



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 266**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04702645 .5**

96 Fecha de presentación : **16.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1588173**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54

Título: **Búsqueda de afinidad para ligandos y receptores de proteínas.**

30

Prioridad: **16.01.2003 US 346737**
19.05.2003 DK 2003 00749

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73

Titular/es: **Novo Nordisk A/S**
Novo Allé
2880 Bagsverd, DK

72

Inventor/es: **Hilaire, St., Phaedria, Marie;**
Yin, Haifeng;
Surve, Sheryl y
Wenckens, Martin

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 318 266 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

Búsqueda de afinidad para ligandos y receptores de proteínas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de proteómica y química combinatoria en combinación para proporcionar herramientas y métodos potentes para identificar ligandos y sus dianas de proteína correspondientes, por ejemplo para el proceso de descubrimiento de fármacos, en particular a métodos que proveen nuevas dianas de fármacos y que conducen a estructuras de compuestos simultáneas.

Antecedentes de la invención

El reconocimiento y unión de ligandos a receptores es un proceso fundamental que provee la arquitectura molecular de la mayoría de fenómenos biológicos, incluyendo el reconocimiento inmunológico, señalización celular, catálisis, metástasis, e invasión patógena de unas células del huésped. Consecuentemente, ha habido un ímpetu impulsor, tanto en la investigación básica como aplicada, para identificar y caracterizar receptores y ligandos correspondientes con el intento de dilucidar rutas biológicas y para desarrollar una terapéutica para la mejora de varios estados de enfermedad.

Esta interacción selectiva entre una proteína particular y un ligando es el principio básico del proceso de descubrimiento de fármacos. Generalmente, la búsqueda de tales pares de receptor/ligando ha sido realizada de una manera secuencial de manera que la involucración de una proteína en una enfermedad particular sea determinada en primer lugar desde un punto de vista genómico/proteómico (desactivación de genes, análisis de secuencias de genes, proteómica). Una vez identificada una proteína de interés y validada como una diana de fármaco, se pueden identificar los ligandos adecuados usando el diseño de fármaco racional, la selección de producto natural, o la selección de bibliotecas de ligandos putativos. De forma alternativa, una proteína particular puede ser purificada de una mezcla después de que un ligando particular conocido por unirse a esta familia de proteínas sea identificado. Véase, por ejemplo, las patentes US 5,834,318, y 5,783,663, y solicitud de patente PCT publicada 9838329A1.

WO 00/63694 se refiere a un método para selección de un proteoma para proteínas que se asocian con una biblioteca combinatoria. En particular, los métodos implican preparar una biblioteca combinatoria inmovilizada, tal como un conjunto paralelo, y contactar dicha biblioteca con un proteoma, eluir las proteínas unidas y caracterizar las proteínas eluidas.

WO 00/63701 se refiere a un microarray (micromatriz) de polipéptidos en un soporte sólido para el uso en la detección y cuantificación de ligandos inmovilizados en un formato miniaturizado.

En el contexto de interacciones de ligando-receptor en la industria farmacéutica, tales enfoques secuenciales no son ideales. El diseño de ligandos para dianas de fármacos derivadas solamente del análisis y comparación de un genoma o proteoma del organismo puede no lograr conseguir un efecto de fármaco deseado porque la diana seleccionada no es "susceptible de convertirse en fármaco". La diana puede demostrar ser inadecuada para el uso como un fármaco terapéutico debido a falta de especificidad, toxicidad, y similares. Enfoques tradicionales para la selección de fármacos han sido probados relativamente eficaces, pero consumen mucho tiempo y son ineficientes. Además, se da una pequeña consideración a la toxicidad potencial del medicamento durante las fases iniciales de selección tradicional. Estas ineficiencias llevan a fallos en la prueba clínica posterior, al igual que a un tiempo y coste de desarrollo innecesario. En consecuencia, los enfoques para corresponder con interacciones de ligando-receptor en una fase temprana en el programa de descubrimiento de fármacos son altamente ventajosos. La invención descrita aquí consigue este objetivo haciendo corresponder rápidamente las proteínas desconocidas con los ligandos desconocidos, así preseleccionando el número de dianas de fármacos potenciales y su optimización de fármaco putativo en un único proceso. Esta invención, además, proporciona información sobre la especificidad, reactividad cruzada, toxicidad potencial y otras características del fármaco conducen al igual que los datos relativos a posibles terapias de combinación. Por ejemplo, a partir de las correspondencias proteína-ligando resulta inmediatamente evidente si un ligando interactúa con más de una proteína, y si una de las proteínas es de importancia vital para el funcionamiento de la célula (efecto de toxicidad potencial). También será evidente si diferentes ligandos interactúan con una proteína única, aumentando así el número de optimizaciones de fármacos potenciales y posibilita la terapia combinatoria.

Un enfoque alternativo para identificar ligandos y receptores cuando se desconoce la naturaleza precisa del ligando y diana ha sido descrito por algunos investigadores mediante la expresión en el fago. Los péptidos de superficie de expresión en el fago se dirigen a receptores específicos en particular órganos cuando se aplican en un sistema *in vivo* (véase, por ejemplo, patentes U.S. 5,622,699 y 6, 306,365). El fago es luego recuperado del órgano, el péptido identificado, y el receptor posteriormente aislado e identificado mediante la cromatografía de afinidad. Este enfoque está ampliamente limitado a bibliotecas de ligandos peptídicos que consisten en los 20 aminoácidos codificados genéticamente, y no pueden aprovecharse de aminoácidos sintéticos útiles o molécula pequeña diversa que pueden modular la función biológica. Además, puesto que el direccionamiento se *desarrolla in vivo*, tendrá lugar la proteólisis de algunos ligandos peptídicos por proteasas adventicias, reduciendo así el número de ligandos putativos, y por lo tanto puede ser identificado el número de dianas. Además, es también esencial para el fago que sea endocitado por la célula en vez de dirigirse a proteínas citosólicas. El uso primario del proceso de exposición en serie es identificar péptidos que pueden utilizarse para entregar fármacos a células específicas, órganos, y tejidos.

En una alternativa para mostrar bibliotecas péptidas en el fago, las bibliotecas peptídicas pueden también ser generadas en células mamíferas usando vectores retrovéricos (véase por ejemplo, solicitud de patente PCT publicada WO 09638553 de Inoxell, patente US 6,153,390 de Rigel, y patentes relacionadas). Bibliotecas de moléculas destructoras (péptidos, ARN moléculas/ribozimas, o ADNc) son generadas en líneas celulares que actúan como modelo de una enfermedad o ruta celular. Después de la aplicación de presión selectiva e inducción del fenotipo deseado, la(s) molécula(s) efectoras responsables son identificadas, y la(s) diana(s) celular(es) correspondiente(s) pueden ser aisladas y caracterizadas mediante la cromatografía de afinidad. Este enfoque está otra vez restringido a oligómeros de origen natural. Además, consume tiempo para desarrollar la célula modelo de enfermedad apropiada. Además, el péptido está expresado en un andamiaje de proteína dificultando extrapolarse a un pequeño fármaco de péptidos/moléculas.

La presente invención se beneficia del progreso hecho en el campo de la proteómica. Para últimas revisiones que tratan sobre el estado de esta técnica véase Peng *et al.*, 2001, *J. Masa Spectrom.*, 36, 1083-1091; y Yarmush *et al.*, 2002, *Annu. Rev. Biomed Eng.*, 4, 349-373. En proteómica, las proteínas de una célula son normalmente separadas por electroforesis en gel en 2- dimensiones (2-D) y caracterizadas por una combinación de digestiones enzimáticas y espectrometría de masas (MS). Cuando se usan para identificar proteínas que son importantes de forma potencial en un estado de enfermedad, por ejemplo, geles 2-D que muestran proteínas obtenidas a partir de estados normales y anormales son comparados y las diferencias en la expresión de proteínas son identificadas. Las proteínas obtenidas de muestras normales y anormales pueden ser diferencialmente marcadas (ver por ejemplo, Unlu *et al.*, 1997, *Electrophoresis*, 18, 2071-2077; y Gygi *et al.*, 1999, *Nat. Biotechnol.*, 17, 994-999). Las proteínas marcadas diferencialmente pueden ser separadas en un único gel 2-D antes de la digestión trípica y la identificación por MS de las proteínas cambiadas como se describe, por ejemplo, en Unlu *et al.*, 1997, *Supra*. De forma alternativa, las proteínas marcadas diferencialmente primero pueden ser digeridas enzimáticamente y los péptidos separados por cromatografía en fase líquida antes del análisis por MS. Véase, por ejemplo, Gygi *et al.*, 1999 *Supra*; y Washburn *et al.*, 2001, *Nat. Biotechnol.*, 19, 242-247. El uso de geles bidimensionales para perfilar un proteoma del organismo no es simple y está lleno de problemas. El proceso entero de fundición de geles y solubilización de proteínas para interpretar los modelos de proteína obtenidos plantea numerosos desafíos. Con mucha atención al detalle, los laboratorios individuales pueden reproducir modelos de proteínas 2-D; no obstante, en la práctica, es raro que diferentes grupos obtengan el mismo modelo 2-D, volviendo la comparación de datos entre laboratorios difícil y la creación de bases de datos compartidas prácticamente inútil, (véase DeFrancesco, 1999, *The Scientist*, 13: 16). Además, el uso de geles 2-D limita el tamaño de proteínas que pueden ser separadas. Es particularmente difícil aislar e identificar proteínas de la membrana y proteínas poco abundantes mediante estas técnicas. El uso de sistemas sin gel reduce los problemas de tamaño y abundancia; no obstante, en algunos casos, los procedimientos de marcado están limitados puesto que requieren la presencia de aminoácidos particulares en una proteína, y el análisis de los espectros de masa es difícil.

En una variación en el perfil proteómico, las proteínas de una mezcla en bruto pueden ser capturadas en la superficie de un chip, por ejemplo, un chip de 2 mm, soportando cualquier variedad de superficies de afinidad: anticuerpos, receptores de proteínas conocidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, y similares. La(s) proteína(s) que se une(n) con el chip puede(n) después ser analizada(s) e identificada(s), por ejemplo, usando una tecnología llamada espectrometría de masas SELDITM (desorción/ionización de superficie mejorada por láser). Véase por ejemplo, Davies *et al.*, 1999, *Biotechniques*, 27, 1258-1261 y el sitio web ([www: ciphergen.com](http://www.ciphergen.com)). Para utilizar esta técnica, el compañero por enlace inmovilizado debe primero ser sintetizado (péptido, carbohidrato, ácido nucleico), aislado (receptor de proteína), o generado (anticuerpo) antes de ser inmovilizado en la superficie. Adicionalmente, el procedimiento de inmovilización no debería afectar a la naturaleza y conformación activa del ligando. Por tanto, puede hacerse un esfuerzo considerable para optimizar la inmovilización para un conjunto particular de ligandos. Esta técnica está también afectada por interacciones de unión no específica, en parte debidas a la desnaturalización de las proteínas en la mezcla en bruto en la superficie del chip. Además, relativamente pocos compañeros de unión pueden ser inmovilizados en un único chip.

En un intento de extender el perfil proteómico a un conjunto más amplio de compuestos, una pequeña biblioteca codificada soluble (seis compuestos) fue sintetizada y seleccionada con proteínas individuales en la fase soluble (véase, por ejemplo, Winssinger *et al.*, 2001, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40, 3152-3155). Los elementos de la biblioteca fueron laboriosamente codificados con una etiqueta de ácido polinucleico (etiqueta de PNA) permitiendo que los compañeros de unión fueran identificados por hibridación a un microarray de ADN. Después de la identificación del ligando, la(s) proteína(s) de unión puede(n) ser purificada(s) por purificación de afinidad después de la resíntesis del ligando identificado y fijación a un soporte adecuado, y luego identificada(s) usando espectrometría de masas. En este enfoque, la selección inicial se desarrolla en solución y está sometida a muchos problemas bien conocidos. Por ejemplo, puesto que las proteínas unidas a ligandos son separadas de proteínas sin ligandos usando cromatografía de filtración en gel, algunos ligandos se pierden, y sólo las interacciones de unión que son extremadamente ajustadas con índices muy bajos (afinidades de unión altas) serán detectadas. Además, algunas proteínas pueden interactuar con la etiqueta de PNA de codificación (completa o parcialmente) conduciendo a un par de unión positivo falso o impidiendo la hibridación e identificación de un par de unión positivo "verdadero". Finalmente, una vez identificado(s) un(os) ligando(s) activo(s), la proteína de unión es identificada usando cromatografía de afinidad convencional lo que requiere resíntesis e inmovilización del ligando a un soporte sólido, unión de la(s) proteína(s), y elución de la(s) proteínas(s) bajo las condiciones apropiadas, cada procedimiento añadiendo tiempo e ineficiencia al proceso de selección.

La presente invención proporciona un proceso nuevo eficiente, y efectivo para identificar y hacer corresponder ligandos y dianas de fármaco putativas a una velocidad formidable (prestándose a la automatización) y con pocas limitaciones en comparación con los procesos conocidos.

En la técnica anterior, se han descrito métodos para seleccionar conjuntos de materiales para compuestos bioactivos. WO 00/63694 describe un método para identificar compuestos bioactivos mediante selección de una biblioteca con sólo un proteoma, y posteriormente identificación de proteínas asociadas a componentes de dicha biblioteca. La biblioteca puede ser una biblioteca de oligómeros naturales u oligómeros de compuestos tipo péptidos. La biblioteca puede ser inmovilizada por ejemplo en perlas de sefarosa o de agarosa.

Resumen de la invención

En el proceso de la presente invención, previamente desconocido, los pares de unión de ligando-proteína específicos son aislados e identificados de una mezcla de proteínas y una biblioteca de ligandos en virtud del enlace específico, aislamiento, e identificación. Según la invención, una biblioteca de ligandos separados espacialmente, inmovilizados en perlas de resina, es incubada con dos o más mezclas de proteínas marcadas diferencialmente, tales como proteínas que han sido aisladas de células, tejido, u organismos. La mezcla de proteínas son marcadas con una sonda de detección. Tras la incubación de los ligandos inmovilizados con las mezclas de proteínas, los ligandos activos, es decir, aquellos ligandos que se unen a la proteína, son aislados e identificados, por ejemplo, por espectroscopia de masas o RMN, tal como RMN de alta resolución, preferiblemente directamente del complejo de unión, por ejemplo, "en perla". La(s) proteína(s) unida(s) a ligando(s) activo(s) identificado(s) son identificada(s), preferiblemente del mismo complejo de unión, por ejemplo, por espectroscopia de masas (obtención de la huella genética de masa peptídica y secuenciación peptídica), u otros procesos conocidos. De forma alternativa, un ligando identificado activo puede utilizarse para aislar su receptor de proteína de unión específico. El receptor de la proteína aislado es luego identificado, por ejemplo, por espectrometría de masas, por la huella genética de la masa peptídica y secuenciación peptídica) u otros métodos útiles conocidos por el experto en la materia.

Según la invención, una biblioteca de ligandos es incubada con dos o más mezclas de proteínas marcadas diferencialmente, por ejemplo, obtenidas de dos o más fuentes de proteínas diferentes, tales como un conjunto normal de proteínas obtenido de tejido normal y un conjunto anormal de proteínas obtenido de tejido enfermo. Los conjuntos de proteína son preferiblemente mezclados, y luego incubados con una biblioteca de ligandos. Complejos de proteína-ligando son aislados, por ejemplo, según las etiquetas de las proteínas específicas. Los ligandos que se unen selectiva y/o diferencialmente con un conjunto de proteínas son identificados. La(s) proteína(s) que se une(n) a estos ligandos selectivos puede(n) ser identificada(s) del mismo complejo de unión, por ejemplo, en una única perla de resina. De forma alternativa, los ligandos identificados selectivos pueden utilizarse para aislar la(s) proteína(s) de unión correspondiente(s) que son luego identificadas. Por lo tanto, los métodos pueden ser útiles en la identificación de ligandos que se unen diferencialmente a dos mezclas de proteínas. Las proteínas que son diferencialmente expresadas en un estado enfermo particular pueden ser dianas de fármacos útiles y los métodos según la invención permiten así por ejemplo la identificación de dianas de fármacos potenciales y ligandos de unión para el tratamiento de una enfermedad particular.

El proceso inventivo proporciona una identificación rápida y eficaz de elementos específicos de un par de unión proteína-ligando previamente desconocido. El proceso puede ser fácilmente automatizado, suministrando eficiencias superiores. En la forma de realización más preferida, las eficiencias son conseguidas realizando múltiples fases del proceso usando los mismos reactivos, por ejemplo, síntesis de la biblioteca de ligandos directamente sobre un soporte sólido que es luego usado para incubar el ligando con la mezcla de proteínas; detección de los pares de unión de proteína-ligando específicos mientras que son inmovilizados en el mismo soporte sólido, e identificación de cada ligando y proteína del mismo complejo de unión inmovilizado. La identificación "en perla" permite identificar incluso cantidades muy pequeñas de ligando y/o proteína. Por consiguiente, el proceso de la invención elimina transferencias, transformaciones adicionales sintéticas, purificación, y otras fases que reducen la eficiencia, y aparte impiden el descubrimiento de interacciones de enlaces de ligandos. Usando el proceso de la invención, pares de unión de proteína-ligando nuevos son eficazmente detectados e identificados, y proporcionados como optimizaciones y dianas de fármaco. Una verificación ulterior de la utilidad de las proteínas y de los ligandos como dianas de fármaco puede ser obtenida, por ejemplo, por comparación con dianas de fármacos y optimizaciones conocidos, por comparación de un genoma de organismo, por un análisis de la función de las proteínas y probando los ligandos identificados en ensayos biológicos.

Los ligandos pueden ser identificados por los métodos según la invención al igual que los pares de unión de proteína-ligando.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede ser entendida de forma más completa con referencia a la siguiente descripción detallada de varias formas de realización de la invención y ejemplos de funcionamiento específicos en relación con las Figuras anexas, donde:

La Figura 1 es una representación esquemática, que muestra una biblioteca de ligandos incubada con un único conjunto de proteínas para identificar pares de unión de proteína-ligando específicos.

La Figura 2 es una representación esquemática de una forma de realización del proceso de la invención, que muestra una biblioteca de ligandos incubada con dos o más conjuntos diferentes de proteínas para identificar pares de unión proteína-ligando diferenciales específicos y selectivos.

La Figura 3 demuestra la inhibición de síntesis de ADN (hipertrofia cardíaca) por péptidos seleccionados identificados usando el proceso de esta invención. Las columnas indican el promedio de inducción de la síntesis de ADN en miocitos cardíacos tratados con péptidos. El eje Y indica la cantidad de inducción (control basal =100%).

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Según se utilizan en este caso, las palabras siguientes están destinadas a tener las definiciones específicas:

10

Aminoácidos puede ser cualquier compuesto de origen natural o sintético, conteniendo un grupo amino y ácido carboxílico. Los aminoácidos de origen natural son identificados usando bien su código de 1 o de 3 letras en toda la descripción. Los aminoácidos pueden por ejemplo ser bien D-aminoácidos o bien L-aminoácidos.

15

Sonda de afinidad se refiere a una sonda de detección que usa una interacción de (afinidad) de unión como parte del proceso de detección, por ejemplo biotina-avidina, antígeno-anticuerpo y similares.

20

Sonda de detección se refiere a un compuesto, generalmente una pequeña molécula, péptido o proteína, polinucleótido, y similares, que se usa para detectar una interacción de la unión, tal como la unión del ligando a la proteína. La sonda de detección puede producir una señal detectable, tal como color, fluorescencia, y similares, o puede reaccionar con una sonda conocida, tal como una sonda de afinidad que proporciona la señal de detección.

25

Inmovilizado como se utiliza en este caso, significa que una entidad molecular es fijada de manera covalente a un soporte sólido.

Proteínas poco abundantes se refiere a proteínas presentes en cantidades bajas en una muestra de proteína para ser enmascaradas por otras proteínas en métodos de detección típicos, e incluyen, por ejemplo, factores de transcripción, proteínas quinasas, y fosfatasas.

30

Biblioteca se refiere a una colección de entidades moleculares obtenida después de una serie de una o más transformaciones sintéticas.

35

Ligando se refiere aquí a una molécula que se une a una macromolécula biológica, por ejemplo una proteína y similares.

40

Enlazador se refiere aquí a una entidad molecular que puede utilizarse para unir un ligando a un soporte sólido. En esta invención son preferidas las entidades moleculares que pueden ser específicamente divididas. Ejemplos incluyen ácido lábil (amida Rink), base lábil (HMBA), fotolábil (2-nitrobenzilo y 2 nitrovalerilo), otras entidades de seccionamiento específico (alilo, sililo, sulfonamida de unión segura), y similares.

Array paralelo se refiere a una colección de entidades moleculares en una biblioteca de ligandos generada por síntesis paralela.

45

Peptidomimética se refiere a las moléculas no peptídicas que imitan las características de unión de los péptidos.

Fotoproteína se refiere a una proteína que emite fluorescencia o quimioluminiscencia, por ejemplo proteína verde fluorescente (PVF) o luciferasa.

50

Par de unión de ligando-proteína previamente desconocido se refiere a una proteína y ligando que se descubre que están unidos entre sí a través de la implementación de este proceso específico pero que la interacción de unión de ligandos y proteínas no se conocía anteriormente.

55

Mezcla de proteínas se refiere a una solución comprendiendo proteínas diferentes. Preferiblemente, la mezcla de proteínas ha sido aislada de uno o más tipos de células, por ejemplo de cultivos de células caracterizadas, células específicas, células de un organismo o tejido entero, mezclas de células de tejido normal y/o enfermo, y similares. Los términos son usados de forma intercambiable aquí.

60

Receptor de proteínas o receptor se refiere a una proteína que se une a un ligando, e incluye, por ejemplo, receptores de superficie, enzimas tales como proteasas, proteínas quinasas, fosfatasas, y similares, factores de transcripción, cofactores, proteínas adaptadoras, proteínas estructurales, y similares.

Moléculas o compuestos pequeños orgánicos se refieren aquí a carbono no oligomérico que contiene compuestos producidos por síntesis química y generalmente con un tamaño inferior a 600 unidades de masa.

65

La presente invención proporciona procesos para identificar la estructura de elementos previamente desconocidos de pares de unión de ligandos y proteínas específicos. La invención proporciona procesos que usan bibliotecas de ligandos composicionalmente definidos, espacialmente separados, aún estructuralmente desconocidos para aislar receptores de proteína de mezclas de proteína en virtud de la afinidad de enlace específico. En una forma de realización,

usando el proceso y las herramientas de la invención, característicos de proteínas específicas de procesos biológicos y sus ligandos de enlace de adaptación son simultáneamente identificados. En particular, la invención proporciona un proceso nuevo para identificar proteínas particulares como dianas de fármacos potenciales junto con una optimización de fármaco potencial correspondiente (ligando).

5

La presente invención se refiere a un proceso para identificar elementos específicos de pares de unión de ligandos-proteínas previamente desconocidos, que incluyen las etapas de:

- 10 (a) sintetizar una biblioteca de ligandos sobre perlas de resina para formar una biblioteca de ligandos inmovilizada, donde cada perla de la biblioteca inmovilizada comprende un elemento de la biblioteca de ligandos;
- (b) incubar la biblioteca de ligandos inmovilizada con dos o más mezclas de proteínas diferencialmente marcadas;
- 15 (c) detectar un par de unión de proteína-ligando inmovilizado de la mezcla de incubación;
- (d) identificar el ligando del par de unión de ligando específico; y
- 20 (e) identificar la proteína del par de unión de proteína-ligando,

donde el ligando y la proteína identificados son elementos específicos de un par de unión de proteína-ligando diferencial previamente desconocido.

25 Se prefiere, que la fase de detección de un par de unión de proteína-ligando inmovilizado comprenda detectar un ligando de la biblioteca que se une diferencialmente con las mezclas de proteínas diferencialmente marcadas para formar un par de unión de proteína-ligando diferencial. Esto permite la identificación de ligandos por ejemplo que se unen preferentemente a una mezcla de proteínas mejor que a otra mezcla de proteínas.

30 Como se utiliza en este caso, el término "ligando" se refiere a una molécula que se une a una proteína. En particular, los ligandos son moléculas capaces de asociarse específicamente con una o más proteínas, los elementos identificados de un par de unión de proteína-ligando son útiles como dianas de fármacos potenciales y optimización de compuestos. Por ejemplo, la proteína de un par de unión a proteínas-ligandos identificado puede ser útil como una diana de fármaco, mientras que el ligando de un par de unión de proteína-ligando identificado puede ser útil como un compuesto farmacéutico o como una optimización de compuesto durante el desarrollo del fármaco. Además, los complejos de 35 ligando-proteína aislados e identificados por la invención del proceso son también útiles para ayudar a diseñar rutas biológicas y para indicar funciones de la proteína identificada. La invención del proceso proporciona información preliminar sobre la terapia de fármaco de combinación potencial al igual que efectos tóxicos potenciales del fármaco o candidato a fármaco.

40 Esta invención del proceso proporciona ventajas significantes sobre procesos alternativos de descubrimiento de fármacos en virtud de su facilidad, velocidad, amplia generalidad y aplicabilidad, y produce una gran cantidad de información en un tiempo breve. Además, como se demuestra en los ejemplos abajo (por ejemplo, ejemplos 32 y 33), el proceso de la invención proporciona la correspondencia de pares de proteína-ligando con proteínas poco abundantes, proteínas hidrofóbicas, y proteínas de membrana (por ejemplo, receptores de proteínas acoplados en G) que son 45 normalmente difíciles de aislar y se corresponden con un compañero de unión.

