

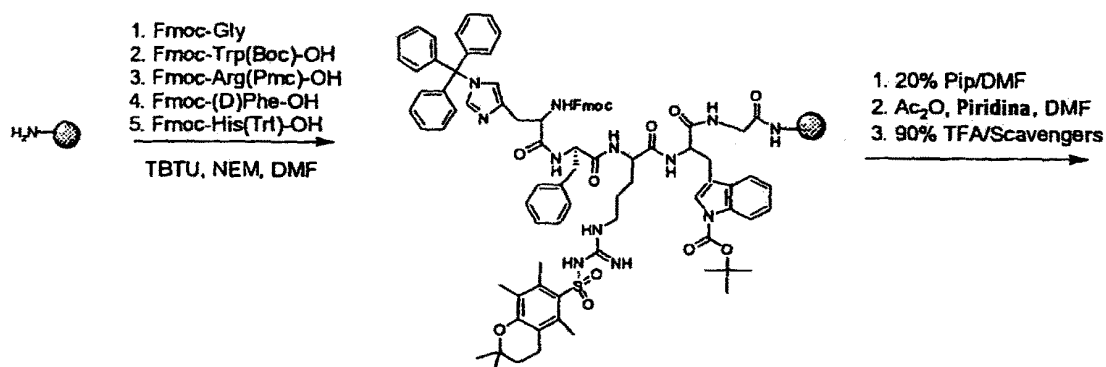
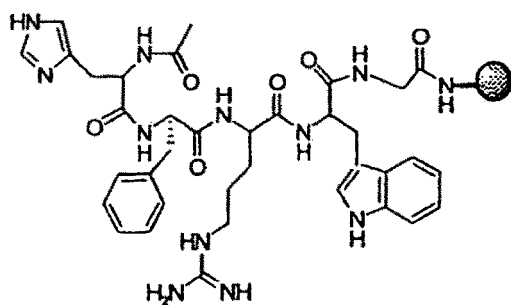


Fig. 4 (cont.)



C

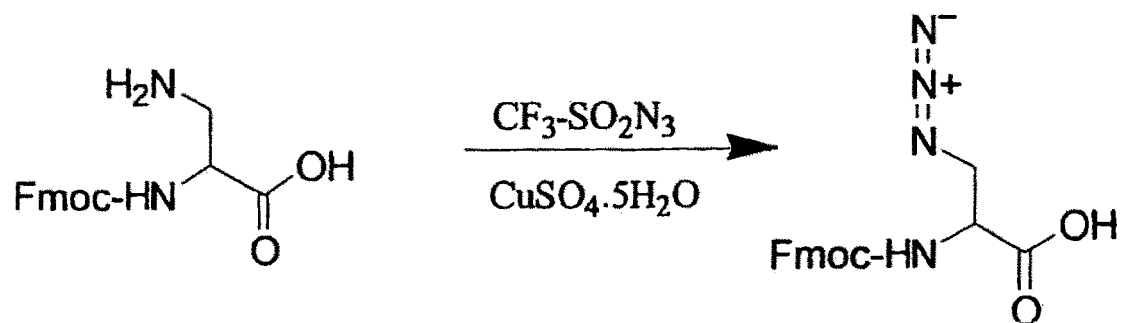
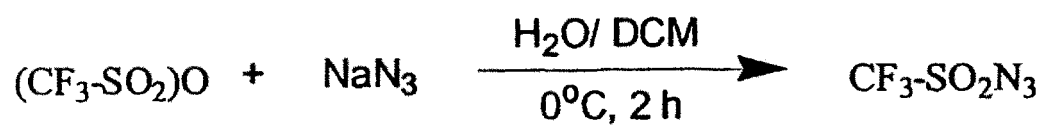