La biblioteca en fase sólida

En la presente invención, las bibliotecas de compuestos se utilizan para seleccionar mezclas biológicas. Como se 50 utiliza en este caso, el término "biblioteca" significa una colección de entidades moleculares obtenida después de una serie de transformaciones químicas. En una forma de realización, estas entidades moleculares pueden ser oligómeros naturales (que se originan en la naturaleza) tales como péptidos, glicopéptidos, lipopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN), u oligosacáridos. Las bibliotecas pueden comprender oligómeros diferentes naturales o las bibliotecas pueden comprender sólo una especie de oligómero natural, por ejemplo la biblioteca puede ser una biblioteca peptídica. En 55 otra forma de realización, los oligómeros pueden ser innaturales (que no se originan en la naturaleza) tales como péptidos modificados químicamente, glicopéptidos, ácidos nucleicos (ADN o ARN), u oligosacáridos, y similares. Dicha modificación química puede por ejemplo ser el uso de bloques de construcción innaturales conectados por el enlace natural que conecta las unidades (por ejemplo, el péptido/amida como se muestra en el Ejemplo 5), el uso de bloques de construcción naturales con unidades de conexión modificadas (por ejemplo, oligoureas como se discute en Boeijen *et al.*, 2001, *J. Org. Chem.*, 66, 8454-8462; oligosulfonamidas como se discute en Monnee *et al.*, 2000, *Tetrahedron Lett.*, 41, 7991-95), o combinaciones de los mismos (por ejemplo, amidas estatinas como se discute en Dolle *et al.*, 2000, *J. Comb. Chem.*, 2, 716-31.). Los oligómeros innaturales preferidos incluyen los oligómeros que comprenden 60 bloques de construcción innaturales conectados entre sí por un enlace de origen natural. Dichos oligómeros pueden así comprender una mezcla de bloques de construcción de origen natural e innatural conectados entre sí por enlaces de origen natural. Por ejemplo, el oligómero puede comprender aminoácidos de bloques de construcción de origen natural e innatural unidos por enlaces peptídicos. Así, en una forma de realización de la invención los oligómeros preferidos comprenden aminoácidos modificados o imitaciones de aminoácidos, por ejemplo, los oligómeros pueden comprender cualquiera de los compuestos mencionados en la tabla 2 o 3 o 9, por ejemplo los oligómeros pueden

consistir en uno o más de los monómeros mencionados en la tabla 2 y 9. Otros oligómeros preferidos innaturales incluyen, por ejemplo oligoureas, poli azatidas, oligómeros unidos C-C aromáticos y oligómeros unidos C-N aromáticos. Además otros oligómeros preferidos comprenden una mezcla de bloques de construcción naturales e innaturales y enlaces de conexión naturales e innaturales. Por ejemplo, el oligómero innatural puede ser cualquiera de los oligómeros mencionados en revisiones reciente, 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. En otra forma de realización, las entidades moleculares pueden comprender moléculas no oligoméricas tales como peptidomiméticas u otras moléculas orgánicas pequeñas. Los peptidomiméticos son compuestos que imitan la acción de un mensajero peptídico, tales como los peptidomiméticos de lactama de tiazolidina bicíclica de L-proplil-L-leucilglicinamida (Khalil *et al.*, 1999, J. Med. Chem., 42, 2977-87). En una forma de realización preferida de la invención, la biblioteca comprende o incluso más preferiblemente consiste en pequeñas moléculas orgánicas. Las moléculas orgánicas pequeñas son compuestos no oligoméricos inferiores a aproximadamente 600 unidades de masa que contienen cualquier variedad de grupos posibles funcionales y son el producto de síntesis química, o aisladas de la naturaleza, o aisladas de la naturaleza y luego modificadas químicamente, e incluyen, por ejemplo, inhibidores de quinasa a base de urea de Bayer (Smith *et al.*, 2001, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11: 2775-78). Ejemplos no limitativos de pequeñas bibliotecas de moléculas orgánicas que pueden ser usadas con la presente invención y métodos para producir las pueden por ejemplo encontrarse en las reseñas 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. En una forma de realización preferida las bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas son preparadas partiendo de una o más estructuras básicas. Dichas estructuras básicas pueden por ejemplo ser seleccionadas del grupo que consiste en alcoxi, ariloxi, aciloxi, tiol, alquiltio, ariltio, heteroariltio, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcoxiacilamino, dialcoxiacilamino, amidas, alquilo, alquilo ramificado, arilo, heteroarilo, ceto, heterociclos, sistemas de anillos fusionados, heterociclos fusionados y sus mezclas derivadas, donde cada uno de los mencionados pueden ser sustituidos con uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -H, -OH, -SH, halógeno, carboxilo, carbonilo, alcoxi, ariloxi, aciloxi, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcoxiacilamino, dialcoxiacilamino, amidas, alquilo, arilo, heteroarilo, nitro, ciano, halógeno, sililoxi, ceto, heterociclos, sistemas de anillos fusionados, y heterociclos fusionados. En una forma de realización, la estructura básica por ejemplo puede ser un haluro que contiene ácido carboxílico aromático o heteroaromático o haluro de ácido, tal como cualquiera de los compuestos mencionados en la tabla 7. En otra forma de realización la estructura básica puede ser cualquiera de los compuestos mencionados en la tabla 8. Por consiguiente, las bibliotecas de compuestos orgánicos pequeños pueden por ejemplo comprender compuestos que comprenden uno o más sistema(s) de anillos aromáticos o heteroaromáticos, donde los heteroátomos son preferiblemente O, S y/o N, uno o más sistema(s) de anillos no aromáticos que pueden o no pueden comprender heteroátomos o varios alquilos sustituidos. Dichos sistemas de anillos aromáticos o no aromáticos pueden ser fusionados. Cada uno de los mencionados puede ser sustituido con varios sustituyentes p. ej. Haluro(s) (F, Cl), CH₃-, CF₃-, metoxi-, tiometil-, aldehído(s)-, ácidos carboxílicos-, ésteres-, grupos nitro, -H, -OH, -SH, carbonilo, alcoxi, ariloxi, aciloxi, alquiltio, ariltio, heteroariltio, sulfonilo, sulfoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, acilamino, diacilamino, alcoxiacilamino, dialcoxiacilamino, amidas, alquilo, arilo, heteroarilo, ciano, halógeno, sililoxi o ceto. Las pequeñas bibliotecas de compuestos orgánicos usadas con la invención pueden también comprender mezclas de cualquiera de los compuestos anteriormente mencionados.

Las bibliotecas usadas con la invención pueden comprender al menos 20, tal como al menos 100, por ejemplo al menos 1000, tal como al menos 10.000, por ejemplo al menos 100.000, tal como al menos 1.000.000 compuestos diferentes. Preferiblemente, las bibliotecas comprenden en la gama de 20 a 10⁷, más preferiblemente 50 a 7.000.000, incluso más preferiblemente 100 a 5.000.000, aún más preferiblemente 250 a 2.000.000 compuestos diferentes. Las bibliotecas muy preferiblemente comprenden en la gama de 1000 a 20.000, tal como en la gama de 20.000 a 200.000 compuestos diferentes.

Las bibliotecas pueden ser sintetizadas usando un método de división/mezcla (véase abajo) y dan lugar a bibliotecas OBOC (del inglés "one-bead-one-compound", una perla, un compuesto). Métodos de división/mezcla en general comprenden las fases de:

1. Suministrar diferentes depósitos de perlas de resina
2. Realizar una o varias fases diferentes de síntesis química en cada agrupación de perlas de resina
3. Mezclar dichas agrupaciones, de ese modo obteniendo una única agrupación
4. Separar dichos depósitos para obtener depósitos nuevos
5. Repetir fases 2 a 4.

La selección de la biblioteca de ligandos es dependiente de la selección e identificación deseadas. Por ejemplo, la invención del proceso puede utilizar una biblioteca totalmente aleatoria diseñada para que contenga compuestos interesantes e inmensamente diversos. Una ventaja de este enfoque es que los resultados de la selección no son perjudicados de cualquier manera específica. Puesto que la invención del proceso permite seleccionar millones de compuestos diversos, por ejemplo, inmovilizados en 10 g de resina, un gran número, por ejemplo en la gama de 3 a 5 millones, de moléculas aleatorias pueden ser usadas en la biblioteca de ligandos.

De forma alternativa, una biblioteca más pequeña específica (de cientos a miles de compuestos) puede ser usada, por ejemplo, partiendo de un compuesto o compuestos conocido(s), y suministrando numerosas variaciones de estos compuestos conocidos para la selección específica de nuevos pares de unión de proteína-ligando. La biblioteca específica más pequeña puede también comprender moléculas aleatorias.

La biblioteca puede contener un conjunto paralelo de modificaciones aleatorias de uno o más ligandos. En una forma de realización, la biblioteca puede ser formada como un conjunto paralelo de modificaciones aleatorias a un(os) compuesto(s) conocido(s). El conjunto de compuestos es preferiblemente preparado en fase sólida usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En resumen, la resina puede ser repartida en varios vasos o pocillos, normalmente menos de 500 y los reactivos son añadidos. En general no hay ninguna fase de mezcla y después de las fases de lavado apropiadas, se realizan posteriores reacciones por adición de reactivos adicionales a los pocillos. No hay ningún aumento exponencial en el número de compuestos generados y es igual al número de vasos usados. El ligando puede ser fácilmente identificado controlando el reactivo añadido a cada pocillo.

Ejemplos no limitativos de bibliotecas útiles están provistos en los ejemplos más abajo. En una forma de realización de la invención la biblioteca es una pequeña biblioteca de moléculas orgánicas. Ejemplos no limitativos preferidos de pequeñas bibliotecas de moléculas orgánicas están provistos en los ejemplos 36 y 40 (bibliotecas 5 y 7).

La fijación de un marcador a un ligando puede alterar las propiedades de dicho ligando. Por lo tanto, en una forma de realización de la presente invención, los ligandos no son marcados, es decir los ligandos no son conectados a un marcador detectable, tal como un componente fluorescente, un ácido nucleico o un homólogo de ácido nucleico tal como PNA, un colorante, una sonda que comprende una fracción reactiva o similar. En particular se prefiere que todos los ligandos no estén conectados al mismo marcador detectable.

Soporte sólido

En esta invención, los compuestos de la biblioteca están unidos a un soporte sólido, que confiere la ventaja de “mini-recipientes de reacción” compartimentados para la unión de las proteínas con un(os) ligando(s) óptimo(s). El soporte sólido no es una matriz a la que se unen diferentes elementos de la biblioteca. El uso de perlas de resina permite una manipulación más fácil que el uso de una matriz. En general, más compuestos pueden ser seleccionados y varias de las fases en el procedimiento pueden ser realizadas en una perla con material suficiente. Por lo tanto, la biblioteca está unida a perlas de resina. Cada elemento de la biblioteca es un único compuesto y está físicamente separado en el espacio de los demás compuestos de la biblioteca inmovilizando la biblioteca en perlas de resina, donde cada perla comprende como mucho un elemento de la biblioteca. Dependiendo del modo de síntesis de la biblioteca, cada elemento de la biblioteca puede contener, además, fragmentos del elemento de la biblioteca. Puesto que la facilidad y velocidad son características importantes de esta invención del proceso, se prefiere que la fase de selección (incubación) ocurra en el mismo soporte sólido usado para la síntesis de la biblioteca, y también que la identificación de los elementos del par de unión pueda tener lugar en el mismo soporte, es decir, en una única perla de resina. Por lo tanto, los soportes sólidos preferidos útiles en la invención del proceso satisfacen el criterio no sólo de ser adecuados para la síntesis orgánica, sino que también son adecuados para procedimientos de selección, tal como la selección “en perlas” como se describe en los ejemplos más abajo. Además se prefiere que el soporte sólido sea conveniente para la identificación “en perlas” de ligando/proteína como se describe en este caso más abajo. Los soportes hidrofílicos descritos más abajo son soportes útiles. La selección de bibliotecas y ligandos con proteínas o células individuales purificadas ha sido intentado en perlas de resina individuales tales como TentaGel (comercialmente disponible en Rapp polymere, Tubingen, Alemania), ArgoGel (comercialmente disponible en Argonaut Technologies Inc., San Carlos, CA), PEGA (comercialmente disponible en Polymer Laboratories, Amherst, MA), POEPOP (Renil *et al.*, 1996, Tetrahedron Lett., 37: 6185-88; disponible en Versamatrix, Copenhage, Dinamarca) y SPOCC (Rademann *et al.*, 1999, J. Am. Chem. Soc., 121, 5459-66; disponible en Versamatrix, Copenhage, Dinamarca). Ejemplos de intentos de selección en perlas están descritos 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 formados por cadenas de polietileno injertadas en un núcleo de poliestireno. No obstante, el uso de estos soportes en la selección biológica está limitado por una restricción del tamaño, y por la desnaturalización de proteínas determinadas, particularmente enzimas. Los soportes sólidos tales como los derivados de acrilamida, agarosa, celulosa, nilón, sílice o partículas magnetizadas están descritos en la técnica anterior. Estos soportes tienen todas ciertas limitaciones. Por ejemplo, los derivados de acrilamida, agarosa, celulosa, nilón, sílice no pueden ser usados en una síntesis de biblioteca por división/mezcla, y están limitados al uso en matrices paralelas de compuestos que tienen diversidad limitada. Además, hay limitaciones severas para los tipos de química que puede llevarse a cabo directamente en estas superficies restringiendo por lo tanto la síntesis de la biblioteca en fase sólida y el análisis de ligandos. Partículas magnetizadas, dependiendo de su construcción, pueden ser útiles en una síntesis de biblioteca por división/mezcla pero de nuevo la presencia de partículas de hierro restringe los tipos de química y de análisis que puede ser realizado. Mientras que TentaGel y ArgoGel son útiles para la síntesis de bibliotecas, estos son inadecuados para métodos de selección en fase sólida por una unión no específica, restricción del tamaño de la molécula biológica, desnaturalización de proteínas determinadas, particularmente enzimas. Además, son inadecuados para la identificación del ligando por RMN de alta resolución.

Los soportes sólidos usados con la presente invención son perlas de resina, útiles para la síntesis de biblioteca en perla, selección e identificación de ligando/proteína. Por lo tanto, las resinas preferidas según la presente invención son las resinas que comprenden polietilenglicol. Más preferiblemente, la resina es resina del copolímero de acrilamida y polietilenglicol (PEGA), SPOCC (Super Permeable Organic Combinatorial Chemistry) o polioxitileno-Polioxipropileno (POEPOP).

Las resinas de PEGA (copolímero de acrilamida y polietilenglicol; Meldal M., 1992, *Tetrahedron Lett.*, 33: 3077-80), POEPOP (Polioxipropileno-polioxitileno; Renil *et al.*, 1996, *Tetrahedron Lett.*, 37, 6185-88) y SPOCC, (Química orgánica combinatoria super permeable; Rademann *et al.*, 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 5459-66) están compuestas principalmente de polietilenglicol y aumentan bien en solventes orgánicos así como en acuosos. Como no tienen un enlace no específico o lo tienen muy reducido, las resinas de PEGA y SPOCC han sido usadas eficazmente en la selección de innumerables proteínas incluyendo enzimas de diferentes clases. Además, estas resinas están disponibles en diferentes tamaños de poro y pueden permitir la entrada de las proteínas grandes mientras que retienen la actividad. Por ejemplo, las resinas PEGA6000 permiten la entrada de proteínas hasta 600 kDa. En los ejemplos abajo, las resinas PEGA4000 y PEGA1900 con un corte de peso molecular de 200 y 90 kDa, respectivamente, fueron usadas para la selección. En principio, cualquier soporte hidrofílico que sea útil para la síntesis compartimentada, retenga la actividad de las proteínas, y tenga un enlace mínimo no específico, puede ser usado en esta invención de proceso.

Síntesis de biblioteca de ligandos

La biblioteca de ligandos puede ser sintetizada por procesos conocidos, por ejemplo, por síntesis paralela que da lugar a pequeñas bibliotecas (10 a 1000 elementos) (para una revisión reciente véase: Dolle *et al.*, 2002, *J. Comb. Chem.*, 4, 369-418), o por metodología de división/mezcla o división y combinación, como se describe, por ejemplo, en Furka *et al.*, 1991, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37:487-493 y Lam *et al.*, 1991, *Nature*, 354, 82-84. El método de división/mezcla o división y combinación es un método preferido para generar una biblioteca grande, debido al aumento exponencial en el número de compuestos variados producidos. El método de división/mezcla da lugar a una biblioteca de una-perla-un-compuesto de gran tamaño (1000 a millones de elementos). En esta invención, se prefiere la biblioteca de una-perla-un-compuesto, y ejemplos no limitativos de tales bibliotecas están demostrados en los ejemplos abajo.

Los elementos de la biblioteca de ligandos pueden ser construidos mediante la realización de todas las reacciones que forman compuestos directamente en una fase sólida. De forma alternativa, los elementos de la biblioteca de ligandos pueden ser preparados enlazando entre sí elementos básicos preformados en una fase sólida. Los elementos resultantes de la biblioteca pueden ser pequeñas moléculas orgánicas o compuestos oligoméricos. En ambos casos, las moléculas contienen una variedad de grupos funcionales. Los grupos funcionales pueden ser, por ejemplo, alquinos, aldehídos, amidas, aminas, carbamatos, carboxilatos, ésteres, hidróxilos, cetonas, tioles, ureas, y similares. La pequeña molécula orgánica puede pertenecer a varias clases de compuestos, incluyendo pero sin limitarse a, heterociclos (por ejemplo, hidantoinas, benzodiazepinas, pirrolidinas, isoquinolinas), compuestos carbocíclicos, esteroides, nucleótidos, alcaloides, y lípidos (para revisiones que contienen ejemplos véase: 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; Nicolau *et al.*, 2001, *Biopolymers*, 60: 171-193; Dolle, 2002, *J. Comb. Chem.*, 4: 369-418).

Cuando los elementos de la biblioteca de ligandos son oligoméricos, como se ha demostrado en los ejemplos sucesivos, los bloques de construcción pueden ser seleccionados de un repertorio amplio de compuestos bi- o trifuncionales protegidos de manera adecuada, por ejemplo, aminoácidos, ácidos sulfónicos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, glicosil-aminoácidos, lipidil-aminoácidos, aminoácidos heterocíclicos, haloaminas, compuestos aminohidroxí, diaminas, y azido-ácidos. Los bloques de construcción pueden ser conectados usando varios tipos de enlaces químicos, por ejemplo, una amida, una tioamida, una amina, una sulfonamida, una urea, una tiourea, un éter, un tioéter, un éster, un sulfato, un fosfato, una fosfina, un carbonato, un enlace C-C-, enlace-C-N-, un enlace doble, un enlace triple, o un silano. El oligómero puede ser unido usando sólo un tipo de enlace químico o usando una mezcla de enlaces. Cuando los elementos de la biblioteca son aminoácidos, estos preferiblemente son moléculas que contienen aproximadamente de 2 a 40 aminoácidos. Más preferidas son moléculas de aproximadamente 3 a 20 aminoácidos, y las más preferidas tienen aproximadamente de 3 a 12 aminoácidos. Por ejemplo, moléculas de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 aminoácidos funcionan bien en la biblioteca de ligandos.

Los elementos de biblioteca de ligandos pueden ser directamente fijados a un soporte sólido o indirectamente unidos por medio de una variedad de enlaces, preferiblemente por enlaces covalentes (para revistas que describen enlazadores para síntesis de fase sólida, véase: Backes *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1, 86-93; Gordon *et al.*, 1999, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 74, 835-851). Los enlazadores pueden ser ácido lábil (por ejemplo, la amida de Rink como se describe en Rink, 1987, *Tetrahedron Lett.*, 28, 387 y enlaces de sililo sin elementos traza como se describe en Plunkett *et al.*, 1995, *J. Org. Chem.*, 60, 6006-7), base lábil (por ejemplo, HMBA como se describe en Atherton *et al.* 1981, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1: 538), o fotolábil (por ejemplo, tipo 2-nitrobencilo como se describe en Homles *et al.*, 1995, *J. Org. Chem.*, 60, 2318-2319). Los enlazadores pueden ser más específicos y restrictivos del tipo de química realizada, tales como los enlazadores de sililo (por ejemplo, aquellos divididos con fluoruro como se describe en Boehm *et al.*, 1996, *J. Org. Chem.*, 62, 6498-99), enlazadores de alilo (por ejemplo, Kunz *et al.*, 1988, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 711-713), y el enlazador de sulfonamida de unión segura (por ejemplo, como se describe en Kenner *et al.*, 1971, *Chem. Commun.*, 12, 636-7). En una forma de realización de la invención, el enlazador puede comprender o consistir en metionina, tal como un residuo de Met. Cuando el ligando

se une a la resina por medio de Met, es posible descomponer simultáneamente la proteína y liberar el ligando en la misma fase química. En los ejemplos sucesivos, la invención está ilustrada por el uso de un enlazador fotolábil, 2-nitrovalerilo (1) como se describe en Homles *et al.*, 1995, *supra*, que demuestra ser muy robusta para una amplia variedad de químicas y acelera el proceso de identificación.

En algunas formas de realización una molécula separadora puede ser usada. Cuando se usa, la molécula separadora puede ser un péptido o molécula no peptídica y no interactuar con la mayoría o todas las proteínas, y de ese modo no interfiere en el proceso de selección. Tales separadores son útiles para ayudar a la identificación del ligando por MAL-DI-TOF-MS. En otras formas de realización, no se usa un separador y los ligandos pueden entonces ser identificados preferiblemente usando RMN de alta resolución, espectrometría de masas en serie, o una combinación de ambas.

Procesos de selección

Las mezclas de proteínas para ser usadas con la presente invención pueden ser derivadas de una variedad de fuentes diferentes. Las mezclas de proteínas para ser usadas con la presente invención deberían comprender al menos 100, preferiblemente al menos 200, más preferiblemente al menos 300, tal como al menos 500, por ejemplo al menos 1000 proteínas diferentes. En general, la mezcla de proteína estará derivada de una o más fuentes naturales, tal como por ejemplo de células vivas, de tejidos, de individuos enteros, de fluidos corporales tales como la orina, esputo, líquido serospinal, suero o sangre, o de una matriz extracelular. En la presente invención más de una mezcla de proteína diferente es aplicada, por ejemplo 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo la gama de 5 a 10, tal como más de 10 mezclas de proteína diferentes.

Preferiblemente, dichas al menos 2 mezclas de proteínas diferentes son mezclas que son deseables de comparar. Por ejemplo, las mezclas de proteínas pueden ser mezclas derivadas de una población saludable y de una enferma, respectivamente, mezclas de proteínas derivadas de distintos organismos, mezclas de proteínas derivadas de distintas especies, mezclas de proteínas derivadas de distintos tejidos, mezclas de proteínas derivadas de organismos desarrollados diferencialmente o mezclas de proteínas derivadas de células u organismos en diferentes estados, es decir células ciclatas versus células no ciclatas. Las poblaciones enfermas incluyen células/fluidos corporales/tejidos derivados de tejido enfermo, fluido corporal o células derivadas de un individuo con una enfermedad. Dicha enfermedad podría por ejemplo ser una enfermedad neoplásica o preneoplásica, una enfermedad infecciosa, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad inflamatoria, trastornos de CNS, enfermedades metabólicas o enfermedades endocrinas. En una forma de realización de la presente invención al menos una mezcla de proteínas es derivada de una especie infecciosa, tal como por ejemplo hongos, virus, protozoos o bacterias.

Si por ejemplo se usan mezclas de proteínas derivadas de una fuente saludable y de una enferma, respectivamente, los métodos pueden ser usados para identificar ligandos capaces de interactuar específicamente con células enfermas o saludables o tejido puede ser identificado. Tales ligandos pueden ser candidatos de fármacos potenciales. Si por ejemplo se usan mezclas de proteínas derivadas de distintas especies, donde una especie es un agente infeccioso, los ligandos que interactúan específicamente con dicho agente infeccioso pueden ser identificados. Tales ligandos pueden también ser candidatos de fármacos potenciales.

En una forma de realización de la invención, la biblioteca es un conjunto paralelo de modificaciones aleatorias de un compuesto conocido. Luego la mezcla de proteínas preferiblemente comprende una o más proteínas previamente no conocida(s) para asociarse con dicho compuesto, y dichas proteínas pueden por lo tanto ser identificadas por los métodos de la invención.

En otra forma de realización de la invención, la mezcla de proteínas comprende una o más familias de proteínas, que permite la detección de pares de unión de proteína-ligando por inmunoensayos, por ejemplo con la ayuda de anticuerpos que reconocen dichas familias de proteínas.

En la invención del proceso, se aísla el material biológico y mezclas de proteínas son obtenidas para la selección de las bibliotecas de ligandos. Las proteínas pueden ser obtenidas de cualquier fuente, incluso, por ejemplo, de organismos simples tales como hongos, virus, protozoos y bacterias para más organismos complejos tales como plantas y animales, incluyendo mamíferos y particularmente, seres humanos. El material biológico puede ser extraído de líneas celulares individuales, (ilustradas en los ejemplos con miocitos), de organismos celulares (ilustrados en los ejemplos con *E. coli*), o de tejido conteniendo una gran variedad de tipos de células o de organismos pluricelulares enteros. En una forma de realización preferida al menos una mezcla de proteínas es una mezcla de proteínas mamíferas, preferiblemente proteínas humanas, tales como proteínas de células tisulares mamíferas (humanas). Las mezclas de proteínas pueden también comprender proteínas creadas genéticamente de forma recombinante, por ejemplo las mezclas de proteínas pueden también ser obtenidas de sistemas celulares que expresan una biblioteca de ADNc que puede ser marcada, por ejemplo, con un marcador genético que es coexpresado y usado para el análisis de detección. Marcadores genéticos adecuados incluyen, por ejemplo, myc y fotoproteínas tales como de proteína verde fluorescente (GFP). De forma alternativa, la mezcla de proteínas puede comprender proteínas codificadas por ácidos nucleicos mutagenizados, recombinados o por el contrario manipulados.

La intrincación de los procedimientos de extracción aumenta con la complejidad de la fuente del material biológico. Hay varias vías conocidas para aislar proteínas de células, tejido, y organismos mientras que se conserva la actividad de la proteína. Las mezclas de proteínas según la presente invención pueden ser aisladas usando cualquier

método estándar conocido por el experto en la materia. Las proteínas pueden por ejemplo ser extraídas y solubilizadas usando una variedad de sustancias auxiliares tales como detergentes y ureas. Este procedimiento de extracción es particularmente importante para proteínas más grandes hidrofóbicas tales como proteínas de membrana. El uso de detergentes, ureas, y sal es compatible con la selección en resinas de fase sólida a diferencia de métodos que usan geles 2-D. Las proteínas pueden ser extraídas usando un equipamiento estándar tal como la prensa francesa y baño de ultrasonidos. El procedimiento de extracción puede ser manipulado para enriquecer proteínas poco abundantes o para aislar una clase particular de proteínas. Protocolos generales para la extracción de proteínas de distintos organismos están fácilmente disponibles. Véase, por ejemplo, 2-D Proteome Analysis Protocols, A.J. Link (Ed), 1st Ed, 1999, Humana Press: Totowa).

Detección

Una variedad de métodos adecuados son útiles para detectar los pares de unión de proteína-ligando. Por ejemplo, cuando se usa una mezcla de proteína única (ver figura 1), la proteína extraída puede ser inmediatamente incubada con la biblioteca de ligando inmovilizada, y, después del lavado, la proteína unida puede ser detectada directamente en el complejo de unión por la aplicación de una molécula de detección a la mezcla de incubación, tal como plata o colorante fluorescente que no interactúa con el ligando o el soporte sólido. No obstante, se prefiere generalmente que la mezcla de proteínas sea marcada con una sonda de detección antes de la incubación con la biblioteca de ligandos. Por lo tanto, en otra forma de realización, la mezcla de proteínas puede ser marcada con una sonda de detección, por ejemplo, con un colorante fluorescente tal como verde Oregon Green 514TM; véase ejemplo 11), N-metil antranilato (azul; véase ejemplo 13), rojo Rhodamine redTM; véase ejemplo 11), colorante de cianina 2TM, colorante de cianina 3TM, colorante de anina 5TM u otras sondas fluorescentes comúnmente usadas. Véase por ejemplo, Richard P. Haugland, "Handbook of Fluorescent Probes and Research Products", 9th Edition, 2002, Molecular Probes Europe BV: Leiden o en los sitios web (www) "probes.com" y "amershambio-sciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DrugScr+CyDye+Fluors+introduction" para una descripción de colorantes fluorescentes de cianina. La sonda de detección puede también ser una proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde o mutantes fluorescentes de la misma. La sonda de detección puede también ser una sonda que produce quimioluminiscencia, tal como luciferasa o aequorina. En estas formas de realización, tras la incubación de ligandos con proteínas, la biblioteca es lavada y los complejos de unión de proteína-ligando serán detectados por medio del marcador, por ejemplo, fluorescencia o color. Estos pares de unión de proteína-ligando pueden ser inmediatamente aislados usando procedimientos de clasificación automática o manual. Si la sonda de detección es una sonda fluorescente, entonces la clasificación automática preferiblemente implica el uso de un FAB y/o una clasificadora de perlas activadas por fluorescencia. La sonda de detección puede además ser un compuesto capaz de producir quimioluminiscencia, tal como por ejemplo luciferasa o aequorina. La sonda de detección puede además ser una enzima capaz de catalizar una reacción detectable, tal como por ejemplo fosfatasa o peroxidasa. La sonda de detección puede además ser un metal, por ejemplo oro. La mezcla de proteínas puede ser marcada con la sonda de detección por cualquier método convencional dependiendo de la naturaleza de la sonda de detección.

En particular, puesto que se usa más de una mezcla de proteínas se prefiere que las mezclas de proteínas sean marcadas con una sonda de detección antes de la incubación con la biblioteca de ligandos. Las mezclas de proteínas individuales pueden ser marcadas usando sondas de detección diferentes o sondas de detección similares. No obstante se prefiere que la mezcla de proteínas diferentes sea marcada con sondas de detección diferentes, para permitir identificar de qué mezcla de proteínas está derivada la proteína. Por lo tanto, se prefiere que 2, tal como 3, por ejemplo 4, tal como 5, por ejemplo en la gama de 5 a 10 mezclas de proteínas diferencialmente marcadas sean usadas con la invención. La detección de un par de unión de proteína-ligando inmovilizado implica por lo tanto detectar un ligando de la biblioteca que se une diferencialmente con 2 o más mezclas de proteínas diferencialmente marcadas.

Está incluido dentro de la presente invención el hecho de que proteínas individuales de una mezcla de proteínas pueden ser diferencialmente marcadas, es no obstante preferido que todas las proteínas de una mezcla de proteínas sean marcadas con el mismo tipo de sonda de detección. Cualquiera de las sondas de detección descritas aquí arriba o abajo pueden ser usadas y procedimientos de marcado similares pueden también ser aplicados para la identificación de pares de unión de proteína-ligando diferenciales de fuentes múltiples relacionadas (véase ejemplo 11). Por ejemplo, como se enseña en el ejemplo 11, una mezcla de proteínas de tejido normal y una mezcla de proteínas de tejido enfermo pueden ser diferencialmente marcadas, un colorante diferente o marcador fluorescente (y similares) para cada una de las mezclas de proteínas. Tras la incubación con la biblioteca de ligandos y lavado de la proteína no unida, los pares de unión de ligando-proteína diferenciales, aquellos que demuestran selectividad, es decir, que son específicos para un conjunto de proteínas, son detectados y aislados automáticamente o manualmente basándose en el marcador particular o sonda de detección.

En otra forma de realización, las proteínas son marcadas con una sonda de detección, que es una sonda (marca) de afinidad tal como biotina. Tras la incubación y lavado de las proteínas y biblioteca de ligandos para eliminar la proteína no unida, los ligandos unidos con, por ejemplo, proteínas marcadas con biotina pueden ser detectados, por ejemplo, usando estreptavidina complejada con una fosfatasa o una peroxidasa. Después de la adición de un sustrato de fosfatasa o de peroxidasa adecuado, el complejo de unión de proteína-ligando es detectado.

En otra forma de realización, las proteínas unidas a ligandos pueden ser detectadas usando radioactividad, es decir la sonda de detección puede ser un compuesto radiactivo. Las proteínas pueden ser marcadas con dicho compuesto radiactivo por cualquier método convencional. Por ejemplo, el organismo o célula es alimentado con un aminoácido

radiactivo que es incorporado en sus proteínas. Tras la incubación de las proteínas radiactivas con la biblioteca de ligando y el lavado, los pares de ligando-proteína unidos radiactivos son detectados por, por ejemplo, autorradiografía, y los pares de unión de ligando-proteína son aislados.

5 En otra forma de realización, clases particulares de proteínas que se unen con ligandos pueden ser detectadas usando sondas específicas, por ejemplo, un anticuerpo específico de la familia en un inmunoensayo tal como un ensayo ELISA. El tratamiento con un anticuerpo monoclonal conjugado para una familia de proteínas tras la incubación y lavado, por ejemplo, proporciona información sobre la expresión de las proteínas relacionadas. Cuando las mezclas de proteínas son obtenidas de fuentes de proteínas relacionadas, por ejemplo, de tejido enfermo y normal, las bibliotecas de ligandos pueden ser incubadas separadamente con cada conjunto de proteínas. Después de la detección e identificación de los pares de unión de proteína-ligando, una valoración de la expresión de la clase de proteína particular en cada estado (por ejemplo, normal vs. enfermo) puede ser determinada. Un anticuerpo monoclonal puede ser conjugado a un colorante fluorescente o a una enzima tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina para cuantificación por ELISA. El anticuerpo puede también ser conjugado a perlas magnéticas de hierro por técnicas de rutina conocidas. Las perlas magnéticas se concentran cerca de la ubicación de la proteína que forma una “roseta” sólida alrededor de las perlas de soporte sólidas, o en la hoja de membrana, o rosca para detección.

Se prefiere que al menos una mezcla de proteína sea marcada usando un marcador fluorescente, es incluso más preferido que todas las mezclas de proteína sean marcadas usando diferentes marcadores fluorescentes.

20 *Aislamiento*

Complejos o pares de ligando-proteína unidos o pueden ser aislados de la masa de la biblioteca de ligandos por varios medios dependiendo de la naturaleza de la sonda de detección. Los métodos de aislamiento incluyen por ejemplo, clasificar manualmente las perlas que contienen proteína marcada unida detectando la sonda de detección por ejemplo con la ayuda de un microscopio o clasificando por fluorescencia o por color dependiendo del proceso de selección usado. De forma alternativa, el proceso de clasificación puede ser automatizado con el uso de una clasificadora de perlas, por ejemplo usando “clasificación de perlas activadas por fluorescencia” (FABS), por ejemplo, se pueden usar clasificadoras especialmente diseñadas y comercialmente disponibles (p. ej. Union Biometrica, Sommerville; Mass) y detectando la intensidad de fluorescencia (Meldal, 2002, Biopolymers, 66, 93-100). En general, las perlas de resina pueden ser clasificadas a razón de aproximadamente 100 a 200 perlas por segundo, o incluso más rápido dependiendo del equipamiento usado y su capacidad de lectura. Una gama de aproximadamente 5 a 500, tal como 5 a 110, preferiblemente aproximadamente 5 a 50 perlas por segundo es clasificada con instrumentos conocidos. Índices más lentos pueden ser usados para aumentar la exactitud. Es preferido un nivel donde la lectura por ejemplo, sólo una perla de resina pasa a través del detector una vez.

35 *Proceso para la identificación de compañeros de unión de proteínas y ligandos*

Los compañeros de unión de proteínas y ligandos pueden ser identificados usando cualquier técnica convencional conocida por el experto en la técnica, por ejemplo cualquiera de las técnicas descritas aquí abajo. Se prefiere que la perla de resina que comprende el par de unión de proteína-ligando sea aislada y la identificación del ligando y/o identificación de la proteína se realiza en la perla de resina aislada. Es así preferido que bien el ligando o la proteína o más preferiblemente ambos sean identificados usando métodos “en perla”. “En perla” se refiere a los métodos donde el proceso de identificación o parte del mismo se realiza directamente en una perla, por ejemplo métodos donde el ligando y/o proteína son identificados en la perla, por ejemplo, por espectroscopia, o a métodos en los que el ligando y/o proteína se digiere enzimáticamente en la perla directamente. En una forma de realización preferida de la invención, la identificación de compañeros de unión de proteínas y ligandos es la identificación del complejo de proteína/ligando en la misma y única perla. En esta forma de realización, las perlas conteniendo polietilenglicol, preferiblemente se usan resinas basadas en PEG con un tamaño en la gama de 500-800 μm . En una forma de realización, una perla de resina que contiene el par de unión es cortada en dos porciones desiguales. Una porción de la perla se utiliza para identificar el ligando, mientras que la otra porción se utiliza para identificar la proteína. En otra forma de realización, la proteína es primero descompuesta en sus péptidos constitutivos enzimáticamente o químicamente (véase abajo) y el ligando es luego liberado. Tanto el ligando como los péptidos de proteína son simultáneamente analizados por espectrometría de masas (véase infra). En esta forma de realización, el ligando puede ser primero analizado por RMN (véase abajo) antes de descomponer la proteína y liberar el ligando. En una forma de realización particular, especialmente para el análisis por RMN, el ligando es unido al soporte sólido por medio de un residuo de metionina y la proteína y ligando pueden ser simultáneamente descompuestos y liberados por tratamiento con CNBr.

60 *Identificación de ligandos*

Después de la detección y aislamiento de los complejos de ligando-proteína, el ligando puede ser identificado. El proceso para la identificación del ligando depende del tipo de biblioteca usado. Por ejemplo el ligando puede ser identificado usando un análisis por espectrometría de masas, por espectroscopia de RMN, por infrarrojos (IR), elemental o combinaciones de los mismos.

65 En una forma de realización de la invención se prefiere que el ligando sea identificado usando métodos “en perla” (véase más arriba y abajo).

Para una biblioteca de compuestos principalmente oligoméricos, el ligando complejado puede ser analizado por espectroscopia de masas (MS), particularmente si la biblioteca fue sintetizada de manera que el historial sintético del compuesto es capturado, por ejemplo, usando un procedimiento de recubrimiento para generar fragmentos del compuesto que difieren en masa por un bloque de construcción (véase, por ejemplo, Youngquist *et al.*, 1995, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 3900-06). Este procedimiento de recubrimiento es más eficaz cuando el tapón y el bloque de construcción son reaccionados al mismo tiempo. El agente de recubrimiento puede ser cualquier clase de compuesto que tenga al menos un grupo funcional en común con el bloque de construcción usado para generar el oligómero, de modo que el agente de recubrimiento y el bloque de construcción pueden reaccionar cuando son añadidos a la resina en una proporción apropiada. De forma alternativa, el agente de recubrimiento puede tener dos grupos funcionales en común con el bloque de construcción donde uno de los grupos en común, tal como el grupo del bloque de construcción que es usado para el alargamiento del oligómero, está protegido ortogonalmente. Por ejemplo, en una síntesis de un péptido mediante la estrategia Fmoc mostrada en los ejemplos abajo, el agente de recubrimiento podría ser el mismo que el bloque de construcción pero con un grupo Boc protegiendo la amina reactiva en vez del grupo Fmoc (véanse Ejemplos 5, 6, y 7 y St. Hilaire *et al.*, 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 13312-13320). En otro ejemplo, si el bloque de construcción es una haloamina protegida, el agente de recubrimiento podría ser el alquilhaluro correspondiente.

Cuando la biblioteca de ligando es sintetizada por síntesis paralela (un conjunto paralelo), el ligando de unión puede ser identificado simplemente sabiendo qué componentes de la reacción específicos fueron reaccionados en un compartimiento particular. La estructura puede ser confirmada por seccionamiento de una pequeña porción de compuesto del soporte sólido y analizada usando métodos de química rutinarios tales como análisis por infrarrojos (IR), por resonancia magnética nuclear (RMN), por espectroscopia de masas (MS), y elemental. Para una descripción de varios métodos analíticos útiles en química combinatoria, véase: Fitch, 1998-99, *Mol. Divers.*, 4, 39-45; y *Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry*, M.E. Swartz (Ed), 2000, Marcel Dekker: New York.

En el caso de bibliotecas sintetizadas por el enfoque de mezcla-división donde la estructura precisa del compuesto es desconocida, el ligando complejado puede ser identificado usando una variedad de métodos. El compuesto puede ser seccionado del soporte sólido, por ejemplo, la perla de resina, y luego analizado usando IR, MS, o RMN. Para el análisis por RMN, perlas más grandes que contienen aproximadamente 5 nmoles de material pueden ser usadas para la adquisición de espectros de RMN en 1 dimensión (1-D) y en 2 dimensiones (2-D). Además, estos espectros pueden ser logrados usando técnicas de MAS-RMN de alta resolución. De forma alternativa, espectros de MAS-RMN de alta resolución pueden ser adquiridos mientras que el ligando sigue estando unido al soporte sólido, como se describe por ejemplo, en Gofredsen *et al.*, 2000, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1: 1167-71. De este modo, en una forma de realización preferida de la invención, el ligando es identificado usando RMN de alta resolución. Preferiblemente la resina usada en esta forma de realización es una resina comprendiendo polietilenglicol, por ejemplo resinas basadas en PEG como PEGA, SPOCC y POEPOP.

Normalmente, las perlas de resina usadas para la síntesis de bibliotecas contienen aproximadamente 100 a 500 μ moles de material, siendo generalmente insuficiente para un análisis directo usando técnicas de RMN. En estas situaciones, las bibliotecas de ligando pueden ser sintetizadas con codificación especial para facilitar la identificación del ligando. Para una revisión de 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 paralela de la molécula codificante (por ejemplo, ADN, PNA, o péptido) junto con los compuestos de la biblioteca. Esta estrategia no es preferida, puesto que requiere un esquema de grupo protector ortogonal bien planificado, de larga duración. Además, la propia molécula codificante puede a veces interactuar con el receptor de proteína conduciendo a falsos positivos. De forma alternativa, los elementos de la biblioteca de ligando pueden ser codificados usando marcas de radiofrecuencia. Este método alivia el problema de falsos positivos que proviene de las marcas de codificación, pero es generalmente útil sólo para bibliotecas de ligandos pequeñas en el sistema de una-perla-un-compuesto debido a la masa total de la marca de radiofrecuencia. De forma alternativa, las perlas individuales pueden ser analizadas de una manera no destructiva mediante la formación de imágenes por infrarrojos. No obstante, este método da información limitada y aunque es útil para una preselección, no se recomienda para la determinación estructural concluyente. La MS puede ser usada solo para identificar el elemento de la biblioteca de ligandos. El ligando puede ser seccionado del soporte sólido, la masa molecular puede ser determinada, y posteriormente fragmentada en subespecies para determinar la estructura de forma concluyente. Los métodos basados en MS para la identificación de ligandos son útiles en esta invención, puesto que requieren poco material, y pueden utilizar pico- a femtomoles de cantidades de compuesto.

Una combinación de ambas RMN de alta resolución y espectrometría de masas puede también ser usada para identificar los ligandos en esta invención.

60 *Aislamiento e identificación del elemento de proteína de unión*

La proteína de unión puede ser identificada usando cualquier método convencional conocido por el experto en la técnica. Por ejemplo, la proteína puede ser extraída de perlas e identificada por ejemplo por electroforesis en gel, tal como electroforesis de gel 2D, espectrometría de masas, tal como MALDI-TOF-MS, RMN, secuenciación peptídica, por ejemplo por degradación de Edman, obtención de la huella genética de la masa peptídica o cualquier otro método adecuado. No obstante, se prefiere generalmente que la proteína sea identificada usando métodos "en perla" (véase más arriba y abajo).

En general, una vez que el elemento de unión de ligandos ha sido identificado y aislado con su proteína unida, el elemento de proteína de unión puede ser identificado. No obstante, en algunas formas de realización de la invención el elemento de unión a proteínas puede ser identificado antes que el ligando o puede ser identificado simultáneamente.

5 En una forma de realización, una perla de resina que contiene el par de unión es cortado en dos porciones. Una parte de la perla se utiliza para identificar el ligando, mientras que la otra parte se utiliza para identificar la proteína. Esto puede ser realizado, por ejemplo, mediante la realización de degradación sistemática de la proteína en perla. La mayoría de las veces, la proteína puede ser descompuesta enzimáticamente en sus péptidos constituyentes, por ejemplo usando una proteasa, tal como tripsina u otras peptidasas conocidas. Protocolos generales para la descomposición enzimática de proteínas durante el análisis proteómico pueden ser encontrados, por ejemplo, en 2-D Proteome Analysis Protocols, A.J. Link (Ed), 1st Ed, 1999, Humana Pr: Totowa. Dada la naturaleza hidrofílica de las resinas, la tripsina funciona eficazmente en perlas, y puede dividir eficazmente proteínas nativas, al igual que proteínas que han sido modificadas de manera covalente con una sonda de detección. El número de péptidos razonablemente dimensionados generados por seccionamiento enzimático es mejorado si las proteínas son primero desnaturalizadas. La desnaturalización es fácilmente realizada en perla, por ejemplo, en resinas basadas en PEG que son robustas y disueltas en la mayoría de desnaturalizantes usados, tales como guanidina HCl y urea. Por el contrario, la desnaturalización puede ser obtenida por cambios drásticos de temperatura y de pH. Otras enzimas de seccionamiento pueden ser usadas, por ejemplo, endoproteasa Arg-C, endoproteasa Lys-C, quimiotripsina, endoproteasa Asp-N, y endoproteasa Glu-C. A veces, los productos químicos tales como CNBr (como se describe, por ejemplo, en Compagnini *et al.*, 2001, Proteomics, 1: 967-74) y $[cis-Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ (como se describe, por ejemplo, en Milovic *et al.*, 2002, J. Am. Chem. Soc., 124, 4759-69) pueden ser usados para degradar una proteína en sus péptidos constituyentes.

De forma alternativa, el ligando identificado puede ser resintetizado y acoplado a un soporte de afinidad tal como sefarosa o sefacril, y el elemento de proteína purificado por cromatografía de afinidad. La mezcla de proteína no marcada es aplicada a la columna de afinidad y, después del lavado de la proteína no unida, la proteína unida es eluida con el ligando solubilizado. Esta vía requiere mucho tiempo y reactivo. El ligando debe primero ser sintetizado y purificado, y luego fijado al soporte de afinidad. También debería ser producido en cantidades suficientes para que la concentración requerida pueda utilizarse para eluir la proteína de la columna de afinidad. De forma alternativa, tampones de diferente pH, con alto contenido en sal y/o desnaturalizantes pueden utilizarse para eluir la proteína. A veces puede ser difícil eluir proteínas multiméricas de columnas de afinidad usando un ligando monovalente debido a los efectos de avidéz.

Para acelerar el proceso y aliviar los problemas mencionados, la proteína puede ser degradada en péptidos mientras que sigue estando unida a su compañero de unión de ligandos, y los péptidos generados son analizados. Por ejemplo, el ligando se vuelve a sintetizar a pequeña escala (25-50 perlas) en una resina útil, preferiblemente la misma resina usada para síntesis de la biblioteca, tal como resina PEGA4000 o resina PEGA6000. Después de la unión de proteína no marcada de la mezcla y lavado de la proteína no unida, el complejo de ligando-proteína puede ser inmediatamente degradado en péptidos constituyentes bien enzimática o químicamente, usando procesos conocidos y reactivos y los péptidos pueden ser analizados, por ejemplo, por obtención de la huella genética de la masa peptídica, u otros métodos conocidos. Usando este proceso, diferentes complejos de proteína-ligando pueden rápidamente ser digeridos. Este proceso puede ser fácilmente automatizado.

La proteína unida al ligando puede ser identificada por cualquier método adecuado tal como MS o secuenciación de degradación de Edman. Para protocolos generales sobre la identificación de proteínas usando técnicas de proteómicas, véase, por ejemplo, 2-D Proteome Analysis Protocols, A.J. Link (Ed), 1st Ed, 1999, Humana Pr: Totowa. La proteína puede ser identificada a partir de su huella digital de la masa peptídica, por ejemplo, mediante la masa de algunos péptidos constituyentes obtenidos de digestas enzimáticas. La masa de la mezcla de péptidos generados de las proteínas digeridas puede ser determinada usando MALDI-TOF-MS o ES-MS. Las masas o huellas digitales peptídicas se utilizan para buscar bases de datos de proteínas conocidas y productos genéticos para identificar la(s) proteína(s). Para aumentar la exactitud de la identificación de proteína en la ausencia de otra información de limitación tal como μl y masa, los resultados de diferentes digestas usando diferentes procesos para el seccionamiento son combinados. En vez de, o además de, la generación de huellas digitales peptídicas, un único péptido de la proteína puede ser fragmentado, y su secuencia de aminoácidos determinada. La secuencia puede utilizarse para identificar proteínas conocidas y desconocidas, por ejemplo, por comparación con bases de datos de proteínas. El uso de MS para identificar las proteínas(s) está bien ajustado a la degradación de complejos de proteínas en perlas individuales, puesto que se requiere muy poco material para la identificación (pico-femtomoles). De forma alternativa, las proteínas pueden ser identificadas usando secuenciación N-terminal por medio de la degradación de Edman; a condición de que el N-término no sea bloqueado. Esto generalmente requiere cantidades mayores de material (picomoles).

60 *Ligandos y proteínas*

Los ligandos, proteínas y par de unión de ligando/proteína pueden ser identificados por los métodos según la invención.

65 El ligando puede ser un candidato de fármaco potencial. El ligando puede por ejemplo ser un candidato de fármaco para el tratamiento de una enfermedad neoplásica o preneoplásica una enfermedad autoinmunológica, una enfermedad infecciosa, una enfermedad cardiovascular, trastornos del sistema nervioso central, enfermedades metabólicas, enfermedades endocrinas o una enfermedad inflamatoria.

ES 2 318 266 T3

Los ligandos pueden ser los ligandos directamente identificados mediante la invención u homólogos funcionales de los mismos. Mediante el término “homólogo funcional” se entiende una molécula preferiblemente estructuralmente similar, que es capaz de asociarse específicamente con la(s) misma(s) proteína(s). Preferiblemente, “homólogos funcionales” son homólogos estructurales. Preferiblemente, los ligandos son ligandos aislados, más preferiblemente aislados y purificados.