Fig. 5A

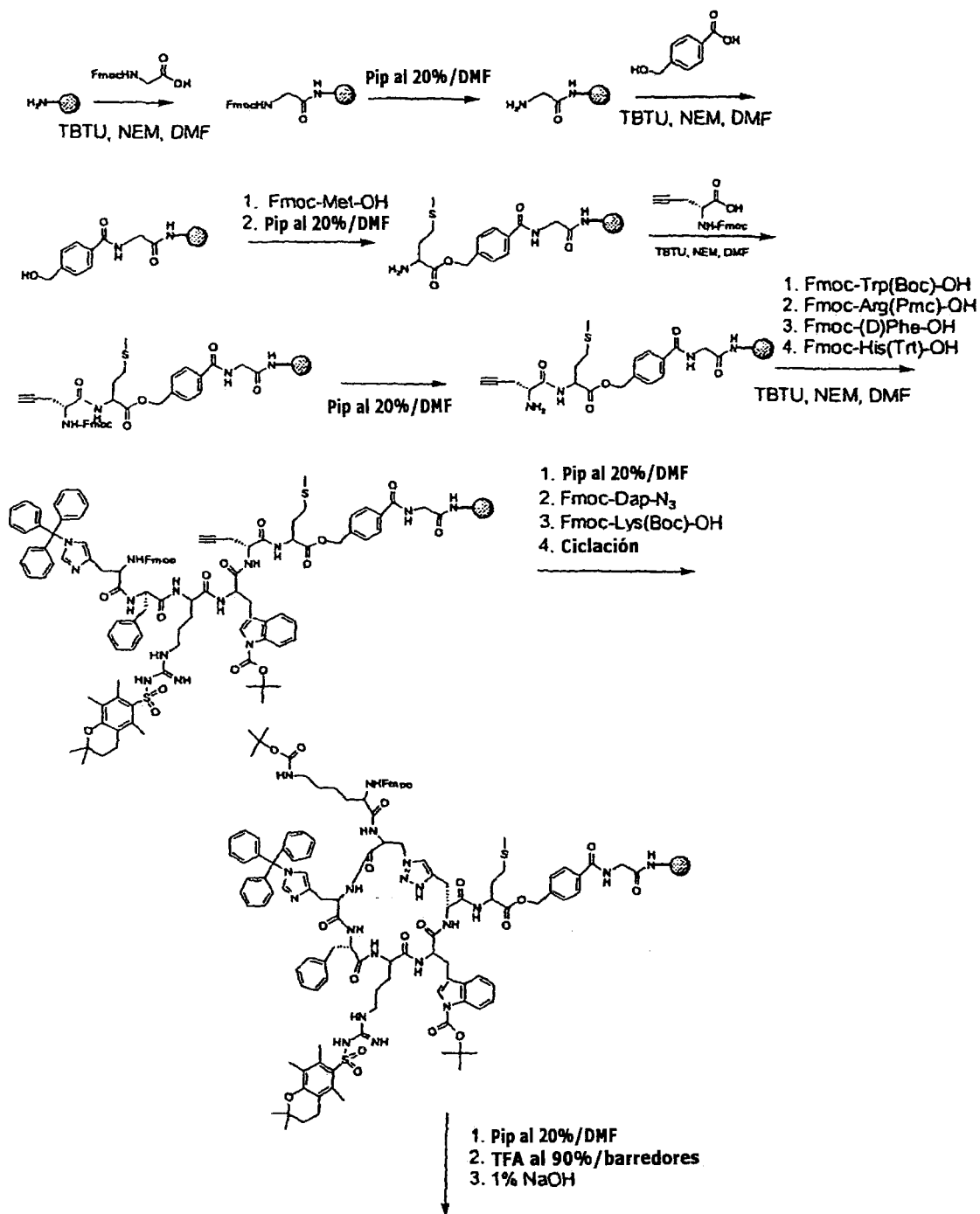


Fig. 5A (cont.)