Por lo tanto, los ligandos pueden ser seleccionados del grupo que consiste en ligandos que comprenden o más preferiblemente que consisten en

- 10 Pip-Pal-Pal-Phe-Pya-Pip [SEC ID NO: 7];
- Pya-Hyp-Hyp-Phe-Acm-Tyr [SEC ID NO: 8];
- 15 Pya-Gua-Pip-Acc-Phe-Pip [SEC ID NO: 9];
- Phe-Aze-Gly-His-Gly-Aze [SEC ID NO: 10];
- Phe-Thr-Pya-Pip-Asp-His [SEC ID NO: 11];
- 20 Phe-Ppy-Acc-Ala-Ppy-Hpy [SEC ID NO: 12];
- Phe-Thr-Tyr-Phe-Ala-Lys [SEC ID NO: S1];
- His-Tyr-Pip-Thr-Acm-Abi [SEC ID NO: 52];
- 25 Tyr-Pip-Thr-Acm-Aze-His [SEC ID NO: 53];
- Phe-Phe-Phe-Pip-Aze-Gua [SEC ID NO: 54];
- 30 Phe-Gua-Asp-Abi-His-Aze [SEC ID NO: 55];
- Phe-Abi-Pal-Hyp-Thr-Hyp [SEC ID NO: 65];
- Phe-Gua-Pal-Tyr-Gua-Tyr [SEC ID NO: 66];
- 35 Pal-Abi-Gly-Gly-Abi-His [SEC ID NO: 67];
- Abi-Thr-Hyp-Hyp-His- [SEC ID NO: 68];
- 40 Pya-Gua-Abi-Asp-Abi-Tyr [SEC ID NO: 69];
- Abi-Phe-Abi-Phe-Che-Tyr [SEC ID NO: 18];
- Pal-Gly-Abi-Hyp-Pya-Trp [SEC ID NO: 56]
- 45 Lys-Met-Hyp-Trp-Tyr-Gua [SEC ID NO: 57];
- Phe-Asp-Trp-Gua-Thr-Gua [SEC ID NO: 58];
- 50 T(Sa)-F-N-H-S [SEC ID NO: 19];
- T(Sa)-F-A-L-V [SEC ID NO: 20];
- T(Sa)-F-G-I-W [SEC ID NO: 21];
- 55 T(Sa)-F-G-I-M [SEC ID NO: 22];
- T(Sa)-G-V-F-L [SEC ID NO: 23];
- 60 T(Sa)-Y-S-M-P [SEC ID NO: 24];
- T(Sa)-L-S-W-W [SEC ID NO: 25];
- T(Sa)-H-W-H-1 [SEC ID NO: 26];
- 65 T(Sa)-H-W-V-V [SEC ID NO: 27];
- T(Sa)-H-L-G-Y [SEC ID NO: 28];

ES 2 318 266 T3

T(Sa)-I-Y-L-F [SEC ID NO: 29];

T(Sa)-F-G-L-M [SEC ID NO: 30];

5 T(Sa)-W-V-N-M [SEC ID NO: 31];

T(Sa)-M-V-N-W [SEC ID NO: 32];

T(Sa)-H-I-G-Y [SEC ID NO: 33];

10 T(Sa)-L-Y-L-F [SEC ID NO: 34];

T(Sa)-H-W-H-L [SEC ID NO: 35];

15 T(Sa)-F-V-W-H [SEC ID NO: 36];

T(Sa)-Y-G-A-M [SEC ID NO: 59];

T(Sa)-L-Y-I-F [SEC ID NO: 37];

20 T(Sa)-S-V-W-F [SEC ID NO: 60];

T(Sa)-H-Y-F-F [SEC ID NO: 61];

25 T(Sa)-I-Y-Y-F [SEC ID NO: 62];

T(Sa)-Q-P-G-M [SEC ID NO: 63];

T(Sa)-G-P-H-G [SEC ID NO: 64];

30 ManS-Gly-ManS-Asp-Asn-Ala [SEC ID NO: 38];

ManS-Gly-GlcNN-Asn-ManS-Tyr [SEC ID NO: 39];

35 ManN-Phe-Trp-Ser-Lys-His [SEC ID NO: 40];

GlcNN-Trp-Phe-Asp-Trp-Pro [SEC ID NO: 41];

GlcNN-Val-GlcNN-His-ManS-Gly [SEC ID NO: 42];

40 ManN-ManS-ManN-Trp-Ser-Trp [SEC ID NO: 43];

Gly-Pro-Lys-Lys-Tyr-His [SEC ID NO: 44]; o

45 His-Thr-Trp-Gly-Tyr-Trp [SEC ID NO: 45]; u

homólogos funcionales de los mismos.

50 Homólogos funcionales son compuestos preferiblemente relacionados estructuralmente capaces de interactuar con la(s) misma(s) proteína(s). Preferiblemente, homólogos funcionales comprenden 1, como 2, por ejemplo 3 sustituciones, preferiblemente una sustitución de un monómero por otro, preferiblemente una sustitución de un aminoácido por otro. Preferiblemente dicha sustitución es una sustitución conservadora.

55 Por lo tanto, un ligando comprendiendo o que consiste en Pip-Pal-Pal-Phe-Pya-Pip [SEC ID NO: 7] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y quinasa de cadena ligera de la miosina activada por Ca^{2+} /calmodulina, regulador de la variante de señalización de proteína G (RGS 14), componente de ATP-sintasa (subunidad e), citocromo P450, proteínas ribosómicas (60s) o SPTR, pueden ser identificados mediante la presente invención.

60 Además, un ligando que comprende o que consiste en Pya-Hyp-Hyp-Phe-Acm-Tyr [SEC ID NO: 8] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y troponina T, quinasa de cadena ligera de la Miosina activada por Ca^{2+} /calmodulina o proteína quinasa dependiente de cGMP pueden ser identificados mediante la presente invención.

65 Además, un ligando comprendiendo o que consiste en Pya-Gua-Pip-Acc-Phe-Pip [SEC ID NO: 9] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y NADH-deshidrogenasa, componente de unión de ATP, Miosina, o proteína asociada a Histona pueden ser identificados mediante la presente invención.

ES 2 318 266 T3

Además, un ligando comprendiendo o que consiste en Phe-Aze-Gly-His-Gly-Aze [SEC ID NO: 10] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y proteínas hipotéticas (gi 20474763); proteínas ricas en cisteína y tirosina de función desconocida, ATP-sintasa mitocondrial; proteínas ribosómicas (60s serie L) o SPTR pueden ser identificados mediante la presente invención.

5

Además, un ligando comprendiendo o que consiste en Phe-Thr-Pya-Pip-Asp-His [SEC ID NO: 11] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y canal de sodio (gi 18591322), canal de cloruro (gi 6978663/4502867), troponina I (gi 1351298); proteína de dedos de Zn (gi 18591322); SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisomal (putativo) (gi 12853655); receptor Beta-2 adregénico (gi 12699028) pueden ser identificados mediante la presente invención.

10

Además, un ligando que comprende o que consiste en Phe-Ppy-Acc-Ala-Ppy-Hpy [SEC ID NO: 12] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y troponina T, fosfolipasa C, o acil esterol fosfatidicolina transferasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

15

Además, un ligando que comprende o que consiste en Phe-Thr-Tyr-Phe-Ala-Lys [SEC ID NO: 13] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055); anhidrasa carbónica VII (gi 10304383) pueden ser identificados mediante la presente invención.

20

Además, un ligando que comprende o que consiste His-Tyr-Pip-Thr-Acm-Abi [SEC ID NO: 14] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho complejo de ligando y ciclina A-CDK2 de cadena C P27 (gi2392395); proteína Hipotética XP_154035 pueden ser identificados mediante la presente invención.

25

Además, un ligando que comprende o que consiste en Phe-Abi-Pal-Hyp-Thr-Hyp [SEC ID NO: 65] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y proteína asociada a dedos de zinc, proteínas ribosómicas, o proteína fosfatasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

30

Además, un ligando que comprende o que consiste en Phe-Gua-Pal-Tyr-Gua-Tyr [SEC ID NO: 66] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Glucosa-6-fosfatasa, succinato deshidrogenasa, proteína interactuante con ARL, SPTR, o proteína de unión a ácidos nucleicos pueden ser identificados mediante la presente invención.

35

Además, un ligando comprendiendo o que consiste en Pal-Abi-Gly-Gly-Abi-His [SEC ID NO: 67] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y proteína ribosómica 60s, proteína ribosómica 40s, o receptor de lipoproteína de baja densidad pueden ser identificados mediante la presente invención.

40

Además, un ligando que comprende o que consiste en Abi-Thr-Hyp-Hyp-His [SEC ID NO: 68] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y fosfofructoquinasa, proteína de unión de selenio, proteína quinasa rica en arginina y serina, guanilato-quinasa, proteína tirosina quinasa, fosfatasa alcalina, Simporter, SPTR, proteína WAP, GTP hidrolasa, o filamento de actina pueden ser identificados mediante la presente invención.

45

Además, un ligando que comprende o que consiste en Pya-Gua-Abi-Asp-Abi-Tyr [SEC ID NO: 69] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y SPTR (gi 20869775); proteínas ribosómicas (60s) (gi 20875941/6677773); (canal de calcio (gi 3202010); isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046); canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP 034740); regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049) pueden ser identificados mediante la presente invención.

50

Además, un ligando que comprende o que consiste en Abi-Phe-Abi-Phe-Che-Tyr [SEC ID NO: 18] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y catepsina E, proteína ribosómica, proteína de unión de actina, o aminoácido transferasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

55

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-F-N-H-S [SEC ID NO: 19] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y fosfato acetil transferasa, proteína de impacto ácido, o subunidad de factor de conversión de molibdopterina pueden ser identificados mediante la presente invención.

60

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-F-A-L-V [SEC ID NO: 20] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y chaperona DnaK o transposasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

65

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-F-G-I-W [SEC ID NO: 21] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando e histidina sintetasa o aspartato carbamoil transferasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

65

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-F-G-I-M [SEC ID NO: 22] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y transposasa, regulador transcripcional, o GroEL pueden ser identificados mediante la presente invención.

ES 2 318 266 T3

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-G-V-F-L [SEC ID NO: 23] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y proteína ribosómica 50 S, lipoproteína de unión a hemo, regulador para D-glucurato, D-glicerato y D-galactarato, o glutamina ARNt sintetasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-Y-S-M-P [SEC ID NO: 24] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y biotina sintetasa, UDP-glucosa deshidrogenasa, proteína tirosina quinasa, o proteínas de complejo de ácido graso-oxidasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-L-S-W-W [SEC ID NO: 25] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y 7-alfa-hidroxiesteriode deshidrogenasa dependiente de NAD, homocisteína transferasa, nitrato-reductasa, lactato deshidrogenasa, o citrato sintetasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-H-W-H-I [SEC ID NO: 26] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Manosa-1-fosfato guanil transferasa o isopropil malato deshidrogenasa puede ser identificado mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-H-W-V-V [SEC ID NO: 27] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando, aspartato descarboxilasa dependiente de Piruvoil, colicina E2, o histidina quinasa pueden ser identificados mediante la presente invención. Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-H-L-G-Y [SEC ID NO: 28] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando e isomerasa fosfomanosa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-I-Y-L-F [SEC ID NO: 29] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y ATP sintetasa unida a la membrana o ATP hidrolasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-F-G-L-M [SEC ID NO: 30] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Hemolisina C, sistema de transporte de potasio de alta afinidad, quinona oxidorreductasa, o NA(D)PH oxidorreductasa dependiente de ferredoxina pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-W-V-N-M [SEC ID NO: 31] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y transposasa o proteína de membrana interna para fijación al fago pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-M-V-N-W [SEC ID NO: 32] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y helicasa dependiente de ATP o mob C pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-H-I-G-Y [SEC ID NO: 33] al igual que un par de unión de ligando-proteína comprendiendo dicho ligando y subunidad Fimbrial o piruvato-quinasa de membrana externa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando comprendiendo o que consiste en T(Sa)-L-Y-L-F [SEC ID NO: 34] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y proteína Fimbrial, precursor de fosfatasa alcalina, proteínas relacionadas con citocromo pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando comprendiendo o que consiste en T(Sa)-H-W-H-L [SEC ID NO: 35] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y corismato mutasa, xantina deshidrogenasa, o carbamoil fosfato sintetasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-F-V-W-H [SEC ID NO: 36] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y NADH-deshidrogenasa, proteína implicada en la biosíntesis flagelar y componente de conmutación motriz, proteína de unión a lisina-arginina-ornitina, o componente de unión de ATP de proteína de transporte de glicina-betaína-prolina pueden ser identificados mediante la presente invención. Además, un ligando que comprende o que consiste en T(Sa)-L-Y-I-F [SEC ID NO: 37] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Colicina, lipoproteína de membrana externa, o arilsulfatasa pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en ManS-Gly-ManS-Asp-Asn-Ala [SEC ID NO: 38] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A o lectina de *P. sativum* pueden ser identificados mediante la presente invención.

Además, un ligando que comprende o que consiste en ManS-Gly-GlcNN-Asn-ManS-Tyr [SEC ID NO: 39] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A, lectina de *P. sativum*, o lectina de *L. culinaris* pueden ser identificados mediante la presente invención.

ES 2 318 266 T3

Además, un ligando que comprende o que consiste en ManN-Phe-Trp-Ser-Lys-su [SEC ID NO: 40] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A o lectina de *P. sativum* pueden ser identificados mediante la presente invención.

5 Además, un ligando que comprende o que consiste en GlcNN-Trp-Phe-Asp-Trp-Pro [SEC ID NO: 41] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A pueden ser identificados mediante la presente invención.

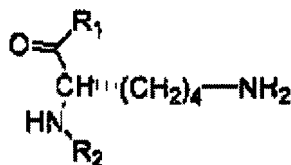
10 Además, un ligando comprendiendo o que consiste en GlcNN-Val-GlcNN-His-ManS-Gly [SEC ID NO: 42] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A o lectina de *P. sativum* pueden ser identificados mediante la presente invención.

15 Además, un ligando que comprende o que consiste en ManN-ManS-ManN-Trp-Ser-Trp [SEC ID NO: 43] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A, lectina de *P. sativum*, o lectina de *L. culinaris* pueden ser identificados mediante la presente invención.

20 Además, un ligando que comprende o que consiste en Gly-Pro-Lys-Lys-Tyr-His [SEC ID NO: 44] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A, lectina de *P. sativum*, o lectina de *L. culinaris* pueden ser identificados mediante la presente invención.

25 Además, un ligando que comprende o que consiste en His-Thr-Trp-Gly-Tyr-Trp [SEC ID NO: 45] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y Con A pueden ser identificados mediante la presente invención.

30 Además, un ligando que comprende o que consiste en Pal-Gly-Abi-Hyp-Pya-Trp [SEC ID NO: 56] al igual que un par de unión de proteína-ligando aislado comprendiendo dicho ligando y NAS putativa sin clasificar (gi 12861084) o proteína de dedos de zinc 64 Putativa (gi 12849329) pueden ser identificados mediante la presente invención. Además, ligandos de la fórmula I,



pueden ser identificados mediante la presente invención.

40 Tales ligandos son generalmente aludidos como "AJn", donde n es un número entero. Cada número entero n, identifica un grupo específico R_1 y R_2 , véase por ejemplo Tabla 10. R_1 y R_2 pueden ser seleccionados individualmente de cualquier sustituyente adecuado, por ejemplo alquilo, alquen, alquin, arilo, aminas, aminoácidos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos, alcoholes, alcoholes tio, aldehídos, sistemas anulares aromáticos y no aromáticos opcionalmente comprendiendo uno o más heteroátomos, donde cada uno de los mencionados pueden ser sustituidos con uno o más grupos, por ejemplo, halógeno, carbonilo, amino, metoxi, etoxi y/o alcoxi. Preferiblemente, R_1 y R_2 pueden individualmente ser seleccionados del grupo que consiste en cualquiera de los compuestos mencionados en las tablas 1, 2, 3, 7, 8 y 9, más preferiblemente R_1 es una amina y R_2 es una cetona, incluso más preferiblemente R_1 es seleccionado del grupo que consiste en los compuestos numerados 3, 4, 7, 8, 10, 15, 60, 61 y 62 en dichas tablas y R_2 es seleccionado del grupo que consiste en los compuestos numerados 56, 57, 58 y 59 en dichas tablas. Aún más preferiblemente los ligandos según la fórmula I son seleccionados del grupo que consiste en los ligandos identificados mencionados en la Tabla 10 más abajo, incluso más preferiblemente dichos ligandos son seleccionados del grupo que consiste en los compuestos AJ10; AJ18, AJ 19 y AJ15, perfilados en la Tabla 10.

55 Por lo tanto, el ligando puede ser AJ10, el ligando puede ser AJ18, el ligando puede ser AJ19, o el ligando puede ser AJ15.

60 Los pares de unión de proteína-ligando aislados que comprenden un ligando de fórmula I pueden también ser identificados mediante la presente invención. Preferiblemente dicho par de unión de proteína-ligando es seleccionado del grupo que consiste en los ligandos identificados y las proteínas correspondientes identificadas como se perfila en la Tabla 10 más abajo.

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando AJ10 de la tabla 10; y
 - enzima convertidora de la angiotensina (P22967) o factor auxiliar de la ribonucleoproteína nuclear U2 (gi 2842676).
- 65

ES 2 318 266 T3

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando AJ18 de la tabla 10; y
- canal de potasio rectificador 13 interno (Q9QZ65, IRKD_CAVPO); receptor de sulfonilurea 2 (Q63563); o canal de potasio de conductancia pequeña (P58391).

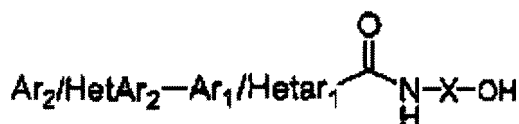
El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando AJ19 de la tabla 10; y
- proteína 12A de 70kDa proteína de choque térmico (Q8KOU4); proteína serina/treonina quinasa (088866) o proteína 2 activadora de Ras GTPasa (GAPIm) (P58069).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando AJ15 de la tabla 10; y
- factor beta de glucógeno-sintasa quinasa-3 (AQ9WV60).

Además, ligando de fórmula II:



puede ser identificado mediante la presente invención.

Tales ligandos son generalmente aludidos como “MWn”, donde n es un número entero. Cada número entero n, identifica grupos específicos X, Ar₁/Hetar, y Ar₂/Hetar₂, véase por ejemplo tabla 11 y 12. X es una cadena lateral de un aminoácido natural o innatural, preferiblemente cualquiera de los aminoácidos indicados en las tablas 1,2,3 3 y 7. Más preferiblemente, X es seleccionado del grupo que consiste en cadenas laterales del compuesto 3 a 47, 64 a 75 y 106 como se indica en las tablas 1,2,3 3 y 7 aquí abajo. Ar₁/Hetar₁ es un grupo arilo o heteroarilo de un haloácido. Preferiblemente Ar₁/Hetar₁ es seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 76 a 81 como se indica en la tabla 7 aquí abajo. Ar₂/Hetar₂ es un grupo arilo o heteroarilo de un éster borónico. Preferiblemente Ar₂/Hetar₂ “está seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 82 a 101 como se indica en la tabla 8 más abajo. Más preferiblemente, el ligando de fórmula II es seleccionado del grupo de ligandos identificado en las tablas 11 y 12 aquí abajo, incluso más preferiblemente el ligando de fórmula II es MW1 o MW2 o MW14 o MW15 o MW16 o MW20 o MW21 o MW22 o MW23 o MW37 según se identifica en las tablas 11 y 12 aquí abajo.

Pares de unión de proteína-ligando aislados que comprenden un ligando de fórmula II pueden también ser identificados mediante la presente invención. Preferiblemente dicho par de unión de proteína-ligando es seleccionado del grupo que consiste en los ligandos identificados y las proteínas correspondientes identificadas como se perfila en las tablas 11 y 12 aquí abajo.

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW1 de tabla 11; y
- antígeno APK1 (2134769) o Hialuronano sintasa 2 (gi 12049586).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW2 de la tabla 11; y
- antígeno APK1 (2134769) o Hialuronano sintasa 2 (gi 12049586).

ES 2 318 266 T3

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW14 de la tabla 11; y
- producto de proteína sin nombre (26336134); serina/treonina quinasa 9 dependiente de serina/treonina 9/cilina (23371297/4507281); Caveolina 1 (gi 4972627/AAD347221) o (V) glicoproteína de revestimiento (gi 3832399).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW15 de la tabla 11; y
- producto de proteína sin nombre (26336134); serina/treonina quinasa 9 dependiente de serina/treonina quinasa 9/cilina (23271297/4507281); Caveolina 1 (gi 4972627/AAD347221) o (V) glicoproteína de revestimiento (gi 3832399).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW16 de la tabla 11; y
- receptor con 7 hélices transmembrana (gi 21928697); polipéptido de la caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) (gi 19527256); precursor mito de la proteína ribosómica L12 60s (gi 1710600); (V) proteína de unión a HLA (gi 1279435) o subunidad grande de ribonucleótido reductasa (gi 30984467).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW20 de la tabla 12; y
- citocromo P450 2C23 (epoxigenasa de ácido araquidónico) (CYPIIC23, P24470); Calcitonina de isoforma de empalme, variante desplazada de precursor de la Calcitonina P41547 (CALO_CANFA, P22892) o subunidad gamma-1 del complejo AP-1 de proteínas adaptadoras con subunidad gamma-1 de adaptador de Golgi HA1/AP1 adaptina) (P41547-00-00-00).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW21 de la tabla 12; y
- citocromo P450 2C23 (epoxigenasa de ácido araquidónico) (CYPIIC23, P24470); Calcitonina de isoforma de empalme, variante desplazada de precursor de Calcitonina P41547 (CALO_CANFA, P22892) o subunidad gamma-1 de complejo AP-1 de proteínas adaptadoras con subunidad gamma-1 de adaptador de Golgi HA1/AP1 adaptina) (P41547-00-00-00).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando MW22 de la tabla 12; y
- citocromo P450 2C23 (epoxigenasa de ácido araquidónico) (CYPIIC23, P24470); Calcitonina de isoforma de empalme, variante desplazada de precursor de Calcitonina P41547 (CALO_CANFA, P22892) o subunidad gamma-1 de complejo AP-1 de proteínas adaptadoras con subunidad gamma-1 de adaptador de Golgi HA1/AP1 adaptina) (P41547-00-00-00).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

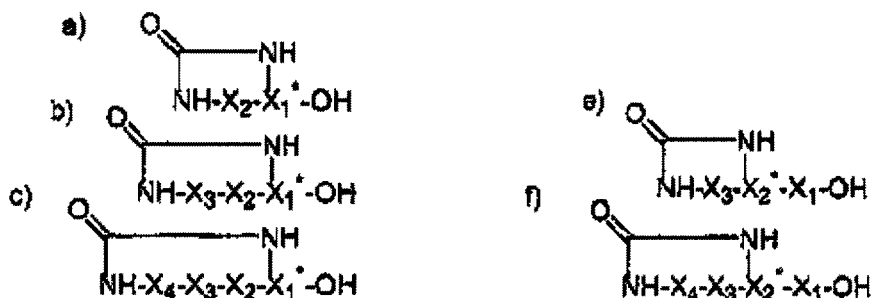
- ligando MW23 de la tabla 12; y
- proteína con dedos de zinc 198 (Fusionada en proteína de trastornos mieloproliferativos) (Q9UbW7) o producto de proteína sin nombre (gi 12844245).

ES 2 318 266 T3

El par de unión de ligando-proteína puede consistir en:

- ligando MW37 de la tabla 12; y
- treonina serina quinasa (gi 474842); precursor de Hemopexina (Beta-1B-glicoproteína) (P02790) o componente de ribonucleoproteína pequeña nuclear U5 de 116 kDa (O08810).

Además, ligandos de fórmulas IIIa), IIIb), IIIc), IIId), IIIe) o IIIf):



pueden también ser identificados mediante la presente invención.

Tales ligandos son generalmente aludidos como “HYn”, donde n es un número entero. Cada número entero n, identifica grupos específicos X*, X₁, X₂, X₃ y X₄, ver por ejemplo la tabla 13. X₁, X₂, X₃ y X₄ son individualmente seleccionados del grupo que consiste en aminoácidos naturales e innaturales. Preferiblemente, X₁, X₂, X₃ y X₄ pueden individualmente ser seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos mencionados en las tablas 1, 2, 3, 7 y 9, más preferiblemente X₁, X₂, X₃ y X₄ pueden individualmente ser seleccionados del grupo que consiste en los compuestos 3, 4, 5, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 19 a 22, 24, 28, 45, 47, 73, 106 y 127 como se perfila en las tablas 1, 2, 3, 7 y 9 aquí abajo. X* es un aminoácido natural o innatural, preferiblemente cualquiera de los aminoácidos mencionados en las tablas 1, 2, 3, 7 y 9 aquí abajo, incluso más preferiblemente X* es seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 8, 39, 40, 41 y 43 como se perfila en tablas 1 y 3 aquí abajo. Ligandos preferidos de fórmulas IIIa) IIIb), IIIc), IIId), IIIe) o IIIf) son HY1 o HY2 que se indican en la tabla 13 aquí abajo.

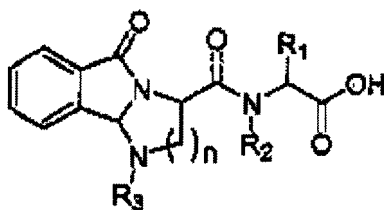
Pares de unión de proteína-ligando aislados que comprenden un ligando de cualquiera de las fórmulas IIIa) IIIb), IIIc), IIId), IIIe) o IIIf) pueden también ser identificados mediante la presente invención. El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando HY1 de la tabla 13; y
- proteína de unión 1 de la proteína quinasa C también contiene un dominio con dedos de zinc con la proteína 8) (Q9U1U4) o proteína G(S) de unión de nucleótidos de guanina, subunidad alfa (proteína alfa G estimulante de Adenilato ciclasa) (PO48949).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando HY2 de la tabla 13; y
- proteína quinasa byr2 (proteína quinasa ste8) (quinasa MAP) (P28829); similar a la proteína quinasa 2 (testicular) (Q885R6) o tiamina-trifosfatasa (Q8CgV7).

Además, ligandos según la fórmula IV:



pueden también ser identificados mediante la presente invención.

ES 2 318 266 T3

Tales ligandos generalmente son aludidos como “HYn”, donde n es un número entero. Cada número entero n, identifica grupos específicos R₁, R₂ y R₃, véase por ejemplo la tabla 14. R₁ es una cadena lateral de un aminoácido natural o innatural, preferiblemente la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos mencionados en las tablas 1, 2, 3, 7 y 9, más preferiblemente R₁ es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en el compuesto 3, 4, 12, 13, 15, 20 a 24, 28, 29, 31, 47, 64, 66, 67, 71, 73, 74, 103 a 106 y 128 como se perfila en las tablas 1, 2, 3, 7 y 9 más abajo o R₁ es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en el compuesto 3 a 47 como se perfila en las tablas 1, 2, y 3 más abajo. R₂ es un grupo acilo o un grupo hidrógeno. En particular, si el grupo carbonilo opcional está presente se prefiere que R₂ sea hidrógeno. Si dicho grupo carbonilo opcional no está presente, R₂ es preferiblemente un grupo acilo, más preferiblemente R₂ es seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 117 a 126 como se perfila en la tabla 9 más abajo. R₃ es un arilo o alquilo, que puede opcionalmente ser sustituido, preferiblemente R₃ es seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 103 a 116 y 128 como se perfila en la tabla 9 más abajo. Ligandos preferidos de la fórmula IV son cualquiera de los ligandos identificados mencionados en la tabla 14, ligandos más preferidos son HY6 o HY7 o HY8 o HY9 como se indica en la tabla 14 más abajo.