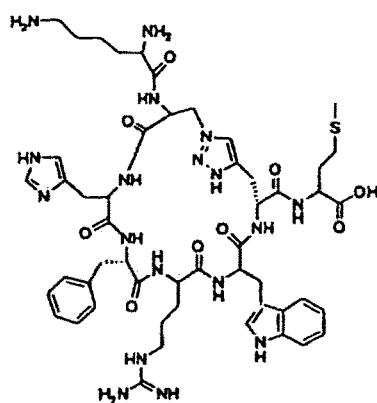


Figura 5B

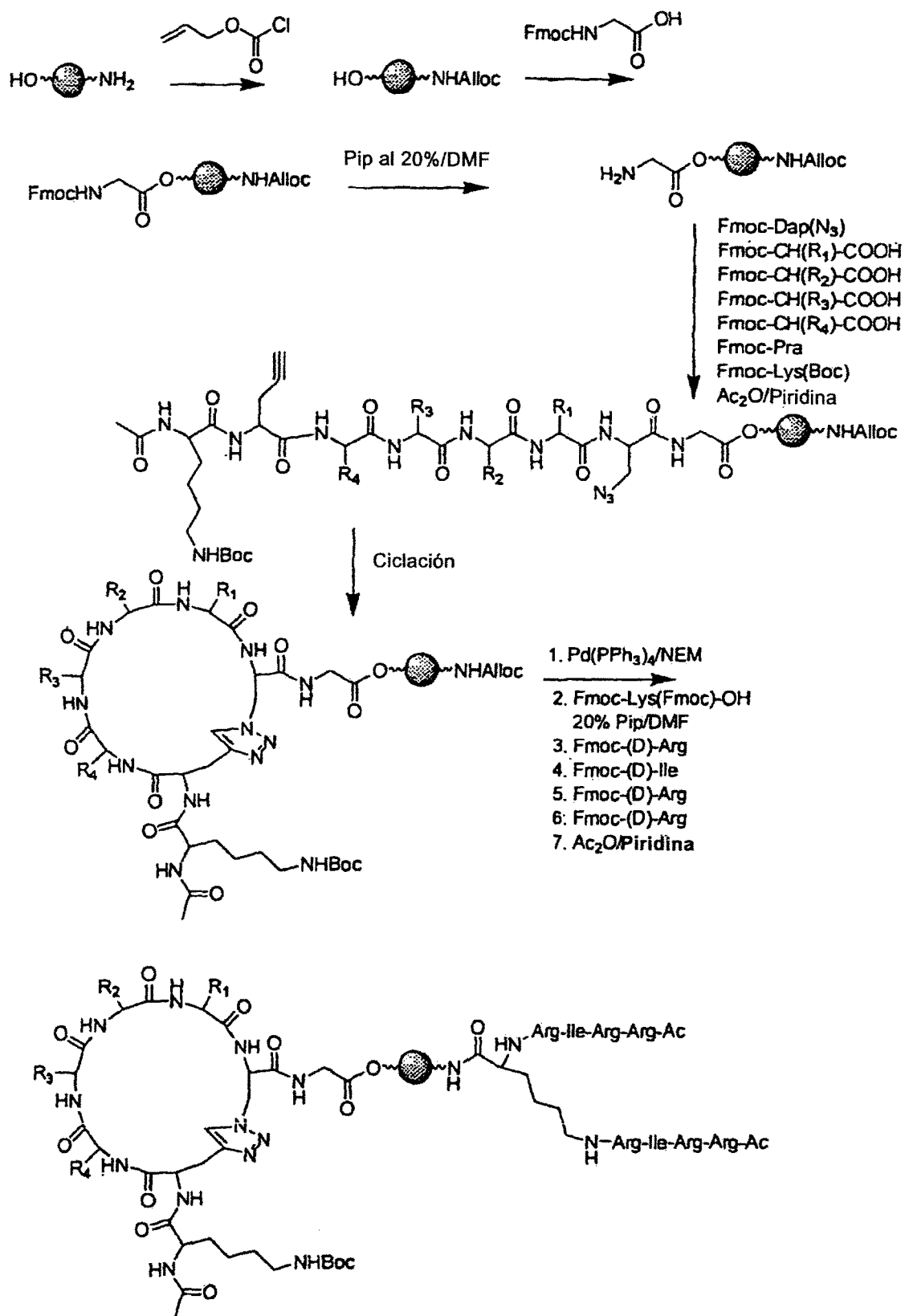


Fig. 6a

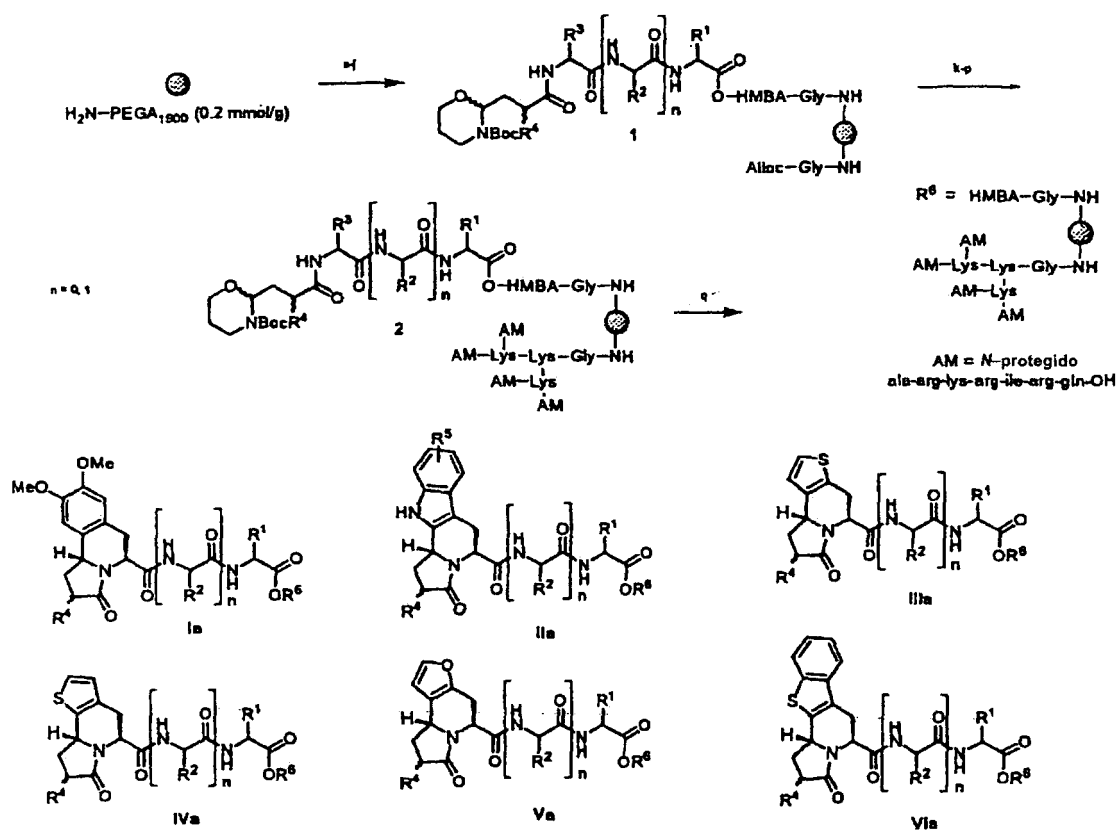


Fig. 6b

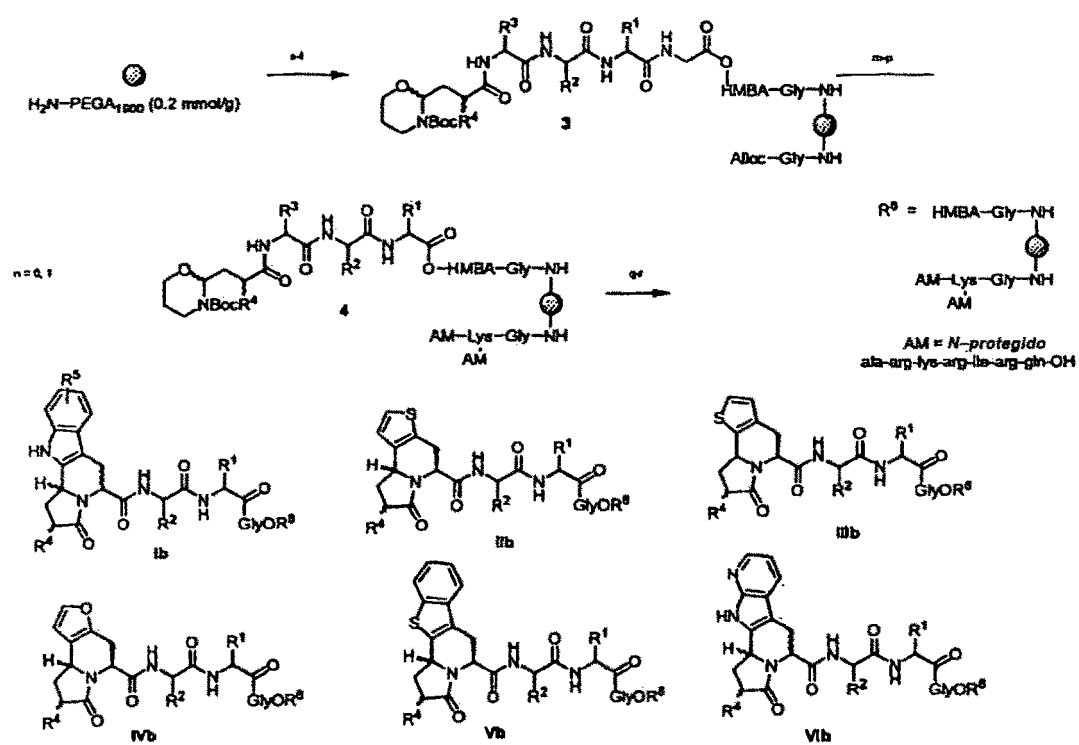


Fig. 7

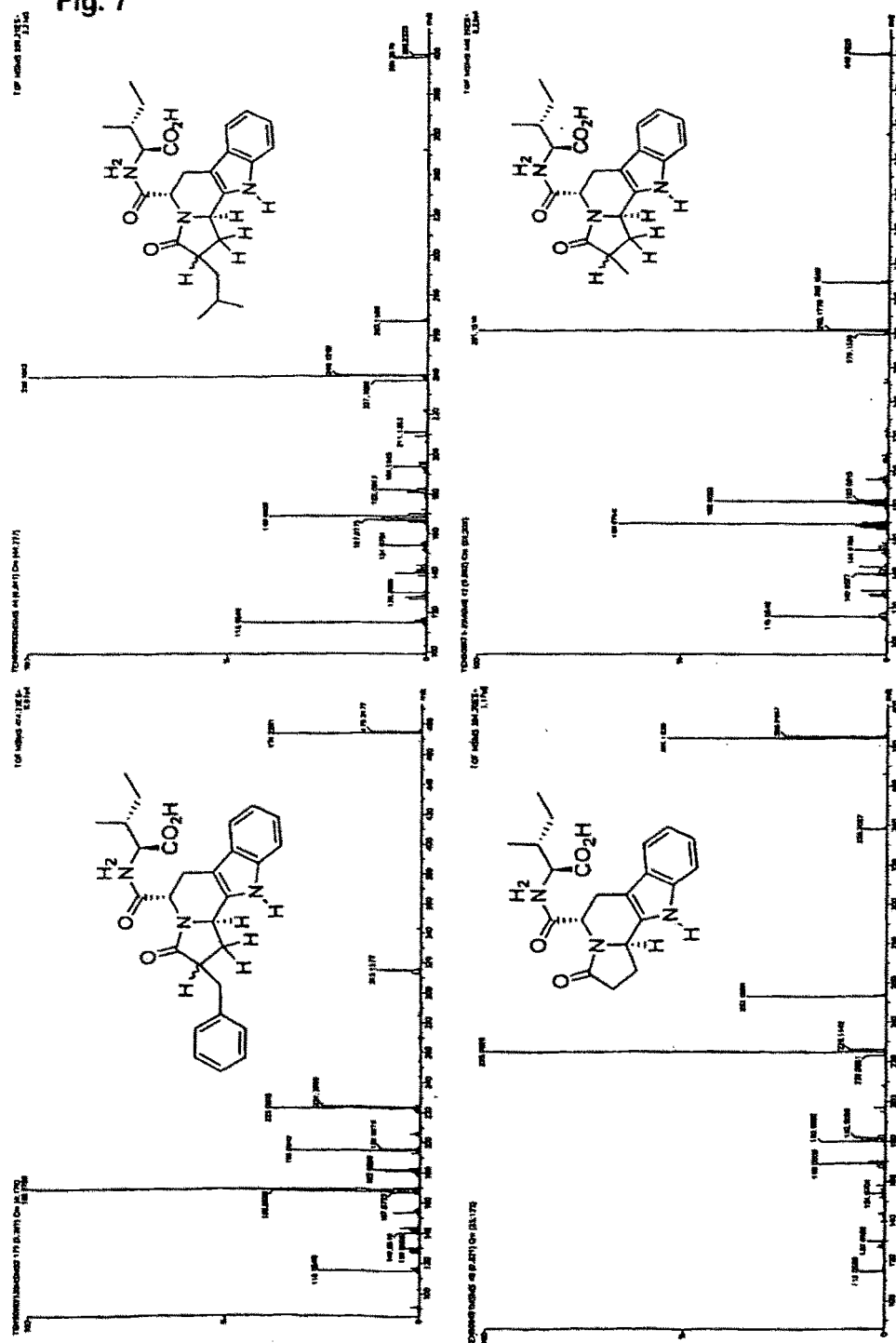


Fig. 8

Ten506671						
					Diferencia	Calc.
440,2372	309,1569	281,1514	182,0832	169,0765		440,2549
309,1569	131,0803				-0,0177	131,0946
281,1514	169,0868	28,0056			-0,0143	
182,0832	258,154	127,0737	99,0682		-0,0037	159,0895
169,0765	271,1607	140,0804	112,0749	13,0067	-0,0022	127,0759
115,0546	325,1826	194,1023	166,0968	67,0286	-0,0013	112,0762
				116,0646	-0,0136	67,0422
				115,0548	-0,0002	115,0548

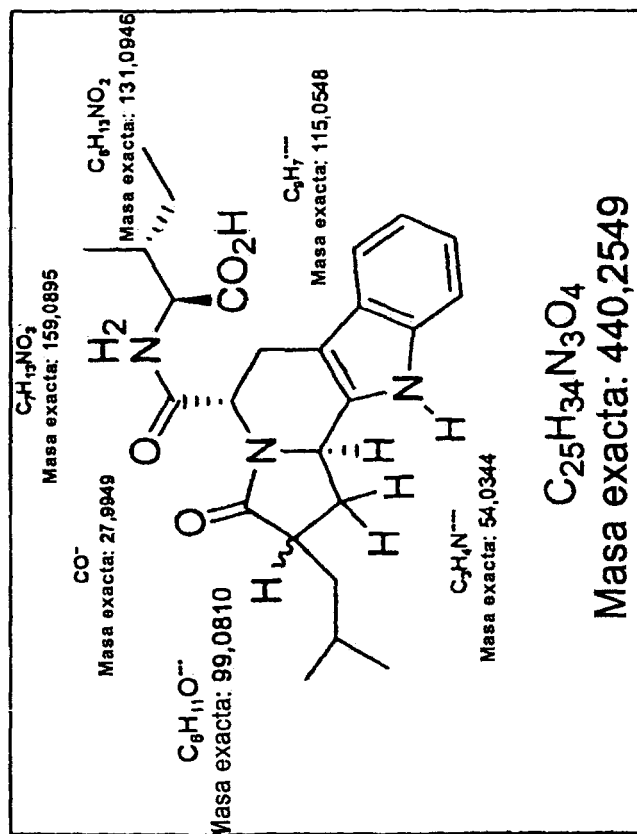
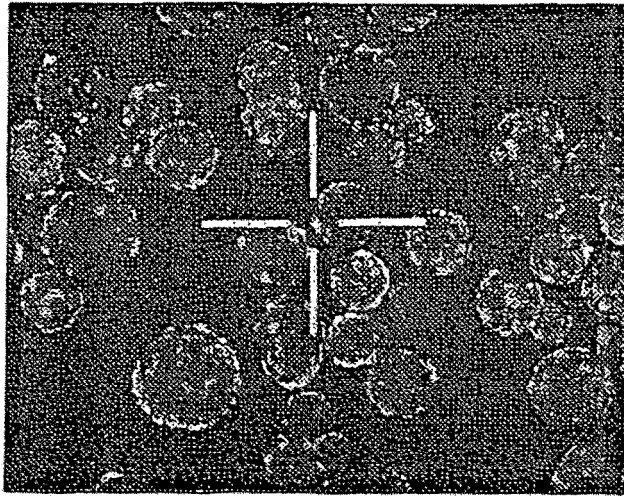
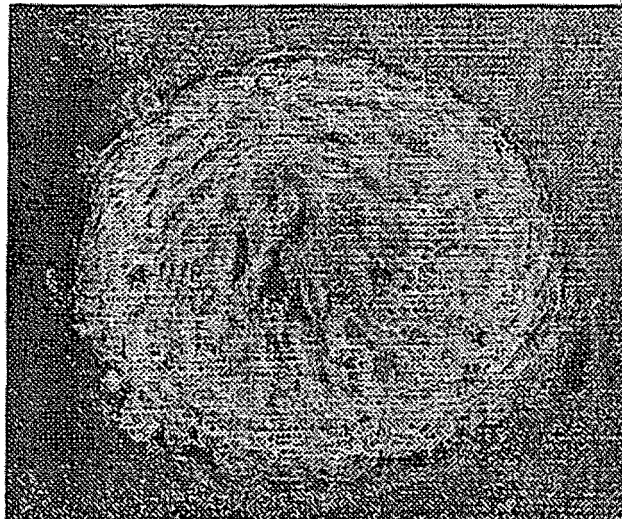