Pares de unión de proteína-ligando aislados que comprenden un ligando de la fórmula IV. Véase P.39 para definición. Preferiblemente dicho par de unión de proteína-ligando es seleccionado del grupo que consiste en los ligandos identificados y las proteínas correspondientes identificadas como se perfila en la tabla 14 más abajo. El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando HY6 de tabla 14; y
- cadena Miosina (Q63358) o factor de represión NF-kappa B (factor de transcripción proteína ITBA4) (015226). El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando HY7 de la tabla 14; y
- proteína con dedos de zinc 339 (Q9BRPO) u homólogo RAD52 a la proteína de reparación del ADN (P43351).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando HY8 de la tabla 14; y
- proteína con dedos de zinc 339 (Q9BRPO) u homólogo RAD52 de proteína de reparación del ADN (P43351).

El par de unión de proteína-ligando puede consistir en:

- ligando HY9 de la tabla 14; y
- proteína con dedos de zinc 339 (Q9BRPO) u homólogo RAD52 de proteína de reparación del ADN (P43351).

Además, ligandos preferidos son ligandos capaces de asociarse, preferiblemente asociarse específicamente con una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660), variante del regulador de señalización de la proteína G (RGS14) (gi 2708808), componente de ATP-sintasa (subunidad e) (gi 258788), citocromo P450 (gi 544086), proteínas ribosómicas (60s) (gi 21426891), SPTR (gi 20837095), troponina T (gi 547047), proteína quinasa dependiente de cGMP (gi 284660), NADH-deshidrogenasa, componente de unión de ATP (gi 18598538), polipéptido pesado 9 de Miosina (gi 13543854), proteínas asociadas a histona (gi 20893760), proteínas hipotéticas (gi 20474763), proteínas ricas en cisteína y tirosina de función desconocida (gi 17064178), ATP sintasa mitocondrial (gi 13386040), SPTR (gi 12842570), (canal de sodio (gi 18591322), canal de cloruro (gi 6978663/4502867), troponina I (gi 1351298); proteína con dedos de zinc (gi 18591322), portador de soluto dependiente de Ca peroxisomal SPTR (putativo) (gi 12853685), receptor Beta-2 adrenérgico (gi 12699028), proteínas hipotéticas, fosfolipasa C, fosfatidicolina acil esterol transferasa (400167; LCAT-PIG 9), proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055), anhidrasa carbónica VII (gi 10304383), complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi 2392395); proteína Hipotética XP_154035, N4-(α -glucosaminil-L-asparaginasa; (gi7435941), elemento II de la subfamilia A de 4 dominios de expansión de membrana (gi7435941), proteína hipotética XP_043250 (gi 14773490), proteína asociada con dedos de zinc (gi 20304091), proteínas ribosómicas 40S de serie L (gi 206736/133023), glucosa-6-fosfatasa (gi 6679893/15488608), succinato deshidrogenasa, proteína de interacción con ARL (gi 4927202), SPTR (gi 12834839), proteína de unión a ácidos nucleicos, proteína ribosómica (60s + 40s) (gi 20875941/6677773 y gi 20846353), receptor de lipoproteína de baja densidad (gi 20846353), fosfo-

ES 2 318 266 T3

fructoquinasa (gi 7331123), proteína de unión de selenio (gi 8848341/6677907); proteína quinasa rica en arginina y serina, guanilato quinasa (gi 20986250), proteína de interacción de actina, SPTR (gi 20869775), canal de calcio (gi 3202010), isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046), canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP 034740), regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049), (catepsina E (gi 4503145), proteínas ribosómicas (60s Serie L) (gi 20826861), NAS putativa sin clasificar (gi 12861084), proteína con dedos de zinc 64 putativa (gi 12849329), glicoproteína de superficie celular (gi 23603627), proteína hipotética (XP-179829; gi 14720727), receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582), fosfato acetil transferasa (gi 1799680), proteína de choque ácido (gi 1742632), proteína C de biosíntesis de molibdopterina (gi 15800534), chaperona DnaK (dnak_ *E. coli*), hidrolasa putativa (yhaG_ *E. coli*), transposasa (gi 158316821), peroxidasa de citocromo C (yhjA_ *E. coli*), histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (pyrI_ *E. coli*), proteína de transporte de permeasa putativa (b0831_ *E. coli*), proteína hipotética Orf (yids_ *E. coli*), regulador transcripcional de transposasa (gi 18265863), GroEL (GroEL_ *E. coli*), proteína implicada en el sistema de transporte de taurina (tauC_ *E. coli*), lipoproteína de unión a hemo (gi 4062402/40624079), regulador para D-glucarato, D-glicerato y D-galactarato (gi 158294209), glutamina ARNt sintetasa (gi 146168), biotina sintetasa (gi 145425), UDP-glucosa deshidrogenasa (ugd_ *E. coli*), tirosina proteína quinasa (gi 20140365), proteínas de complejo de oxidasa de ácido graso (gi 145900), 7-alfa-hidroxiesteriode deshidrogenasa dependiente de NAD (gi 15802033), homocisteína transferasa, nitrato reductasa, lactato deshidrogenasa (dld_ *E. coli*), citrato sintetasa (CISY_ *E. coli*), Manosa-1-fosfato guanil transferasa (gi 3243143/ 324314), isopropil malato deshidrogenasa (guaB_ *E. coli*), aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), Colicina E2 (gi809671/809683), histidina quinasa (parte pertenece a narQ_ *E. coli*), proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (gi 16131496), fosfomanosa isomerasa (gi 147164), proteína de tipo citocromo C (gi 15802755), proteína TrwC (TrwC_ *E. coli*). Subunidad b de sector Fo de ATP sintetasa unida a la membrana (atpF_ *E. coli*), ATP hidrolasa (gi 1407605), Hemolisina C (gi7416115; gi 7438629), sistema de transporte de potasio de alta afinidad (kdpC_ *E. coli*), quinona oxidorreductasa (qor_ *E. coli*), NA(D)PH oxidorreductasa dependiente de ferredoxina (fpr_ *E. coli*), transposasa (gi 161295379), proteína de membrana interna para fijación en el fago (pspA_ *E. coli*), helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141), Mob C (gi 78702), proteína hipotética Oil (yciL_ *E. coli*), proteína Tral (Tri6_ *E. coli*), transposasa putativa (gi 16930740), subunidad fimbrial (gi 2125931), piruvato quinasa de la membrana externa (gi 16129507/15531815), precursor de la proteína fimbrial (gi 120422), fosfatasa alcalina (gi 581186), componente de ATP sensible a citocromo-zinc (cydD_ *E. coli*), aldolasa putativa, corismato mutasa (gi 1800006), xantina deshidrogenasa (gi 157999), carbamoil fosfato sintetasa (carB_ *E. coli*), glutamato sintasa (NaDPH) (gi 2121143), NADH-deshidrogenasa (gi 1799644), proteína implicada en la biosíntesis flagelar y componente de conmutación motriz (gi 1580237). Proteína de unión de lisina-arginina-ornitina (ArgT_ *E. coli*), componente de unión a ATP de proteína de transporte de glicina-betaína-prolina (gi 16130591), Colicina (gi 809683), proteína de membrana hipotética (yhiU_ *E. coli*), lipoproteína de membrana externa (blc_ *E. coli*), Acetli CoA carboxilasa: subunidad beta (gi 146364), citocromo b (cybC_ *E. coli*), fosfato acetil transferasa (gi 1073573), ureasa: subunidad beta (gi 418161), proteína de transporte de molibdeno (gi 1709069), subunidad C de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (gi 146179), proteína de división celular (ftsN_ *E. coli*), transposasa (gi 10955467), serina ARNt sintetasa (gi 15830232), Metilasa (gi 1709155), coenzima A transferasa (gi 1613082), proteína de membrana TraD (TraD_ *E. coli*), helicasa dependiente de ATP: homólogo de HrpA (NCBIBAA15034), precursor ydcP de proteasa putativa (NCBI P76104), uroporfirinógeno-descarboxilasa (hemE_ *E. coli*), proteína J de exportación putativa para la ruta secretora general (yheJ_ *E. coli*), lectina Concanavalina A de *C. ensiformis* (gi:1705573), lectina de *P. sativum* (gi:490035), lectina de *L. culinaris* (gi:126145).

Los números indicados entre paréntesis después del nombre de una proteína, (es decir. gi:xxxxxx) se refieren al número de acceso de dicha proteína en la base de datos de proteínas NCBI.

Los pares de unión de proteína-ligando aislados pueden ser identificados por los métodos descritos aquí. Preferiblemente, dichos pares de unión de proteína-ligando aislados comprenden al menos uno de los ligandos mencionados anteriormente y/o al menos una de las proteínas mencionadas anteriormente. Los pares de unión de proteína-ligando preferidos son cualquiera de los pares de unión de proteína-ligando descritos en los ejemplos más abajo.

50 *Dianas de fármacos*

Es también un objetivo de la presente invención proporcionar proteínas que sean adecuadas como dianas de fármacos, por lo tanto una proteína identificada por los métodos según la invención puede ser usada como una diana de fármaco en un método para identificar uno o más fármacos para el tratamiento de una condición clínica.

Una diana de fármaco, como se utiliza en este caso, es una proteína que está implicada en la causa de un estado de enfermedad. Esto significa que si esta proteína particular es evitada de ser expresada o evitada de ejercer su función en un sistema modelo, la enfermedad no ocurre del todo o los síntomas son menores y/o menos significantes. Una proteína es también considerada una diana de fármaco cuando su interacción con un compuesto (fármaco potencial) resulta en modulación de la enfermedad *in vitro* y en modelos *in vivo*.

El tratamiento puede ser profiláctico, curativo y/o de mejoramiento. La condición clínica puede ser cualquier condición adecuada clínica, por ejemplo cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarias, infecciones, enfermedades inflamatorias, trastornos del CNS, enfermedades metabólicas, enfermedades endocrinas.

Enfermedades cardiovasculares por ejemplo incluyen hipertrofia cardíaca, cardiopatía coronaria, arritmias cardíacas, cardiopatía reumática, endocardiosis y miocardiopatía hipertrófica.

ES 2 318 266 T3

En particular, las “proteínas susceptibles de convertirse en fármacos” pueden ser usadas como dianas de fármacos. El término “proteínas susceptibles de convertirse en fármacos” se entiende que incluye las proteínas, a las que se unen uno o más ligandos específicamente. Por lo tanto, las proteínas identificadas por el presente método son en general “susceptibles de convertirse en fármacos”.

5

Se prefiere que las proteínas para el uso como diana de fármaco sean seleccionadas del grupo que consiste en quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660), regulador de la variante de señalización de la proteína G (RGS 14) (gi 2708808), componente de ATP-sintasa (subunidad e) (gi 258788), citocromo P450 (gi 544086), proteínas ribosómicas (60s) (gi 21426891), SPTR (gi 20837095), troponina T (gi 547047), proteína quinasa dependiente de cGMP (gi 284660), NADH-deshidrogenasa, componente de unión de ATP (gi 18598538), polipéptido pesado 9 de miosina (gi 13543854), proteínas asociadas a histona (gi 20893760), proteínas hipotéticas (gi 20474763), proteínas ricas en cisteína y tirosina de función desconocida (gi 17064178), ATP sintasa mitocondrial (gi 13386040), SPTR (gi 12842570), (canal de sodio (gi 18591322), canal de cloruro (gi 6978663/4502867), troponina I (gi 1351298); proteína con dedos de zinc (gi 18591322), portador de soluto dependiente de Ca peroxisomal SPTR (putativo) (gi 12853685), receptor adrenérgico beta-2 (gi 12699028), proteínas hipotéticas, fosfolipasa C, transferasa de acil esterol fosfatidicolina (400167;LCAT-PIG 9), proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055), anhidrasa carbónica VII (gi 10304383), complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi 2392395); proteína hipotética XP_154035, N4-(α -glucosaminil-L-asparaginasa; (gi7435941), elemento II de subfamilia A de 4 dominios de expansión de membrana (gi7435941), proteína hipotética XP 043250 (gi 14773490), proteína asociada con dedos de zinc (gi 20304091), proteínas ribosómicas 40S Serie L (gi 206736/133023), glucosa-6-fosfatasa (gi 6679893/15488608), succinato deshidrogenasa, proteína de interacción con ARL (gi 4927202), SPTR (gi 12834839), proteína de unión a ácidos nucleicos, proteína ribosómica (60s + 40s) (gi 20875941/6677773 y gi 20846353), receptor de lipoproteína de baja densidad (gi 20846353), fosfofructoquinasa (gi 7331123), proteína de unión con selenio (gi 8848341/6677907); (proteína quinasa rica en arginina y serina, guanilato quinasa (gi 20986250), proteína de interacción de actina, SPTR (gi 20869775), canal de calcio (gi 3202010), isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046), canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP 034740), regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049), catepsina e (gi 4503145), proteínas ribosómicas (60s Serie L) (gi 20826861), NAS putativas sin clasificar (gi 12861084), proteína con dedos de zinc 64 putativa (gi 12849329), glicoproteína de superficie celular (gi 23603627), proteína hipotética (XP-179829; gi 14720727), receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582), acetil fosfato transferasa (gi 1799680), proteína de choque ácido (gi 1742632), proteína C de biosíntesis molibdopterina (gi 15800534), chaperona DnaK (dnak *E. coli*), hidrolasa putativa (yhaG *E. coli*) transposasa (gi 158316821), citocromo C peroxidasa (ihjA *E. coli*), histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (pyr1 *E. coli*), proteína de transporte de permeasa putativa (b0831 *E. coli*), proteína hipotética Orf (yids *E. coli*). Transposasa, regulador transcripcional (gi 18265863), GroEL (GroEL *E. coli*), proteína implicada en el sistema de transporte de taurina (tauC *E. coli*), lipoproteína de unión a hemo (gi 4062402/40624079), regulador para D-glucarato, D-glicerato y D-galactarato (gi 158294209), glutamina ARNt sintetasa (gi 146168), sintetasa de biotina (gi 145425), UDP-glucosa deshidrogenasa (ugd *E. coli*), proteína tirosina quinasa (gi 20140365), proteínas de complejo de oxidasa de ácido graso (gi 145900), 7-alfa-hidroxiesteriode deshidrogenasa dependiente de NAD (gi 15802033), transferasa de homocisteína, nitrato-reductasa, lactato deshidrogenasa (dld *E. coli*), citrato sintetasa (CISY *E. coli*), Manosa-1-fosfato guanil transferasa (gi 3243143/324314), isopropil malato deshidrogenasa (guaB *E. coli*), aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), Colicina E2 (gi809671/809683), histidina quinasa (parte pertenece a narQ *E. coli*), proteína implicada en la biosíntesis del lipopolisacárido (gi 16131496), fosfomanosa isomerasa (gi 147164), proteína de tipo citocromo C (gi 15802755), proteína TrwC (TrwC *E. coli*). Subunidad b del sector Fo de ATP sintetasa unida a la membrana (atpF *E. coli*), ATP hidrolasa (gi 1407605), Hemolisina C (gi7416115; gi 7438629), sistema de transporte de potasio de alta afinidad (kdpC *E. coli*), quinona oxidorreductasa (qor *E. coli*), NA(D)PH oxidorreductasa dependiente de ferredoxina (fpr *E. coli*), transposasa (gi 161295379), proteína de membrana interna para fijación en el fago (pspA *E. coli*), helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141), Mob C (gi 78702), proteína hipotética Orf (yciL *E. coli*) proteína Tral (Trió *E. coli*), transposasa putativa (gi 16930740), subunidad Fimbrial (gi 2125931), piruvato quinasa de membrana externa (gi 16129807/15831818), precursor de proteína fimbrial (gi 120422), fosfatasa alcalina (gi 581186), componente de ATP sensible al citocromo-zinc (cydD *E. coli*), aldolasa putativa, Corismato mutasa (gi 1800006), xantina deshidrogenasa (gi 157999), carbamoil fosfato sintetasa (carB *E. coli*), glutamato sintasa (gi 2121143), NADH-deshidrogenasa (gi 1799644), proteína implicada en la biosíntesis flagelar y componente de conmutación motriz (gi 1580237). Proteína de unión de lisina-arginina-ornitina (ArgT *E. coli*), componente de unión de ATP de proteína de transporte de glicina-betaína-prolina (gi 16130591), Colicina (gi 809683), proteína de membrana hipotética (yhiU *E. coli*), lipoproteína de membrana externa (blc *E. coli*), Acetil CoA carboxilasa: subunidad beta (gi 146364), citocromo b (cybC *E. coli*), fosfato acetil transferasa (gi 1073573), ureasa: subunidad beta (gi 418161), proteína de transporte de molibdeno (gi 1709069), subunidad C de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (gi 146179), proteína de división celular (ftsN *E. coli*), transposasa (gi 10955467), serina ARNt sintetasa (gi 15830232), Metilasa (gi 1709155), CoA transferasa (gi 1613082), proteína TraD de membrana (TraD *E. coli*), helicasa dependiente de ATP: homóloga de hrpA (NCBIBAA15034), precursor ydcP de proteasa putativa (NCBI P76104), uroporfirinógeno descarboxilasa (hemE *E. coli*), proteína J de exportación putativa para ruta secretora general (yheJ *E. coli*), Concanavalina A lectina de *C. ensiformis* (gi:1705573), lectina de *P. sativum* (gi:490035), lectina de *L. culinaris* (gi:126145).

Preferiblemente una proteína seleccionada del grupo que consiste en troponina T (gi 547047); receptor de la hormona del crecimiento; complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi2392395); proteína Hipotética XP_154035; canal de sodio (gi 18591322) (M); canal de cloruro (gi 6978663/4502867) (M) troponina I (gi 1351298); proteína con dedos de zinc (gi 18591322) (MA); SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisomal (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico Beta-2 (gi 12699028), proteína asociada con dedos de zinc (gi 20304091); Glucosa-6-fosfatasa

ES 2 318 266 T3

(gi 6679893/15488608), succinato deshidrogenasa, proteína interactuante con ARL (gi 4927202); Proteína de unión a ácidos nucleicos; fosfofructoquinasa (gi 7331123), proteína de unión de selenio (gi 8848341/6677907), proteína quinasa rica en arginina y serina; guanilato quinasa (gi 20986250), fosfatasa alcalina; Simporter; proteína WAP; GTP hidrolasa; filamento de actina; SPTR (gi 20869775) (M); proteínas ribosómicas (60s) (gi 20875941/6677773); (canal de calcio (gi 3202010) (M); isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046) (M); canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP_034740) (M); regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049); catepsina E (gi 4503145), proteínas ribosómicas (60s serie L)(gi20826861), proteína de unión de actina; aminoácido transferasa; NAS putativa sin clasificar (gi 12861084); proteína con dedos de zinc 64 putativa (gi 12849329); histidina sintetasa (gi 15803037); aspartato carbamoil transferasa (pyrI_ *E. coli*); proteína ribosómica 50 S; lipoproteína de unión a hemo (gi 4062402/40624079), regulador para D-glucurato, D-glicerato y D-galactarato (gi 158294209); glutamina ARNt sintetasa (gi 146168); aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3312459), colicina E2 (gi 809671/809683); histidina quinasa (parte pertenece a narQ *E. coli*); fosfomanosa isomerasa (gi 147164); helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141); Mob C (gi 78702); Corismato mutasa (gi 1800006), xantina deshidrogenasa (gi 157999); carbamoil fosfato sintetasa (carB *E. coli*); helicasa dependiente de ATP: Homólogo de hrpA (NCBIBAA15034); precursor ydcP de proteasa putativa (NCBI P76104); Concanavalina A, lectina de *P. sativum* (gi:490035) y lectina de *L. culinaris* (gi:126145) puede ser usada como una diana de fármaco en un método para identificar uno o más fármacos para el tratamiento de una condición clínica.

Más preferiblemente la proteína para ser usada como diana de fármaco es seleccionada del grupo que consiste en canal de sodio (gi 18591322) canal de cloruro (gi 6978663/4502867); proteína con dedos de zinc (gi 18591322) SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisomal (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico Beta-2(gi 12699028), proteína asociada a dedos de zinc (gi 20304091); Glucosa-6-fosfatasa (gi 6679893/15488608), succinato deshidrogenasa, proteína interactuante con ARL (gi 4927202); Proteína de unión a ácidos nucleicos; fosfofructoquinasa (gi 7331123), proteína de unión de selenio (gi 8848341/6677907), proteína quinasa rica en arginina y serina; guanilato quinasa (gi 20986250), canal de calcio (gi 3202010 isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046) canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP 034740) regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049); regulador de señalización 14 de proteína G, catepsina E (gi 4503145), proteína dedos de zinc 64 putativa (gi 12849329); histidina sintetasa (gi 15803037); aspartato carbamoil transferasa (pyrI_ *E. coli*); proteína ribosómica 50 S; lipoproteína de unión a hemo (gi 4062402/40624079, glutamina ARNt sintetasa (gi 146168); aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), histidina quinasa (parte pertenece a narQ_ *E. coli*); fosfomanosa isomerasa (gi 147164); helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141); mob C (gi 78702); Corismato mutasa (gi 1800006), carbamoil fosfato sintetasa (carB_ *E. coli*); helicasa dependiente de ATP: Homólogo de hrpA (NCBIBAA15034); canal de potasio 13 rectificador interno (Q9QZ65, IRKD CAVPO); receptor de sulfonilurea 2 (Q63563); canal de potasio de conductancia pequeña (P58391), proteína serina/treonina quinasa (088866); proteína activadora 2 de Ras GTPasa (GAP1m) (P58069), factor beta de glucógeno-sintasa quinasa 3 (AQ9WV60), serina/treonina quinasa 9 dependiente de serina/treonina quinasa 9/cilina (23271297/4507281); factor de represión B NF-Kappa (proteína ITBA4 de factor de transcripción) (015226), proteína de unión a HLA (gi 1279435) y subunidad grande de ribonucleótido reductasa (gi 30984467).

Proteínas preferidas para el uso como diana de fármaco pueden ser seleccionadas del grupo que consiste en chaperona DnaK (dnak *E. coli*), hidrolasa putativa (yhaG_ *E. coli*), transposasa (gi 158316821), histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (pyrI_ *E. coli*), regulador transcripcional (gi 18265863 de glutamina ARNt sintetasa (gi 146168). Proteína tirosina quinasa (gi 20140365), citrato sintetasa (CISY_ *E. coli*), aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), colicina E2. (gi809671/809683), histidina quinasa (parte pertenece a narQ *E. coli*), proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (gi 16131496), fosfomanosa isomerasa (gi 147164), sistema de transporte de potasio de alta afinidad (kdpC_ *E. coli*), helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141), mob C (gi 78702); proteína hipotética Oil (yqiL_ *E. coli*) piruvato quinasa de membrana externa (gil 6129807/15831818), precursor de proteína fimbrial (gi 120422), fosfatasa alcalina, aldolasa putativa, corismato mutasa (gi 1800006), carbamoil fosfato sintetasa (carB_ *E. coli*); glutamato sintasa (NADPH) (gi 2121143), proteína implicada en la biosíntesis flagelar y componente de conmutación motriz, proteína de unión de lisina-arginina-ornitina (argT *E. coli*), componente de unión de ATP de proteína de transporte de glicina-betaína-prolina (gi 16130591), proteína de membrana hipotética (yhiU_ *E. coli*), lipoproteína de membrana externa (blc_ *E. coli*), proteína de transporte de molibdeno (gi 1709069), serina ARNt sintetasa (gi 15830232), helicasa dependiente de ATP: Homólogo de hrpA (NCBIBAA15034), proteína J de exportación putativa para la ruta secretora general (yheJ_ *E. coli*), proteína C de biosíntesis de molibdopterina (gi 15800534). Proteína implicada en el sistema de transporte de taurina (tauC_ *E. coli*). Dichas proteínas son útiles en particular como dianas de fármacos para identificar fármacos para el tratamiento de infecciones.

Preferiblemente, la proteína para ser usada como diana de fármaco es seleccionada del grupo que consiste en chaperona DnaK (dnak_ *E. coli*), histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (pyrI_ *E. coli*), glutamina ARNt sintetasa (gi 146168). Proteína tirosina quinasa (gi 20140365), citrato sintetasa (CISi *E. coli*), aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), colicina E2. (gi809671/809683), histidina quinasa (parte pertenece a narT_ *E. coli*), proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (gi 16131496), fosfomanosa isomerasa (gi 147164), sistema de transporte de potasio de alta afinidad (kdpC_ *E. coli*), helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141), mob C (gi 78702); proteína hipotética Oil (yqiL_ *E. coli*), piruvato quinasa de membrana externa (gi 16129807/15831818), fosfatasa alcalina, corismato mutasa (gi 1800006), carbamoil fosfato sintetasa (carB_ *E. coli*); glutamato sintasa (NaDPH) (gi 2121143), proteína implicada en la biosíntesis flagelar y componente de conmutación motriz, serina ARNt sintetasa (gi 15830232) y helicasa dependiente de ATP: Homólogo de hrpA (NCBIBAA15034).

ES 2 318 266 T3

Proteínas incluso más preferidas para el uso como dianas de fármacos pueden ser seleccionadas del grupo que consiste en chaperona DnaK (*dnak_E. coli*), hidrolasa putativa (*yhaG_E. coli*), transposasa (gi 158316821), histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (*pyrI_E. coli*), regulador transcripcional (gi 18265863 de glutamina ARNt sintetasa (gi 146168). Proteína tirosina quinasa (gi 20140365), citrato sintetasa (*CISY_E. coli*),
5 aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), histidina quinasa (parte pertenece a *narT_E. coli*), proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (gi 16131496), fosfomanosa isomerasa (gi 147164), helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141), proteína hipotética Orf (*yciL_E. coli*), piruvato quinasa de membrana externa (gi 16129807/15831818), corismato mutasa (gi 1800006), carbamoil fosfato sintetasa (*carB_E. coli*); glutamato sintasa (*NaDPH*) (gi 2121143), proteína de unión de lisina-arginina-ornitina (*argT_E. coli*), proteína de membrana
10 hipotética (*yhiU_E. coli*), lipoproteína de membrana externa (*blc_E. coli*), ARNt sintetasa de serina (gi 15830232), helicasa dependiente de ATP: Homólogo de *hrpA* (NCBIBAA15034), proteína J de exportación putativa para la ruta secretora general (*yheJ_E. coli*).