Fig. 10



Varias perlas cubiertas por células: objetivo x5



Una perla cubierta por células: objetivo x20

Fig. 11

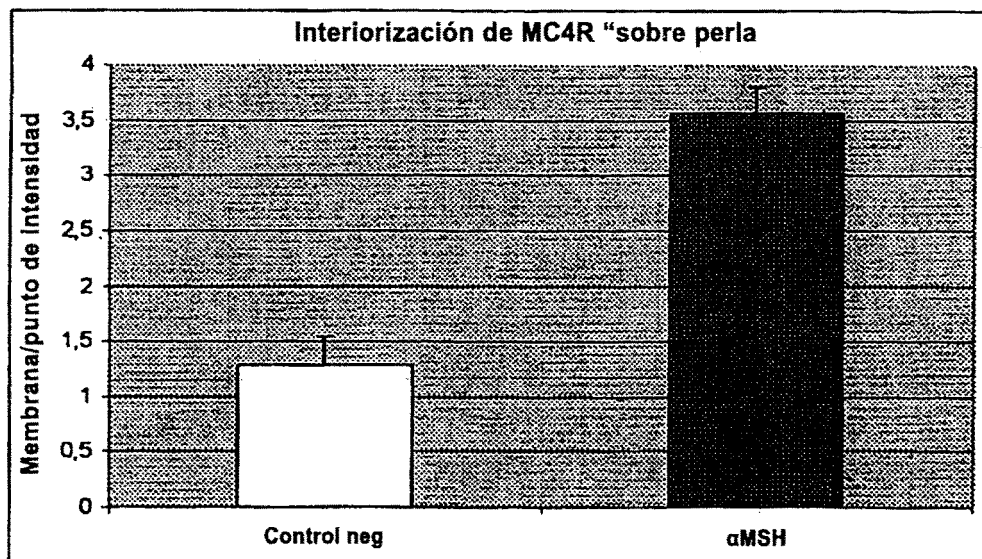


Fig. 12

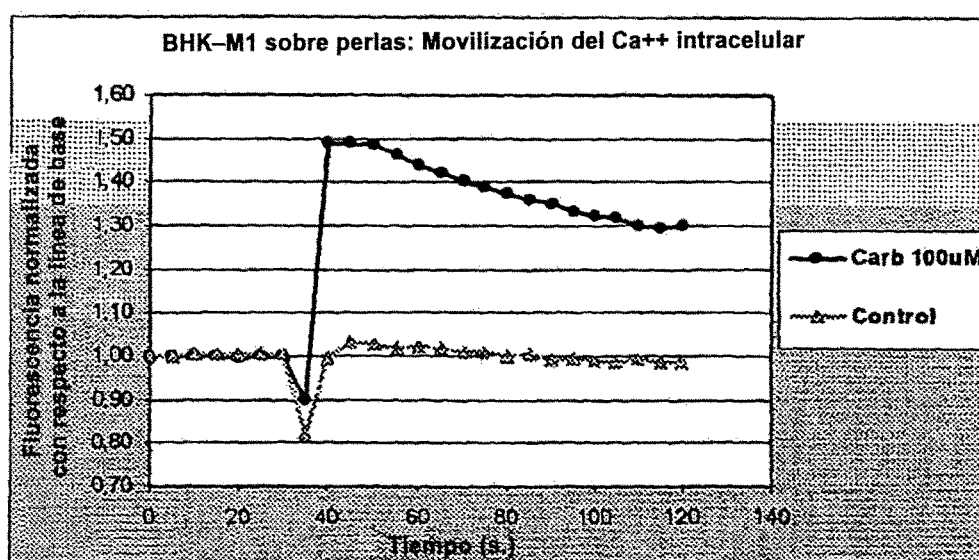


Fig. 13

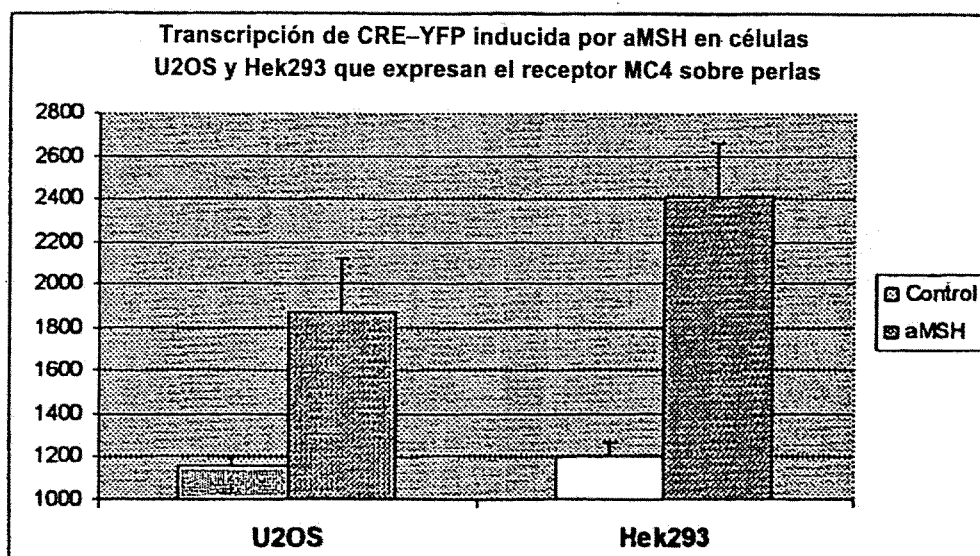


Fig. 14

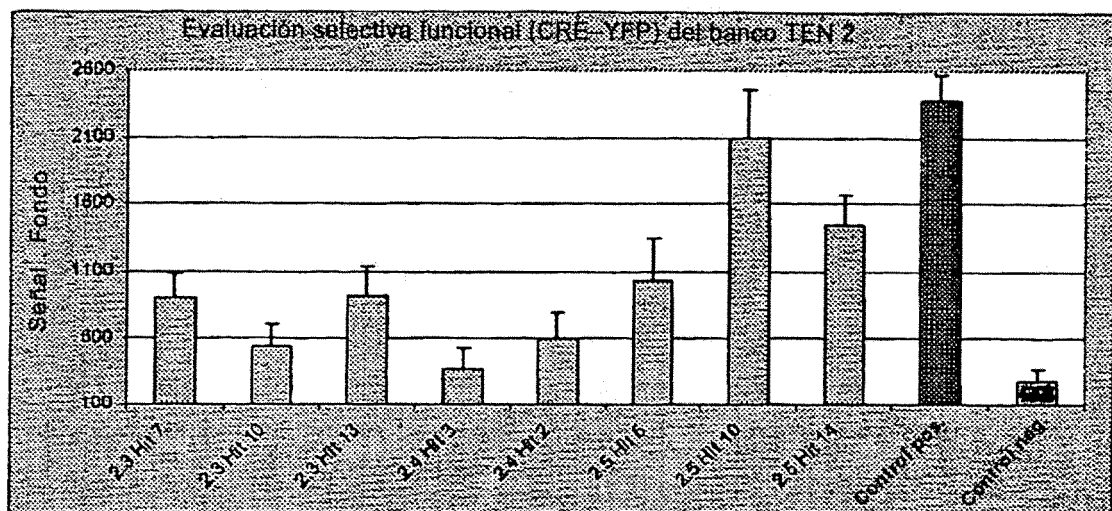
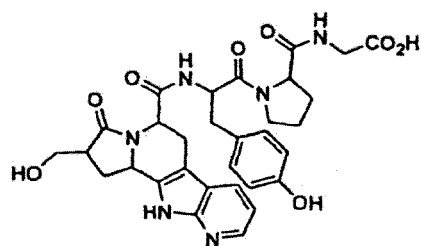
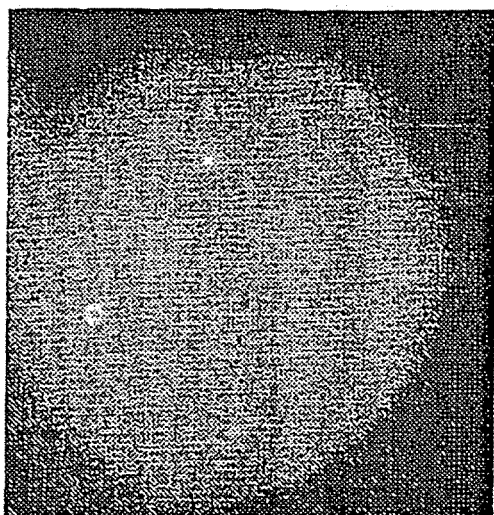