Aún más preferiblemente, la proteína usada como diana de fármaco es seleccionada del grupo que consiste en
15 transpoasa, proteínas implicadas en chaperona DnaK (*dnak_E. coli*), transposasa (gi 158316821), histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (*pyrI_E. coli*), regulador transcripcional (gi 18265863 de glutamina ARNt sintetasa (gi 146168). Proteína tirosina quinasa (gi 20140365), citrato sintetasa (*CISY_E. coli*), aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), histidina quinasa (parte pertenece a *narQ_E. coli*), proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (gi 16131496), fosfomanosa isomerasa (gi 147164), helicasa dependiente de ATP
20 (gi 2507332/16128141), Corismato mutasa (gi 1800006), carbamoil fosfato sintetasa (*carB_E. coli*); glutamato sintasa (*NaDPH*) (gi 2121143), serina ARNt sintetasa (gi 15830232), helicasa dependiente de ATP: Homólogo de *HrpA* (NCBIBAA15034), proteína de unión a HLA (gi 1279435) y subunidad grande de ribonucleótido reductasa (gi 30984467) dichas proteínas son particularmente útiles como dianas de fármacos para identificar fármacos para el tratamiento de infecciones.

Proteínas preferidas para el uso como dianas de fármacos pueden de forma alternativa ser seleccionadas del grupo que consiste en quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660), regulador de la variante señalización de la proteína G (RGS14) (gi 2708808), SPTR (gi 20837095), proteínas hipotéticas (gi 20474763);
30 proteínas ricas en cisteína y tirosina de función desconocida (gi 17064178) SPTR (gi 12842570), canal de sodio (gi 18591322); canal de cloruro (gi 6978663/4502867); proteína de dedo de Zn (gi 18591322); SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisomal (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico Beta-2 (gi 12699028); proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055); complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi2392395); proteína Hipotética XP_154035; elemento II de subfamilia A de 4 dominios de expansión de membrana (gi7435941); proteína Hipotética XP_043250 (gi 14773490); proteína asociada con dedos de zinc (gi 20304091); proteína quinasa rica en arginina y serina; SPTR (gi 20869775); canal de calcio (gi 3202010); isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046); canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP 034740); regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049); catepsina E (gi 4503145); NAS putativa sin clasificar (gi 12861084); proteína con dedos de Zn 64 putativa (gi 12849329); glicoproteína de superficie celular (gi 23603627); proteína Hipotética (XP-179829; gi 14720727);
35 receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582). Dichas proteínas son en particular útiles como dianas de fármaco para identificar fármacos para tratamiento de la enfermedad cardiovascular, por ejemplo hipertrofia cardíaca, cardiopatía coronaria, arritmias cardíacas, cardiopatía reumática, endocardiosis y miocardiopatía hipertrófica.

Proteínas incluso más preferidas para el uso como dianas de fármacos pueden ser seleccionadas del grupo que consiste en quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660), regulador de la variante de
45 señalización de proteína G (RGS14) (gi 2708808), SPTR (gi 20837095), proteínas hipotéticas (gi 20474763); proteínas ricas en cisteína y tirosina de función desconocida (gi 17064178) SPTR (gi 12842570), proteína con dedos de Zn (gi 18591322); SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisómico (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico beta-2 (gi 12699028); proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055); complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi2392395); proteína Hipotética XP_154035; elemento II de subfamilia A de 4 dominios de expansión de membrana (gi7435941); proteína Hipotética XP_043250 (gi 14773490); proteína asociada con dedos de zinc (gi 20304091); proteína quinasa rica en arginina y serina; SPTR (gi 20869775); regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049); catepsina E (gi 4503145); proteína con dedos de Zn 64 putativa (gi 12849329); proteína hipotética (XP-179829; gi 14720727); receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582). Dichas proteínas son particularmente útiles
50 como dianas de fármaco para identificar fármacos para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, por ejemplo hipertrofia cardíaca, cardiopatía coronaria, arritmias cardíacas, cardiopatía reumática, endocardiosis y miocardiopatía hipertrófica.

La proteína para ser usada como diana de fármaco es de forma alternativa seleccionada del grupo que consiste en quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660), regulador de la variante de
60 señalización de proteína G (RGS14) (gi 2708808), SPTR (gi 20837095), canal de sodio (gi 18591322); canal de cloruro (gi 6978663/4502867); proteína de dedo de Zn (gi 18591322); SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisómico (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico beta-2 (gi 12699028); proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055); complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi2392395); elemento II de subfamilia A de 4 dominios de expansión de membrana gi 7435941); proteína asociada a dedos de zinc (gi 20304091); proteína quinasa rica en arginina y serina; SPTR (gi 20869775); canal de calcio (gi 3202010); isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046); canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436, NP 034740); regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049); catepsina E (gi 4503145); NAS putativa sin clasificar (gi 12861084); proteína con dedos de Zn 64 putativa (gi 12849329); glicoproteína de superficie celular (gi 23603627); proteína Hipotética (XP-179829; gi
65

14720727); receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582, canal de potasio rectificador 13 interno (Q9QZ65, IRKD CAVPO); receptor de sulfonilurea 2 (Q63563); canal de potasio de conductancia pequeña (P58391), proteína serinaltreonina quinasa (088866); proteína activadora 2 de Ras GTPasa (GAP1m) (P58069), factor beta de glucógeno-sintasa quinasa 3 (AQ9VVV60), serina/treonina quinasa 9 dependiente de serina/treonina quinasa 9/cilina (23271297/4507281) y factor de represión B de NF-kappa (proteína ITBA4 de factor de transcripción) (O15226).

Preferiblemente dicha proteína es seleccionada del grupo que consiste en quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660), regulador de la variante de señalización de proteína G (RGS 14) (gi 2708808), SPTR (gi 20837095), proteína con dedos de Zn (gi 18591322); SPTR (portadora de soluto dependiente de Ca peroxisómico (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico beta-2 (gi 12699028); proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055); complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C (gi2392395); proteína asociada a dedos de zinc (gi 20304091); proteína quinasa rica en arginina y serina; SPTR (gi 20869775); regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049); catepsina E (gi 4503145) y proteína con dedos de Zn 64 putativa (gi 12849329) y receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582).

15 *Ventajas de la invención*

El alto rendimiento de la invención del proceso aquí descrita proporciona diferentes ventajas sobre los procesos conocidos para descubrir medicamentos. Entre estas ventajas está la velocidad y exactitud aumentadas en la identificación simultánea de una molécula de ligando y su compañero de unión a la proteína correspondiente.

El proceso de la invención es realizado en perlas de resina, y permite que las fases de síntesis, selección, aislamiento, e identificación del ligando y la proteína sean rápidamente y eficazmente procesadas usando una única perla. El proceso puede ser fácilmente automatizado, por ejemplo, usando sistemas automáticos conocidos para fases de síntesis, incubación, aislamiento, e identificación, tales como sistemas robóticos para seccionamiento de ligandos, manchado en dianas de MS, adición de enzimas para digestión de proteínas, y similares. Mediante la espectrometría de masas, MALDI, y RMN como se describe en los ejemplos, cada ligando y cada proteína puede ser identificado “en perlas”.

La invención del proceso también proporciona una ventaja debido a la gran diversidad de bibliotecas que pueden ser usadas, por ejemplo, más de 10.000 compuestos diferentes. Prácticamente millones de compuestos pueden ser seleccionados rápidamente, por ejemplo, en sistemas de resina utilizando un compuesto por perla, por ejemplo, usando aproximadamente 3 a 5 millones de perlas disponibles en aproximadamente 10 g de resina.

Usando el proceso reivindicado, es posible identificar rápidamente complejos de unión de proteínas y ligandos que son “susceptibles de convertirse en fármacos”, es decir, identificar ligandos útiles que se unen a las proteínas precisas y evitar los ligandos no útiles. El proceso también permite la identificación rápida de familias de proteínas y/o proteínas no relacionadas que se unen con los mismos ligandos o similares. Tal información esboza la selectividad potencial de un candidato de fármaco y proporciona información preliminar toxicológica para ayudar al proceso de selección del fármaco. La invención del proceso además proporciona la identificación de clases de ligandos que se unen a una proteína particular aumentando el número de “hits” que puede ser desarrollado en optimizaciones de compuestos para una diana de proteína particular. La invención del proceso se realiza de una manera diferencial como se describe en la Figura 2, es decir, usando diferencialmente proteínas marcadas, por ejemplo, de un tejido normal y uno enfermo, es decir todas las características anteriores son agregadas a la determinación de pares de ligando/proteína selectivos que pueden ser usados para el diagnóstico y desarrollo de un producto terapéutico.

En resumen, una gran ventaja de la invención reivindicada es la capacidad para tomar un número muy grande de ligandos desconocidos y/o proteínas desconocidas, y en un tiempo muy breve identificar de manera eficaz, pares de unión de ligando/proteína particulares previamente desconocidos que, son identificados, acoplados y caracterizados como se ha descrito anteriormente.

Ejemplos

La invención puede ser mejor entendida con referencia a los ejemplos siguientes. Estos ejemplos ilustran la invención, y no están destinados a limitar su objetivo.

En los ejemplos sucesivos, la síntesis de bibliotecas de ligandos y el uso de estas bibliotecas en la invención del proceso está ejemplificada. Los elementos químicos usados en la síntesis ejemplificada están mostrados en las tablas y esquemas más abajo, con números de identificación entre paréntesis (x).

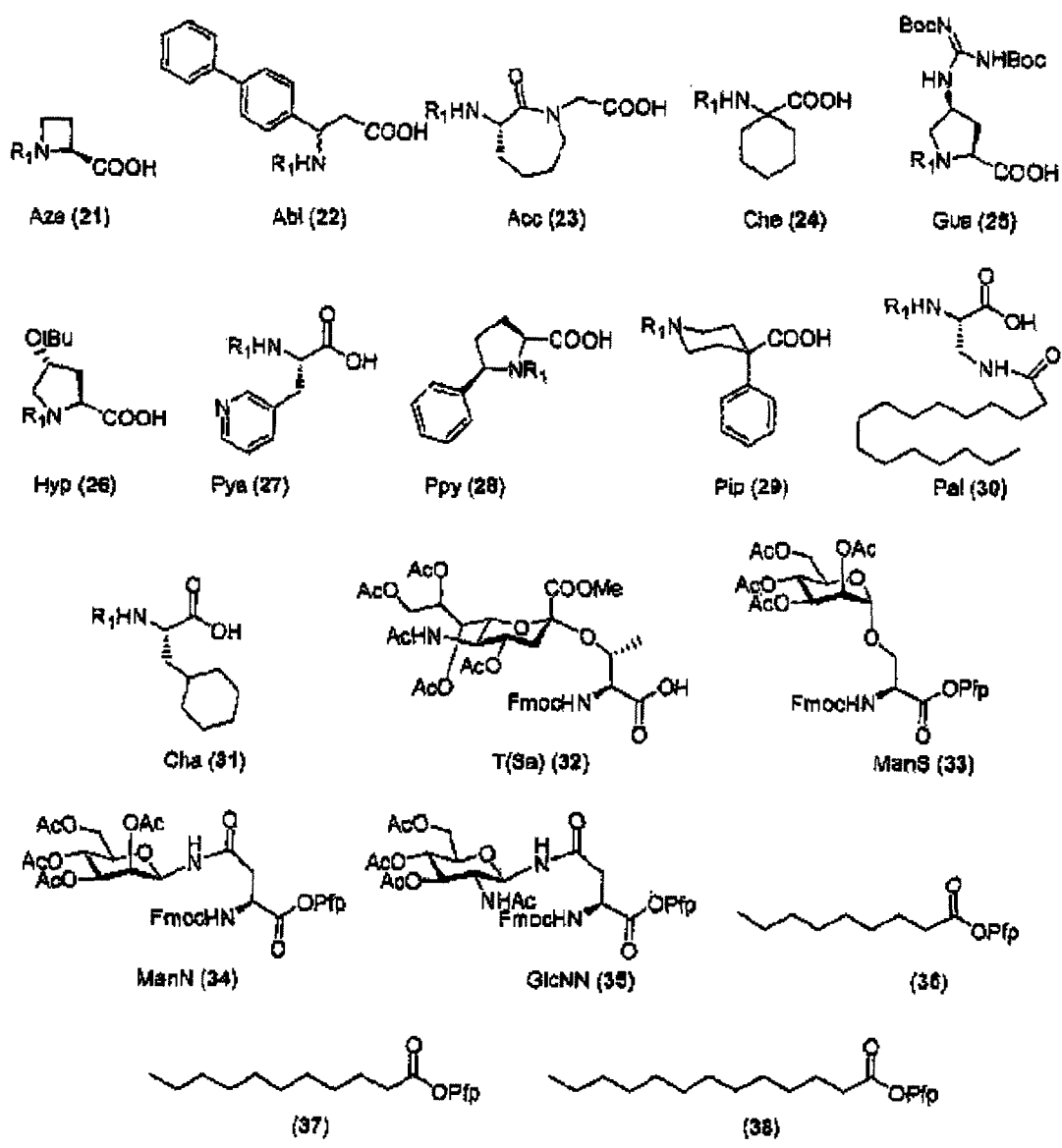
En las tablas y esquemas mostrados más abajo, los números de compuesto (x) son denominados “a” donde R₁ es Fmoc, “b” donde R₁ es Boc y “c” donde R₁ es H.

ES 2 318 266 T3

TABLA 2

Etiquetas de codificación alifáticas y otros bloques de construcción usados en la síntesis de las Bibliotecas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



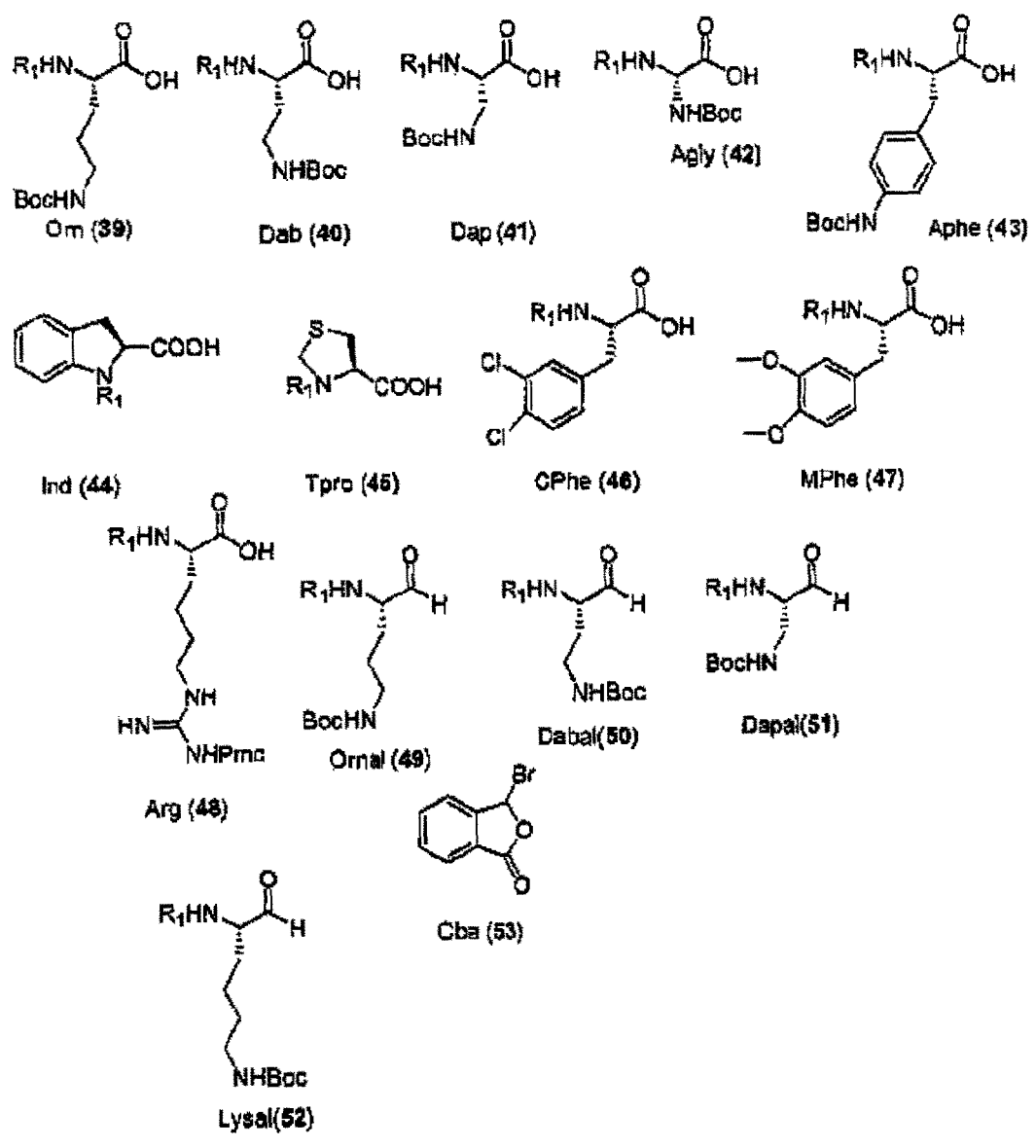
$R_1 =$ Fmoc, Boc
(a) (b)

ES 2 318 266 T3

TABLA 3

Compuestos usados para la síntesis de la Biblioteca 4, 5 y 7

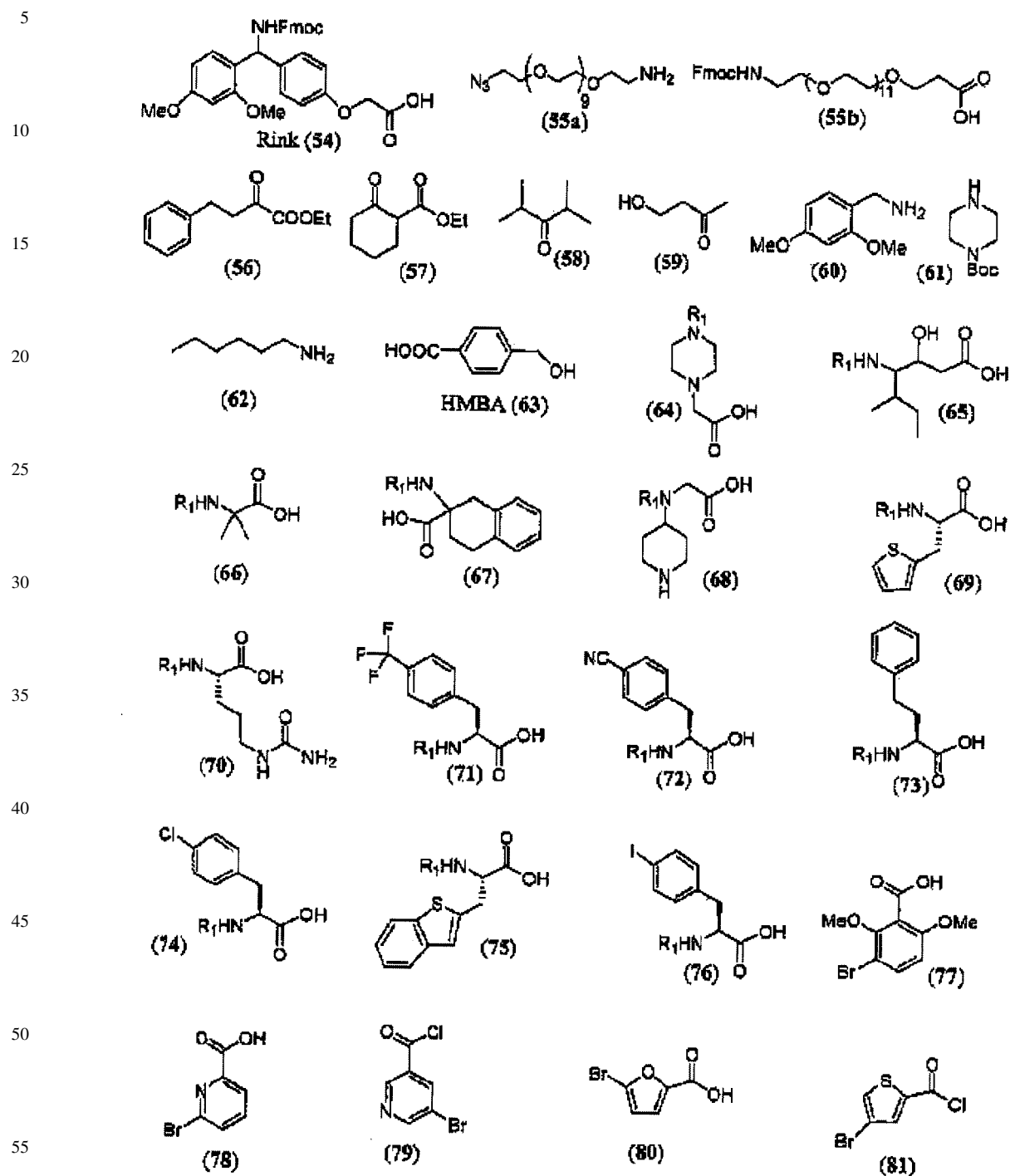
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



ES 2 318 266 T3

TABLA 7

Compuestos usados para la síntesis de la Biblioteca 4, 5, 6 y 7

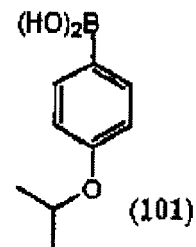
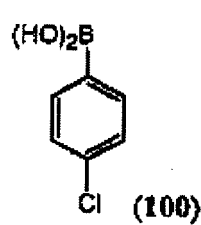
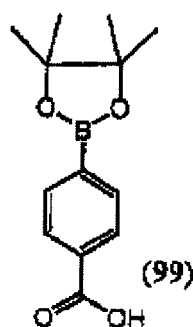
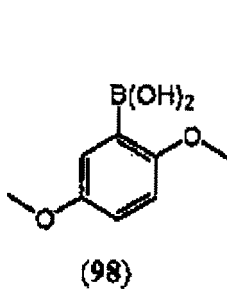
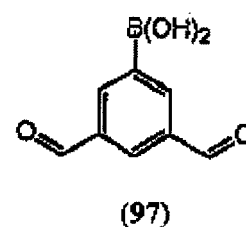
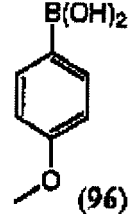
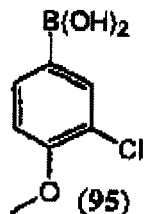
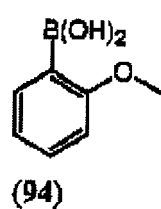
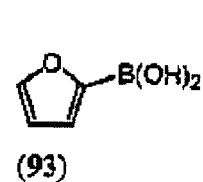
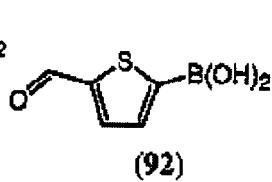
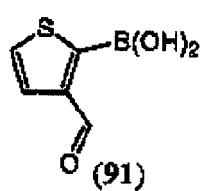
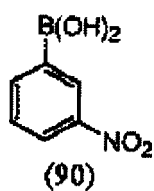
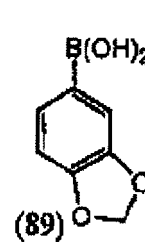
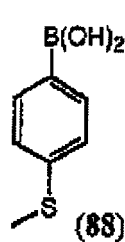
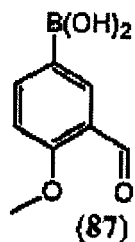
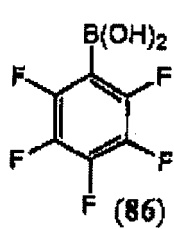
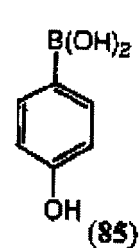
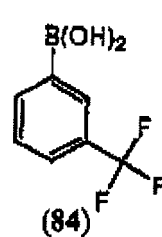
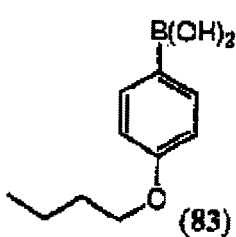
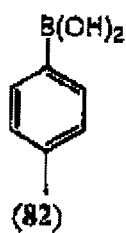