Fig. 15A



TEN-636-33-26

Fig. 15B

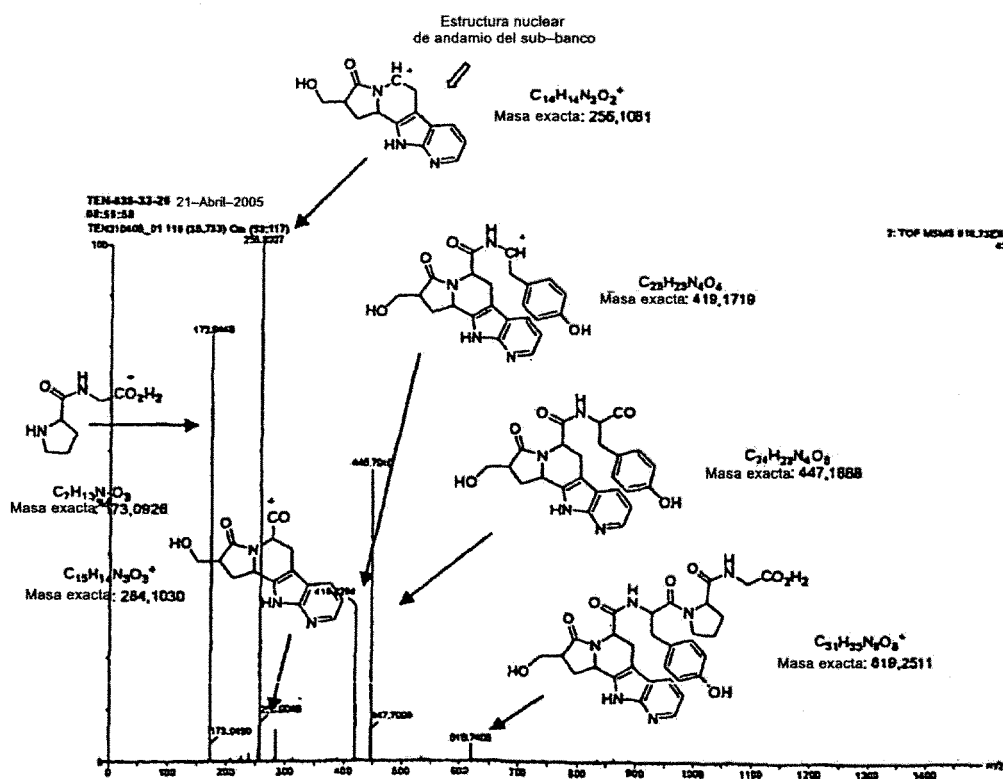
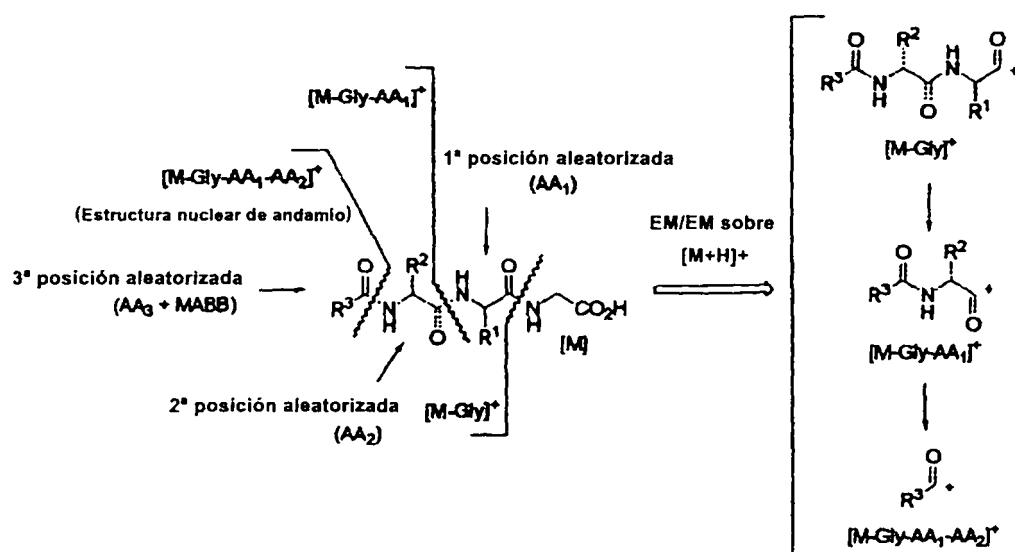


Fig. 16



ES 2 330 538 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Carlsberg A/S
- 5 <120> Identificación de compuestos que modifican una respuesta celular
- <130> P791PC00
- 10 <160> 70
- <170> PatentIn versión 3.1
- 15 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Péptido de adhesión celular
- 25 <400>
- Ala Arg Ile Arg Ile Gln His**
1 5
- 30 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Péptido de adhesión celular
- 40 <400> 2
- 45 **Ala Arg Ile Arg Ile Gln His**
1 5
- 50 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> Péptido de adhesión celular
- 60 <400> 3
- Ala Lys Ala Arg Cys Lys Ser**
1 5
- 65 <210> 4
<211> 7

ES 2 330 538 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido de adhesión celular

<400> 4

10

Ala Lys Tyr Trp Ser Tyr Lys
1 5

15 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido de adhesión celular

25 <400> 5

Ala His Leu Tyr Arg Asn Lys
1 5

30

<210> 6

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido de adhesión celular

<400> 6

45

Ala Arg Arg Cys Phe Arg Asp
1 5

50 <210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Péptido de adhesión celular

60 <400> 7

Ala Ala Arg His Cys Tyr Tyr
1 5

65

<210> 8

<211> 7

ES 2 330 538 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 <400> 8
 10 **Ala Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg**
 1 5
 15 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 25 <400> 9
 Ala Asp Leu Lys Arg Pro Met
 1 5
 30
 <210> 10
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido de adhesión celular
 <400> 10
 45 **Ala Gly Gly Lys Arg Lys Phe**
 1 5
 50
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 60 <400> 11
 Ala Pro Arg Lys Arg Cys Gly
 1 5
 65
 <210> 12
 <211> 7

ES 2 330 538 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido de adhesión celular

<400> 12

10

Ala Thr Arg Arg Val Ala Arg
1 5

15 <210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido de adhesión celular

25 <400> 13

Ala Gly Lys Lys Asn Lys Asn
1 5

30

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

40 <223> Péptido de adhesión celular

<400> 14

45 **Ala Ala Lys Arg Trp Lys Phe**
1 5

<210> 15

50

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Péptido de adhesión celular

<400> 15

60

Ala Arg Trp Pro Tyr Arg Gly
1 5

65

<210> 16

<211> 7

ES 2 330 538 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 <400> 16
 10 **Ala Leu Tyr Trp Thr Trp Arg**
 1 5
 15 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 25 <400> 17
 Ala Ala Tyr Arg Trp Tyr Arg
 1 5
 30 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Péptido de adhesión celular
 <400> 18
 45 **Ala Arg Cys Ile Arg Gly Asp**
 1 5
 50 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 60 <400> 19
 Ala Thr Lys Cys Lys Gly Arg
 1 5
 65 <210> 20
 <211> 7