ES 2 318 266 T3

TABLA 8

Compuestos usados para la síntesis de la biblioteca 7

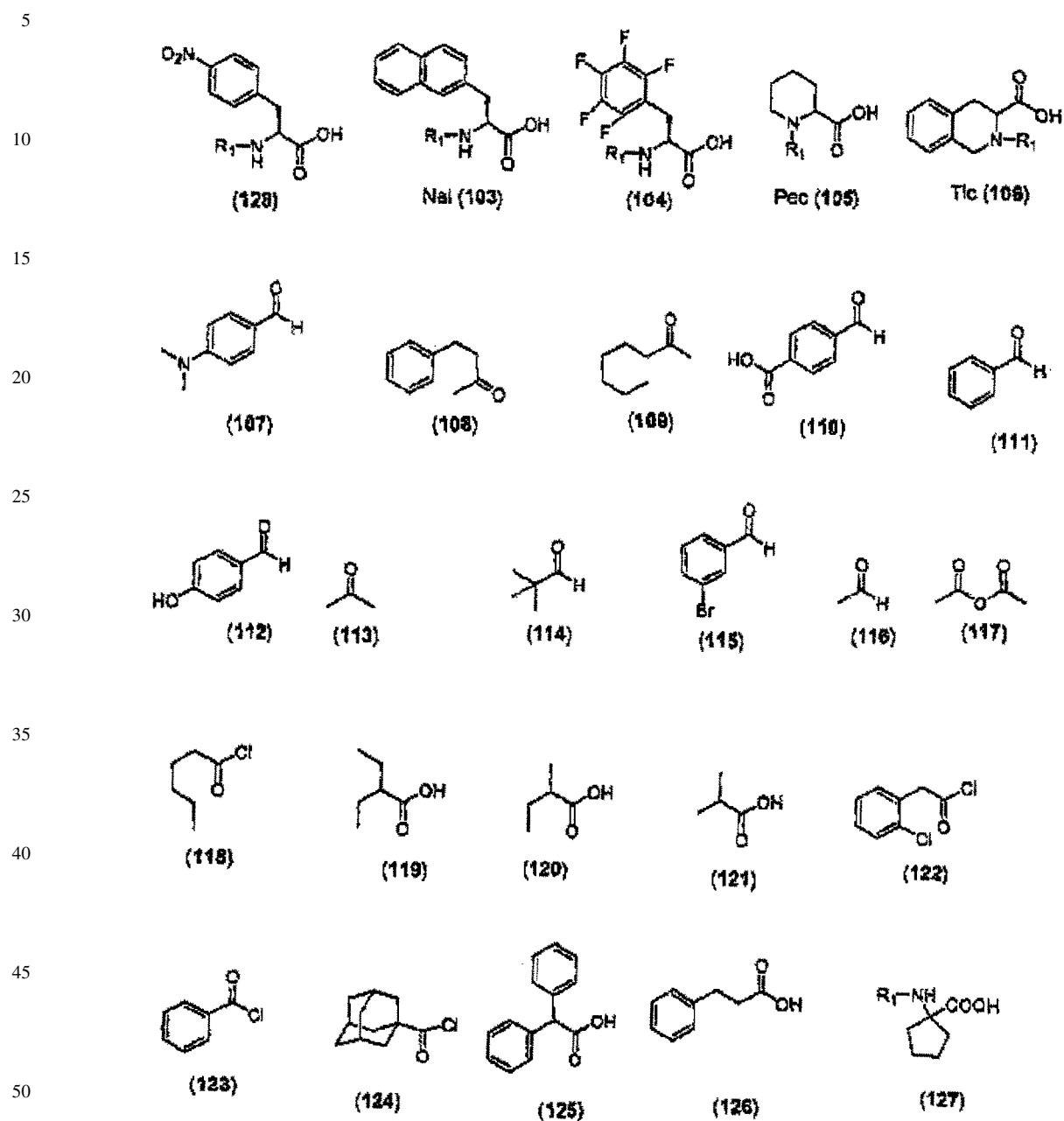
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



ES 2 318 266 T3

TABLA 9

Compuestos usados para la síntesis de la biblioteca 4, 5 y 7



ES 2 318 266 T3

Esquema 1

Síntesis de la biblioteca 1

5

1. **1** (3 eq), TBTU/NEM, DMF
2. Lavar (DMF 6x)
3. 20% Piperidina en DMF (4 + 16 min)
4. Lavar (DMF 6x)

10



15

5. Fmoc-Phe-OH (3 eq), TBTU/NEM, DMF
6. Lavar (DMF 6x)
7. 20% Piperidina en DMF (4 + 16 min)
8. Lavar (DMF 6x)
9. Repetir pasos 5-8 para 2, y Fmoc-Val-OH

20

10. Dividir resina en 20 porciones
11. Fmoc-X-OH/Boc-X-OH (4 eq, 9:1), TBTU/NEM, DMF
12. Lavar (DMF 6x)
13. 20% Piperidina en DMF (4 + 16 min)
14. Lavar (DMF 6x)



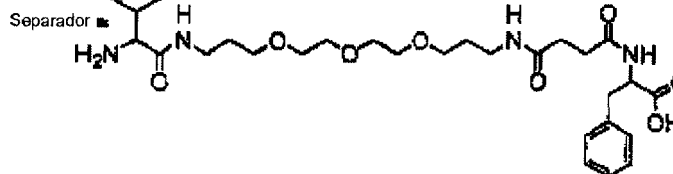
25

15. Mezclar resina
16. Repetir 10-15 durante 5 ciclos más
17. Lavar (DCM 10x)
18. 85% TFA (con barredores) 1 h
19. Lavar (90% CH₃COOH 2x, DMF 2x, 5% DIPEA/DMF 2x, DMF 4x y DCM 10x)

30

$X_{1-6} = 3 - 12, 21 - 30$

P11 = 1



35

40

45

50

55

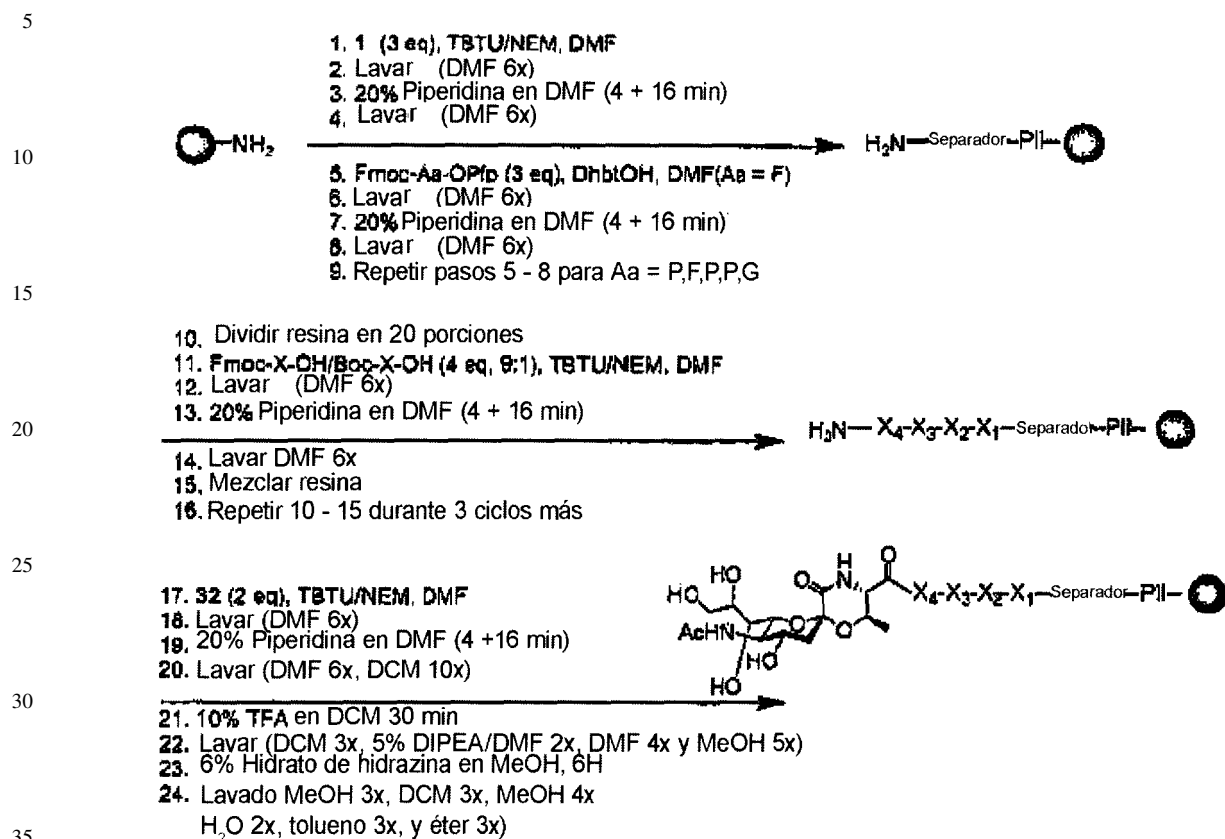
60

65

ES 2 318 266 T3

Esquema 2

Síntesis de la biblioteca 2

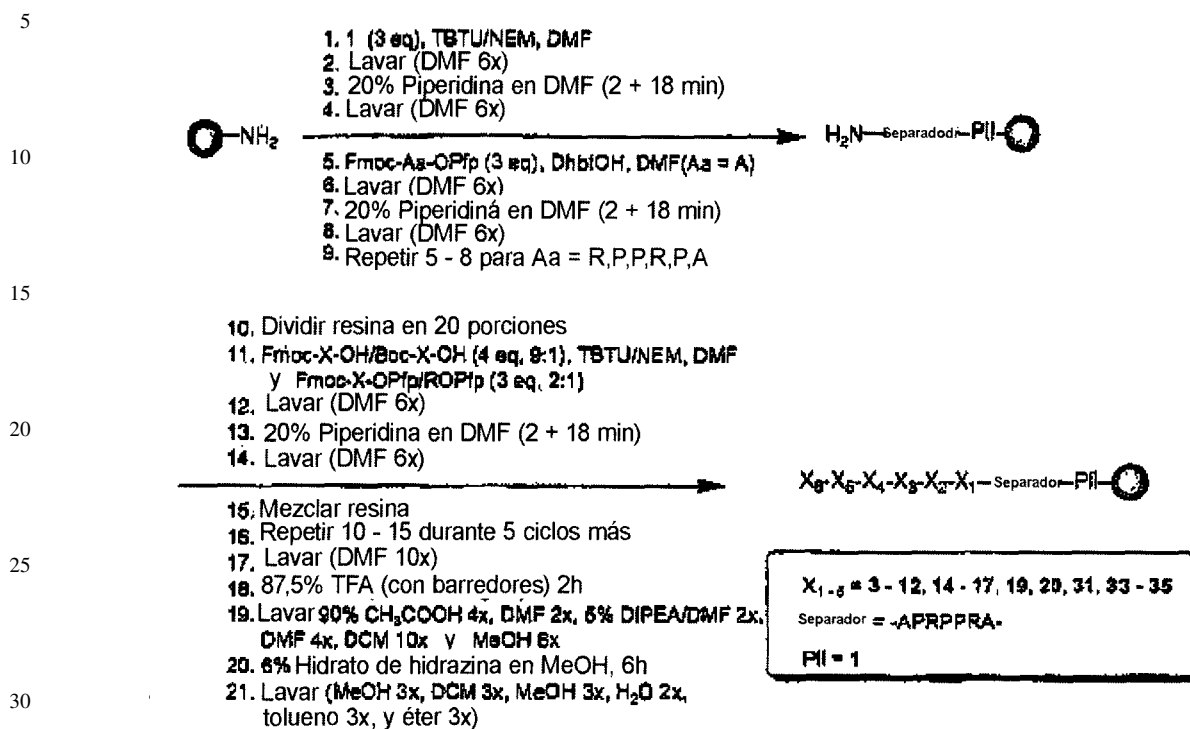


X₁₋₄ = 3 - 5, 7, 9-16, 18-20, 31
Separador = .GPPFPF-
P1 = 1

ES 2 318 266 T3

Esquema 3

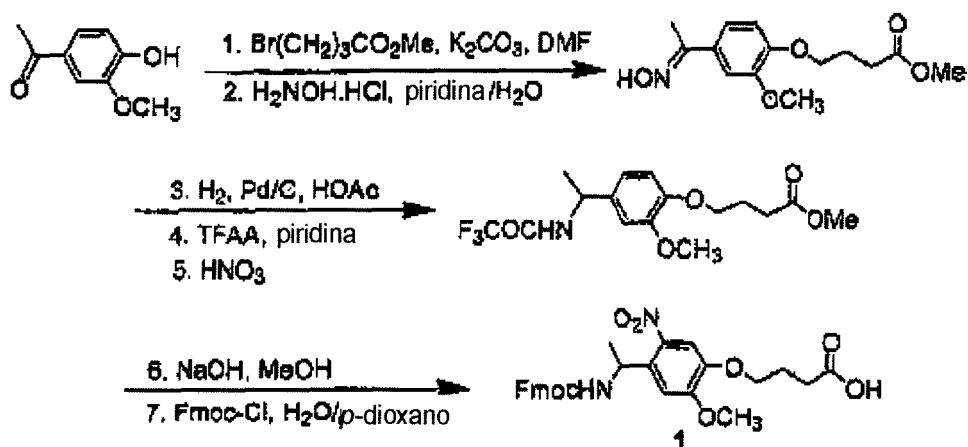
Síntesis de la biblioteca 3



Esquema 4

Síntesis de 1

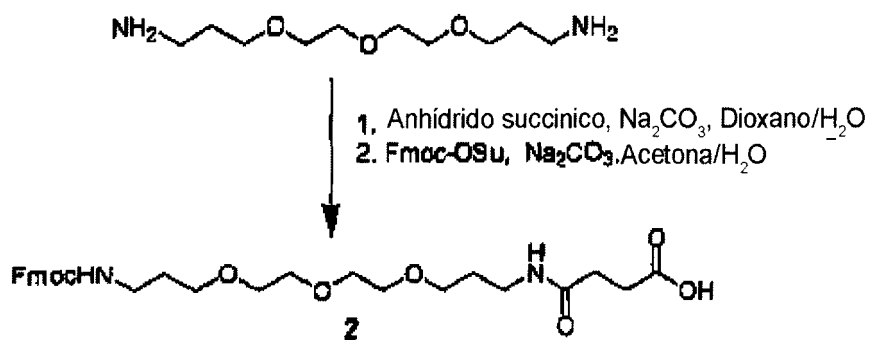
C.P. Holmes, D.G. Jones, *J. Org. Chem.* 60, pp. 2318-2319, (1995)



ES 2 318 266 T3

Esquema 5

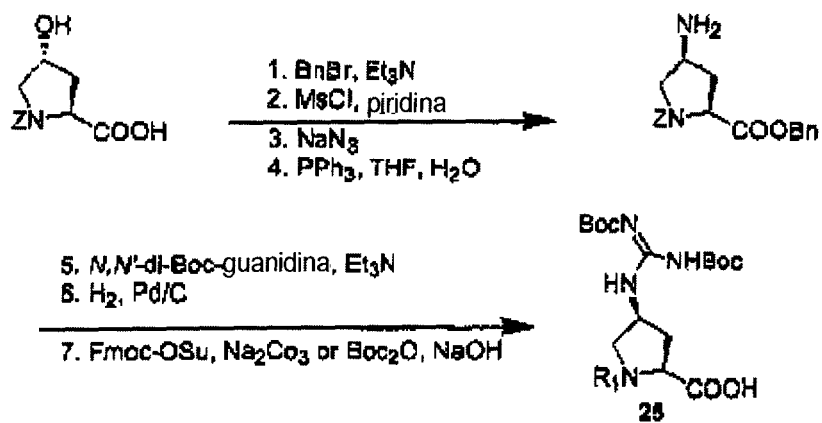
Síntesis de 2



Esquema 6

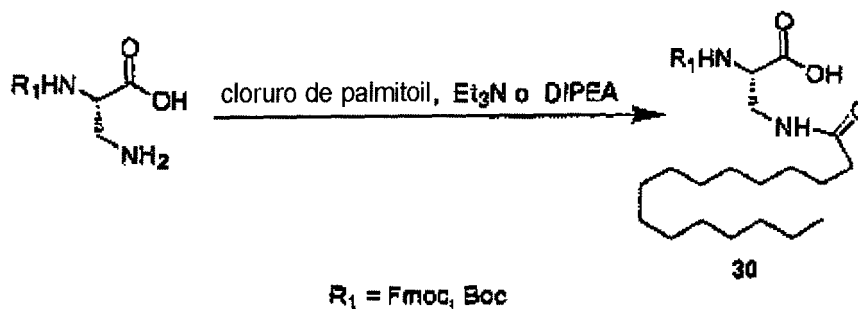
Síntesis de 25

M. Tamaki, G. Hen, V. Hruby, *J. Org. Chem.* 66, pp. 1038-1042, (2001).



Esquema 7

Síntesis de 30

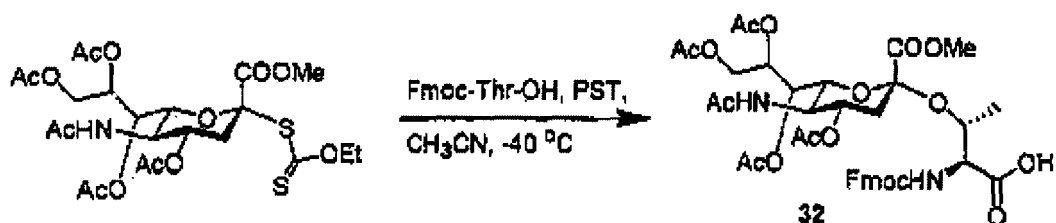


ES 2 318 266 T3

Esquema 8

Síntesis de 32

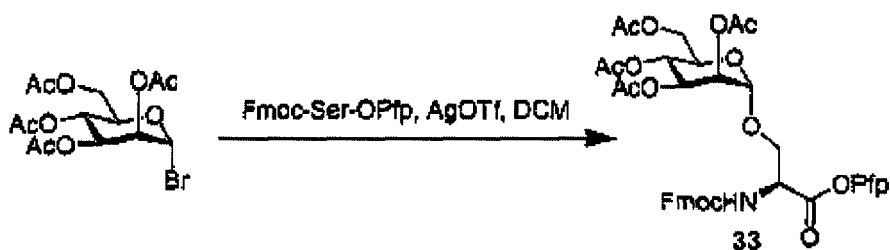
K.M. Halkes, P.M. St.Hilens, A.M. Jansson, A. M., C.H. Gottfredsen, Meldal, M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pp. 2127-2133, (2000)



Esquema 9

Síntesis de 33

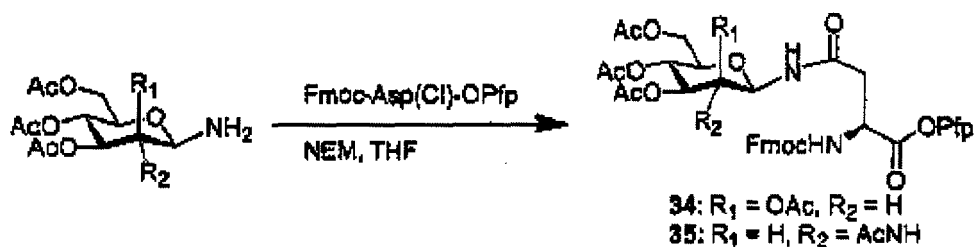
D.M. Andrews, P.W. Seale, *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 42, pp.165 -170, (1993)



Esquema 10

Síntesis de 34 y 35

I. Christensen-Brams, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, pp. 1461-718, (1993).

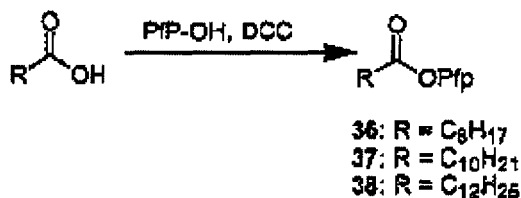


ES 2 318 266 T3

Esquema 11

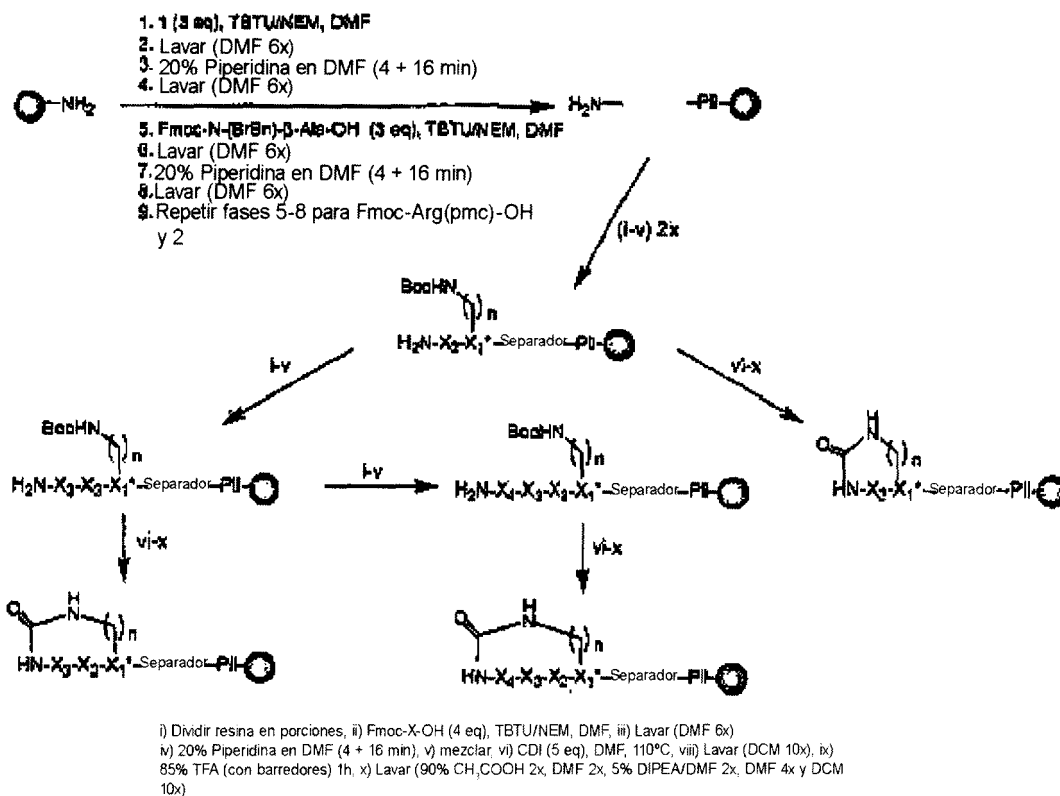
Síntesis de 36-38

E. Atherton, R.C. Sheppard, in "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach",
IRL Press at Oxford University Press: Oxford, 1989, pp. 76-79.



Esquema 12A

Síntesis de la biblioteca 4, Variación A



ES 2 318 266 T3

Esquema 12B

Síntesis de la biblioteca 4, Variación B

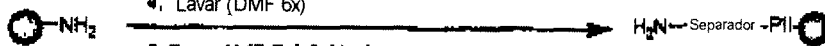
5

1. † (3 eq), TBTU/NEM, DMF

2. Lavar (DMF 6x)

3. 20% Piperidina en DMF (4 + 16 min)

4. Lavar (DMF 6x)



5. Fmoc-N-(BrBn)-β-Ala-OH (3 eq), TBTU/NEM, DMF

6. Lavar (DMF 6x)

7. 20% Piperidina en DMF (4 + 16 min)

8. Lavar (DMF 6x)

9. Repetir pasos 5-8 para Fmoc-Arg(Pmc)-OH y 2

10

15

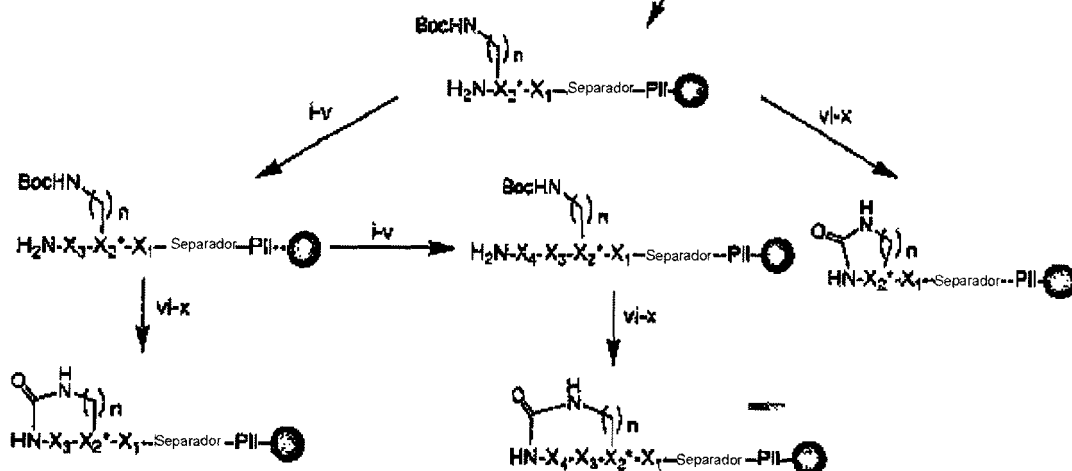
20

25

30

35

40



i) Dividir resina en porciones, ii) Fmoc-X-OH (4 eq), TBTU/NEM, DMF, iii) Lavar (DMF 6x),
 iv) 20% Piperidina en DMF (4 + 16 min), v) mezclar, vi) CDI (5 eq), DMF, vii) DMF, 110°C, viii) Lavar (DCM 10x)
 ix) 85% TFA (con barredores) 1h, x) Lavar (90% CH₂COOH 2x, DMF 2x, 5% DIPEA/DMF 2x, DMF 4x y DCM 10x)