ES 2 330 538 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido de adhesión celular

<400> 20

10

Ala Val Tyr Met Arg Asn Ile
1 5

15 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de adhesión celular

25 <400> 21

Ala Arg Lys Arg Ile Arg Gln
1 5

30

<210> 22

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido de adhesión celular

<400> 22

45 **Ala Lys Ile Arg Glu Lys Arg**
1 5

<210> 23

50 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Péptido de adhesión celular

60 <400> 23

Ala Arg Arg Phe Lys Met Tyr
1 5

65

<210> 24

<211> 4

ES 2 330 538 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 <400> 24
 10
 Arg Arg Phe Lys
 1
 15 <210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Péptido de adhesión celular
 25 <400> 25
 Arg Arg Ile Arg
 1
 30
 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 26
 40
 Leu Arg His Arg Leu Lys
 1 5
 45 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <400> 27
 55
 Lys Phe Gly Gln Lys
 1 5
 60
 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <400> 28

ES 2 330 538 T3

Lys Val Tyr Met His Lys
1 5

5 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <400> 29

15 **Ile Arg Tyr Arg Leu Arg**

<210> 30
 20 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <400> 30

Ala Gln Arg Pro Arg Trp
1 5

30 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <400> 31

40 **Trp Tyr Ala Lys Arg Arg**
1 5

<210> 32
 45 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <400> 32

Lys Arg Ile Arg Gln Arg Leu Arg
1 5

55 <210> 33
 <211> 7
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

ES 2 330 538 T3

<400> 33

5 **Lys Arg Ile Arg Gln Arg Lys**
 1 5

<210> 34
<211> 5
10 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 34

15 **Arg Ile Arg Gln Arg**
 1 5

20 <210> 35
<211> 5
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<400> 35

30 **Arg Gln Arg Ile Arg**
 1 5

<210> 36
35 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <400> 36

Lys Phe Gly Gln Lys Cys
 1 5

45 <210> 37
<211> 6
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 37

55 **Arg Arg Leu Leu Pro Ile**
 1 5

60 <210> 38
<211> 6
<212> PRT
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 330 538 T3

<400> 38

Pro Phe Arg Lys Lys Cys
1 5

<210> 39

<211> 6

10 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 39

15
Tyr Arg Trp Arg Ile Ala
1 5

20 <210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 $\langle 400 \rangle$ 40

<400> 40

30 Arg Ser Lys Arg Ile Asn

<210> 41

<211> 6

35 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 41

40

Arg Ser Ala Lys Arg Cys
1 5

45 $\langle 210 \rangle$ 42

<210> 42

<211> 6

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<400> 42

55 Lys Lys Gln Phe Trp Phe
 1 5

<210> 43

$$60 \quad \langle 211 \rangle \quad 6$$

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

ES 2 330 538 T3

	<400> 43
5	Arg Met Lys Leu His Lys 1 5
	<210> 44
	<211> 6
10	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<400> 44
	Arg His Trp Gly Arg Ile 1 5
20	<210> 45
	<211> 6
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<400> 45
30	Thr Lys Arg Leu Lys Thr 1 5
	<210> 46
35	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<400> 46
	Thr Lys Gly Lys Ala Lys 1 5
45	<210> 47
	<211> 6
50	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<400> 47
55	Ala Lys Thr Arg His Arg 1 5
60	<210> 48
	<211> 6
	<212> PRT
65	<213> Secuencia artificial

ES 2 330 538 T3

<400> 48

5 **Asn Arg Pro Arg Val Arg**
 1 5

<210> 49

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 49

15 **Val Pro Arg Lys Val Gln**
 1 5

20 <210> 50

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<400> 50

30 **Lys Met Arg Tyr Cys Gln**
 1 5

<210> 51

35 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <400> 51

Ile Arg Lys His Leu Ile
 1 5

45

<210> 52

<211> 6

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 52

55 **Pro Arg Arg Val Val Ile**
 1 5

60 <210> 53

<211> 6

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 330 538 T3

<400> 53
 5 **Lys Arg Glu Ser Lys Arg**
 1 5
 <210> 54
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <400> 54
 15
 Ser Arg Lys Asp Arg Lys
 1 5
 20 <210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <400> 55
 30
 Arg Cys Lys Lys Leu Ile
 1 5
 35 <210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <400> 56
 45
 Arg Lys Leu Arg Val Asn
 1 5
 <210> 57
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <400> 57
 60
 Val Arg Thr Val Arg Val
 1 5
 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 330 538 T3

<400> 58

5 **Arg Ala Phe Lys Tyr Tyr**
 1 5

<210> 59

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 59

15 **Ile Thr Arg Arg Thr Gln**
 1 5

20 <210> 60
 <211> 6

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<400> 60

30 **Lys Met Pro Lys Lys Asn**
 1 5

35 <210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <400> 61

45 **Lys Pro Lys Met Met Cys**
 1 5

<210> 62

<211> 6

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 62

55 **Lys Lys Met Arg Phe Trp**
 1 5

60 <210> 63
 <211> 6

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

ES 2 330 538 T3

	<400> 63
5	Lys Lys Lys Phe Tyr Tyr 1 5
	<210> 64
10	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<400> 64
	Lys Ser Asn Lys Val Arg 1 5
20	<210> 65
	<211> 6
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<400> 65
30	Lys Trp Pro His His Arg 1 5
35	<210> 66
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<400> 66
45	Arg His Ile Gln Trp Tyr 1 5
	<210> 67
	<211> 6
50	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<400> 67
55	Leu Arg Leu Lys Pro Lys 1 5
60	<210> 68
	<211> 6
	<212> PRT
65	<213> Secuencia artificial

ES 2 330 538 T3

<400> 68

Glu Arg Lys Arg Cys Thr
1 5

<210> 69

$\langle 211 \rangle$ 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 69

15 Arg Arg Ala Arg Gln Asp
1 5

20 <210> 70

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<400> 70

30 Arg Glu Lys Gly Ala Arg
1 5

35

40

45

50

55

60

65