Esquema 13B

Síntesis de la biblioteca 5: Variación B

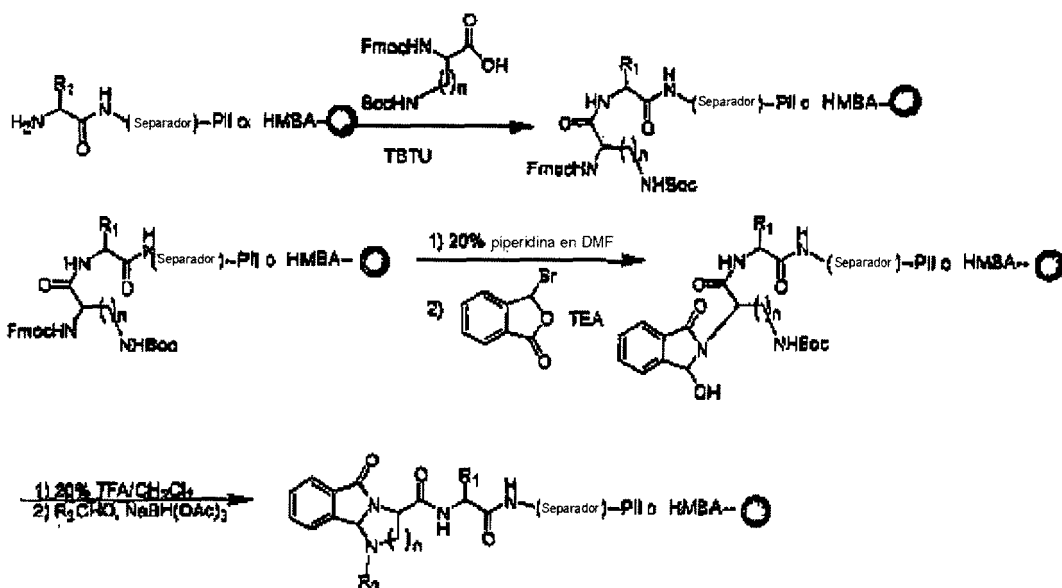
45

50

55

60

65



ES 2 318 266 T3

Esquema 14

Síntesis de la biblioteca 6

5

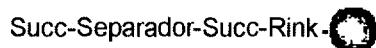


10

15

20

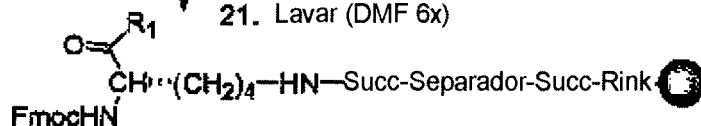
25



30

35

40

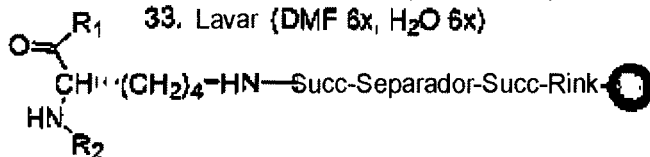


45

50

55

60



65

1. FmocRinkOH (2 eq), TBTU/NEM, DMF
2. Lavar (DMF 6x)
3. 20% Piperidina en DMF (2 + 18 min)
4. Lavar (DMF 6x)
5. Anhídrido succínico (15 eq), DIPEA, DCM
6. Lavar (DCM 3x, DMF 3x)
7. N₃PEG-NH₂ (n= 10, 3 eq), TBTU/HOBV/DIPEA, DMF
8. Lavar (DMF 6x, DCM 1:1:1)
9. 0.1M DTT, DBU (2 eq), DMF
10. Lavar (DMF 3x, DCM 3x)
11. Anhídrido succínico (15 eq), DIPEA, DCM
12. Lavar (DCM 3x, DMF 3x)

13. PfpOTFA, Piridina, DCM (1:1:1)
14. Lavar (DCM 5x)
15. Fmoc-Lys-OH (5eq)/DIPEA, DhbtOH, DMF
16. Lavar (DMF 6x, DCM 6x)
17. PfpOTFA, Piridina, DCM (1:1:1)
18. Lavar (DCM 3x, DMF 3x)
19. Dividir en 10 porciones
20. Aminas 3, 4, 7, 8, 10, 15, 20, 60-62 =R₁, (5 eq) / DIPEA
21. Lavar (DMF 6x)

22. 20% Piperidina en DMF (2 + 18 min)
23. Lavar (DMF 6x, DCM 6x)
24. Cada porción dividida en 4 porciones
25. Lavar (TEOF 3x, DMF/MeOH/TEOF 1:1:1 +1% HOAc 1x)
26. Cetonas 56-59 =R₂ (30eq), NaCNBH₃ (45 eq), DMF/MeOH/TEOF 1:1:1 +1% HOAc
27. Lavar (DMF 3x, MeOH 3x, DMF 3x, DCM 3x)
28. 1M NaOH (7.5 h, rt, porciones con protección éster)
29. Lavar (H₂O 10x)
30. 90% HOAc (3h, 60° C, porción con protección tritilo)
31. Lavar (90% HOAc 3x, DCM 3x, H₂O 3x)
32. DMF (3 h, 120° C, porción con protección Boc)
33. Lavar (DMF 6x, H₂O 6x)

ES 2 318 266 T3

Esquema 15

Síntesis de la biblioteca 7

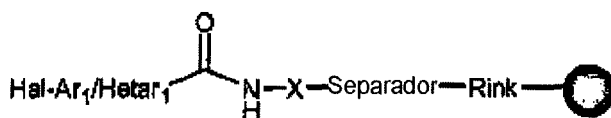
5



10

1. Separador (**55b**) (3 eq.), TBTU/NEM, DMF
2. Dividir resina en 40 porciones
3. 20% Piperidina en DMF (2+18 min)
4. Fmoc-X-OH (3 eq.), TBTU/NEM, DMF
5. 20% Piperidina en DMF (2+18 min)
6. Hal-Ar₁/HetAr₁-COOH (3 eq), TBTU/NEM, DMF o Hal-Ar₁/HetAr₁-COCl (3 eq) Et₃N, DMF.

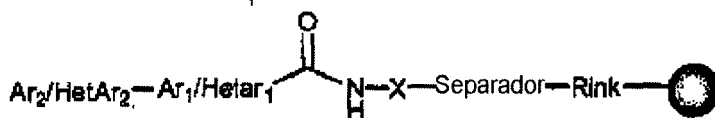
15



25

7. Ar₂/HetAr₂-Ácido borónico/éster (10 eq), 2M K₃PO₄ (5 eq) Pd(PPh₃)₄ (0.1 eq), tolueno/EtOH (1:1), rt. o 80°C.
8. DMF, 120°C durante 20 min, luego lavar DMF (3x), CH₂Cl₂ (5x)

30



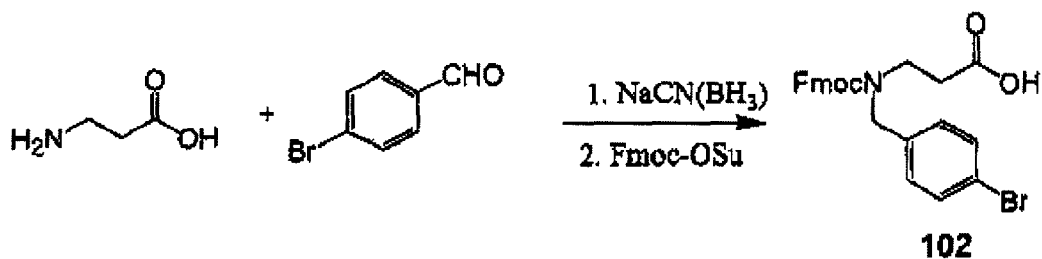
35

40

Esquema 16

Síntesis de Fmoc-N^α-(p-BrBn)-β-Alanina

45



55

Ejemplo 1

60

Síntesis de ácido *N*-(*N'*-Fmoc-13-amino-4,7,10-trioxa-tridecil)-succinámico (2)

Ácido *N*-(*N'*-Fmoc-13-amino-4,7,10-trioxa-tridecil)-succinámico (2), mostrado arriba en la tabla 1, fue preparado como se muestra en el esquema 5.

65

4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanodiamina (5 g, 22.7 mmol, 5 ml) fue disuelta en una solución de Na₂CO₃ (7 g) en H₂O (50 ml). Anhídrido succínico (2.5 g, 2.5 mmol) en dioxano (50 ml) fue añadido gota a gota. La solución se volvió turbia, luego una suspensión. Se agitó a la temperatura ambiente durante 24 horas, luego se calentó a 80°C durante

ES 2 318 266 T3

otra hora. El solvente fue eliminado al vacío. El residuo fue tratado con 1 N de NaOH (200 ml) y extraído con DCM (2x100 ml). La fase acuosa fue separada, acidificada a pH 1 con 1 N de HCl, extraída con DCM (2x100 ml), luego neutralizada con NaHCO₃ a pH 7.

5 El material en bruto fue disuelto en el 50% acetona/H₂O (120 ml) y se añadió Na₂CO₃ (5 g). Fmoc-OSu (7,5 g, 22,3 mmol) fue añadido en partes durante 1 hora mientras que el pH fue mantenido entre 9-10 por adición de 1 M de Na₂CO₃. La solución fue agitada a la temperatura ambiente durante 18 horas. La acetona fue eliminada al vacío. El residuo fue tratado con 6 N de HCl (60 ml) y extraído con 2x150 ml de acetato de etilo. El extracto fue combinado y lavado con 2x60 ml de solución salina y secado sobre Na₂SO₄. El solvente fue eliminado al vacío y el residuo fue puesto en una columna. Cromatografía dos veces, primero con etil acetato:hexano (2:1), luego DCM/MeOH (3:1) dieron un compuesto puro como aceite (3,52 g, 29%). El compuesto resultante (2) mostró las características siguientes:

15 ¹H RMN (CDCl₃, δ) 7.76 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.60 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.29-7.43 (m, 4H), 4.40 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.46-3.62 (m, 14H), 3.26-3.35 (m, 4H), 2.66 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 1.75 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, δ) 175.1, 172.3, 156.5, 143.7, 140.9, 127.4, 126.8, 124.8, 119.7, 70.0, 69.7, 69.6, 69.2, 68.8, 66.1, 46.9, 38.5, 37.5, 30.5, 29.6, 29.1, 28.5. ES-MS: Calcd para C₂₈H₃₈N₂O₈ [M + H]⁺ = 543.26, encontrado: 543.18.

20 Ejemplo 2

Síntesis de (2S,4S)-N^α-fmoc-4-N,N'-di-Boc-guanidinoprolina (25a) y (2S,4S)-N^α-Boc-4-N,N'-di-Boc-guanidinoprolina (25b)

25 (2S,4S)-N^α-fmoc-4-N,N'-di-Boc-guanidinoprolina (25a) y (2S,4S)-N^α-Boc-4-N,N'-di-Boc-guanidinoprolina (25b) mostrados arriba en la tabla 2, fueron preparados a partir de Z-Hyp-OH según el procedimiento de la bibliografía descrito en Tamaki *et Al.*, 2001, J. Org. Chem. 66, 1038-1042), como se muestra en el Esquema 6.

30 Ejemplo 3

Síntesis de Fmoc-Dapa(Pal)-OH (30a)

35 Fmoc-Dapa (PAL)-OH (30a) como se muestra arriba en la tabla 2, fue preparado como se muestra en el esquema 7.

Fmoc-Dapa-OH (500 mg, 1,53 mmol) y diisopropiletilamina (780 mg, 6 mmol, 1 ml) fueron disueltos en DCM (20 ml). Palmitoil cloruro (420 mg, 1,53 mmol, 0,46 ml) fue añadido gota a gota con agitación usando una jeringa. La suspensión se volvió clara lentamente. Después de la agitación a la temperatura ambiente durante 2 horas, la solución fue concentrada al vado. El residuo fue purificado por cromatografía en columna rápida con DCM:EtOH (10:1) para dar el producto puro (800 mg, 98%) como un polvo blanco:

45 ¹H RMN (CDCl₃, δ) 7,68 (m, 2H), 7,49 (m, 2H), 7,19-7,33 (m, 4H), 4,27 (br, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,62 (br, 1H), 2,10 (br, 2H), 1,44 (br, 2H), 1,17 (m, 28H), 0,8 (m, 3H). ¹³C RMN (CDCl₃, δ) 176,4, 157,1, 144,1, 143,9, 141,7, 141,6, 128,1, 127,5, 126,2, 125,5, 120,4, 67,7,47,5, 42,3, 36,7, 32,3, 30,1, 30,0, 29,9, 29,8, 29,6, 23,1, 14,5.

Ejemplo 4

50 *Síntesis de Boc-DapaCPal)-OH (30b)*

Boc-Dapa (Pal)-OH (30b) como se muestra en tabla 2, fue preparado como se muestra en el Esquema 7.

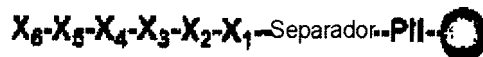
55 Boc-Dapa-OH (150 mg, 0,73 mmol) y trietilamina (114 mg, 1 mmol, 0,07 ml) fue disuelto en THF (30 ml). Palmitoil cloruro (137 mg, 0,5 mmol, 0,15 ml) fue añadido a través de una jeringa. La solución fue agitada a la temperatura ambiente durante 2 horas, luego concentrada al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna rápida con DCM: EtOH (10:1) dando 128 mg (51%) de producto puro como un polvo blanco:

60 ¹H RMN (CDCl₃, δ) 5.38 (m, 2H), 3.15-3.45 (m, 12H), 2.01-2.10 (m, 4H), 1.18-1.60 (m, 26H). ¹³C RMN (CDCl₃, δ) 173.9, 157.2, 134.4, 79.7, 40.7, 37.9, 36.6, 28.7, 28.6, 26.6, 25.4.

Ejemplo 5

Síntesis de la biblioteca 1

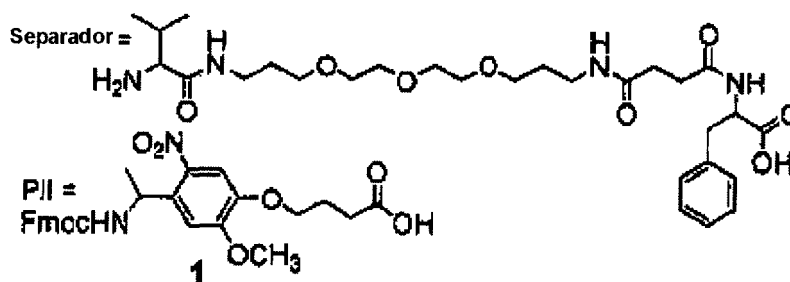
5



10

X_{1-6} = aminoácidos naturales e innaturales (3-12, 21-30)

15



25

El esquema sintético para construir la biblioteca 1 que tiene la estructura $X_6X_5X_4X_3X_2X_1$ (X= un aminoácido natural o innatural) [SEC ID N°: 2] está mostrado arriba como en el Esquema 1. La biblioteca 1 fue preparada en resina PEGA₄₀₀₀ (1 g, 0.12 mmol/g; perlas de 300-500 μ m) usando el método de síntesis en escala, tal y como ha sido descrito anteriormente en St. Hilaire *et al.*, 1998, J. Am. Chem. Soc. 120: 13312-13320). Puesto que la biblioteca no fue diseñada para una clase particular de proteínas, los bloques de construcción usados fueron elegidos de forma arbitraria pero de tal manera que tantos grupos funcionales como fuera posible fuesen presentados en las cadenas laterales: p. ej. ácidos carboxílicos, aminas, indoles, piridinas, alifáticos, aromas, imidazoles, hidróxilos, y similares. La Biblioteca 1, $X_6X_5X_4X_3X_2X_1$, donde X= un aminoácido natural o innatural, fue producida usando bloques de construcción 3-12 y 21-30 [SEC ID NO: 1]. Los bloques de construcción son tal y como se muestran arriba en las tablas 1 y 2.

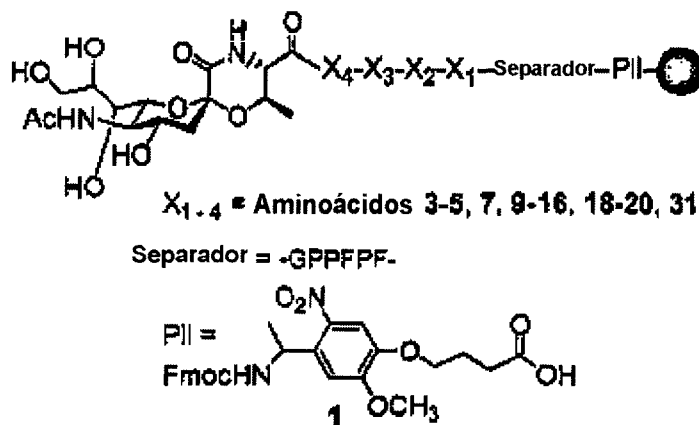
Para producir la biblioteca 1, como se muestra en el Esquema 1, un enlazador fotolábil, PII (1) (3 equivalentes) fueron acoplados a las perlas de resina bajo activación de TBTU. Un enlazador fotolábil fue elegido porque es estable en una variedad amplia de condiciones y puede ser fácilmente dividido para producir un producto que no requiera purificación adicional antes del análisis de MS. Una molécula separadora compuesta por acoplamiento secuencial de Fmoc-Phe-OH, separador (2) y Fmoc/Boc-Val-OH después de la preactivación de TBTU fue luego añadida. La molécula separadora se utiliza para permitir la identificación del ligando usando MALDI-TOF MS porque aumenta la masa de los fragmentos de ligando hasta más de 600 mu, es decir fuera de los picos matriciales. El separador fue diseñado de manera que tuviera pocas o ninguna interacciones con cualquier proteína en la mezcla.

Las seis posiciones aleatorizadas de la biblioteca fueron generadas mediante la división y enfoque de la mezcla descritos en Furka *et al.*, 1991, Int. J. Peptide Protein Res., 37: 487-493 y Lam *et al.*, 1991, Nature, 354: 82-84 en un generador de biblioteca de columna múltiple de 20 pocillos hecho a medida (2,0 ml de capacidad). Durante la síntesis de la biblioteca, el 10% del oligómero de crecimiento fue cubierto usando el análogo del aminoácido protegido con Boc del bloque de construcción Fmoc. En consecuencia, una mezcla del aminoácido protegido con Fmoc y Boc (90% Fmoc y 10% Boc, 4 equivalentes) de soluciones concentradas fueron activados con TBTU/NEM durante 6 minutos y luego añadidos a los pocillos. Los tiempos de acoplamiento estuvieron comprendidos entre 4 a 12 horas y la finalización de la reacción fue determinada mediante la prueba de Kaiser como se describe en Kaiser *et al.*, 1970, Anal. Biochem., 34, 595-598. Después de cada acoplamiento la resina fue agrupada, mezclada, y dividida antes de la eliminación de Fmoc. Después de cada fase de acoplamiento y desprotección, la resina fue lavada con DMF (10x). Después de la finalización de la síntesis, el grupo Fmoc fue eliminado por tratamiento con el 20% de piperidina en DMF durante 4 + 16 minutos. La resina fue lavada con DMF (6 X 2 minutos), CH_2Cl_2 (10 X 2 minutos) y luego los grupos de protección de cadena lateral lábil del ácido fueron eliminados por tratamiento con el 85% de TFA conteniendo el 2% de triisopropilsilano, 2,5% de EDT, 5% tioanisol, 5% de agua durante 1 hora. Luego la resina fue lavada con el 90% de ácido acético acuoso (4 x 5 minutos), DMF (2 x 2 minutos), 5% DIPEA en DMF (2 x 2 minutos), DMF (4 x 2 minutos), CH_2Cl_2 (10 x 2 minutos) y finalmente metanol (5 x 2 minutos), antes de ser secados por liofilización durante toda la noche.

65

Ejemplo 6

Síntesis de la biblioteca 2



25

30

35

La Biblioteca 2 conteniendo el péptido $X_4X_3X_2X_1$ donde X es cualquier aminoácido de 3-5, 7, 9-16, 18-20, o 31, como se muestra en las Tablas 1 y 2 [SEC ID NO: 3], fue sintetizada según el Esquema 2, mostrado arriba (los puntos negros grandes representan una perla de resina). La Biblioteca 2 fue sintetizada en resina PEGA1900 (600 mg, ca. 250.000 perlas, 300-500 μ M, 0,22 mmol/g de carga). El enlazador fotolábil PII (1) (3 equivalentes) bajo activación de TBTU fue primero acoplado a la resina seguido del separador peptídico, GPPFPF [SEC ID NO: 4], en una jeringa, mediante la metodología estándar de Fmoc-Opfp, por ejemplo, como se describe en Atherton *et al.*, 1989, en: "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press: Oxford, pp. 76-79. El enlazador fotolábil fue elegido porque es estable en una variedad amplia de condiciones y puede ser fácilmente dividido para producir un producto que no requiera purificación adicional antes del análisis de MS. La molécula de separador peptídico, GPPFPF, es útil para permitir la identificación del ligando usando MALDI-TOF MS porque aumenta la masa de los fragmentos de ligando hasta más de 600 mu, es decir fuera de los picos matriciales. El separador fue diseñado para tener poca o ninguna interacción con proteínas de unión a carbohidratos.

40

45

50

La Biblioteca 2 fue originalmente diseñada para unirse a proteínas de unión a carbohidratos particularmente proteínas de unión al ácido siálico, por lo tanto el treonina lactamo de ácido siálico fijo en la posición 5. Los bloques de construcción que comprenden las cuatro posiciones aleatorizadas fueron elegidos de aminoácidos naturales presentando funciones diversas en el grupo funcional de cadena lateral: por ejemplo, amidas, indoles, alifáticos, aromas; imidazoles, hidroxilos, y similares. Las cuatro posiciones aleatorizadas de la biblioteca 2 fueron generadas mediante la división y enfoque de la mezcla descritos, por ejemplo, en Furka *et al.*, 1991, Int. J. Peptide Protein Res., 37: 487-493) y Lam *et al.*, 1991, Nature, 354: 82-84) en un generador de bibliotecas de columna múltiple de 20 pocillos hecho a medida (2,0 ml de capacidad). Durante la síntesis de la biblioteca, el 10% del oligómero de crecimiento fue cubierto usando el análogo del aminoácido protegido con Boc del bloque de construcción de Fmoc. Para el acoplamiento de aminoácidos no glicosilados, una mezcla del aminoácido protegido con Fmoc y Boc (90% Fmoc y 10% Boc, 4 equivalentes) de soluciones concentradas fue activada con TBTU/NEM durante 6 minutos y luego añadida a los pocillos. Los bloques de construcción 3-5, 7, 9-16 y 18-20, como se muestra en tabla 1 arriba, fueron usados. Los tiempos de acoplamiento estuvieron comprendidos entre 4 a 12 horas y la finalización de la reacción fue controlada mediante la prueba de Kaiser (Kaiser *et al.*, 1970, anal. Biochem., 34, 595-598).

55

60

Después de cada acoplamiento, la resina fue agrupada, mezclada y dividida antes de la eliminación de Fmoc. Después de cada fase de acoplamiento y desprotección, la resina fue lavada con DMF (6x). El bloque de construcción 32 (2 equivalentes), mostrado en la tabla 2, fue activado con TBTU/NEM durante 5 minutos, y luego añadido a todos los pocillos durante toda la noche. El grupo Fmoc fue eliminado por tratamiento con piperidina (4 + 16 minutos) y el producto resultante fue inmediatamente ciclizado para formar el análogo lactamizado, según ha resultado de una prueba de Kaiser negativa. Los grupos con Boc fueron eliminados por tratamiento con el 10% de TFA en DCM durante 30 minutos y los grupos de protección de acetilo de los carbohidratos fueron eliminados por hidrólisis con hidrato de hidrazina (55 μ l) en metanol (1 ml) durante 6 horas, seguido de lavado con metanol (3 x 2 minutos), CH_2Cl_2 (3 x 2 minutos), metanol (3 x 2 minutos), H_2O (3 x 2 minutos), tolueno (3 x 2 minutos), y finalmente éter dietílico (3 x 2 minutos).

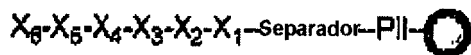
65

ES 2 318 266 T3

Ejemplo 7

Síntesis de biblioteca 3

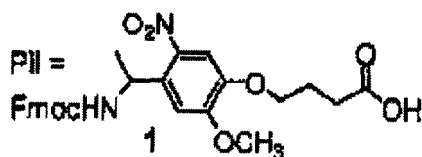
5



10

X_{1-6} = aminoácidos 3-12, 14-17, 19, 20, 31, 33-35 separador = -APRPPRA-

15



20

25 La Biblioteca 3, una biblioteca de glicopéptidos conteniendo el péptido $X_6X_5X_4X_3X_2X_1$ donde X es cualquier aminoácido de 3-12, 14-17, 19, 20, o 31, (mostrado en tablas 1 y 2) [SEC ID NO: 5], fue sintetizada en resina PEGA₁₉₀₀ (1 g, 300-500 μm perlas 0,23 mmol/g de carga) según el Esquema 3. Una Biblioteca de glicopéptidos fue elegida porque los glicopéptidos pueden imitar a los oligosacáridos y en consecuencia unirse a proteínas de unión a carbohidratos.

30

Los glicopéptidos fueron fijados a la resina por medio del enlazador fotolábil, PII (1), y el separador de masa peptídica, APRPPRA [SEC ID NO: 6], fue sintetizado en una jeringa antes de la generación de la biblioteca. El enlazador fotolábil fue elegido porque es estable en una variedad amplia de condiciones y puede ser dividido fácilmente para producir un producto que no requiera purificación adicional antes del análisis de MS. La molécula de separador peptídico, APRPPRA, fue usada para permitir la identificación del ligando usando MALDI-TOF MS, puesto que aumenta la masa de los fragmentos de ligando hasta más de 600 mu, más allá de los picos matriciales, y ayuda a la ionización de los fragmentos debido al contenido de arginina. El separador fue diseñado de manera que tuviera pocas o ningunas interacciones con proteínas de unión a carbohidratos.

35

40 La Biblioteca 3 fue diseñada para unirse a proteínas de unión de carbohidratos, particularmente proteínas específicas de glucosa/manosa. Los bloques de construcción que comprenden las seis posiciones aleatorizadas fueron elegidos de aminoácidos naturales que presentaban funciones diversas en el grupo funcional de la cadena lateral: por ejemplo, ácidos carboxílicos, amidas, indoles, alifáticos, aromas, imidazoles, hidróxilos, y similares, al igual que glicosil aminoácidos que contienen residuos de manosa y N-acetilglucosamina. Los aminoácidos naturales fueron cubiertos con los análogos protegidos con Boc del aminoácido Fmoc mientras que los glicosil aminoácidos fueron cubiertos usando marcas de codificación alifáticas. Los aminoácidos 3-12, 14-17, 19, 20, 31, aminoácidos glicosilados 33-20, y las marcas de codificación alifáticas 36-38 como se muestra arriba fueron usados en Tablas 1 y 2. Las posiciones aleatorizadas en la biblioteca fueron generadas usando el enfoque de síntesis por división (Furka, *et al.*, 1991, Int. J. Peptide Protein Res., 37: 487-493 y Lam *et al.*, 1991, Nature, 354: 82-84) usando un sintetizador de columna múltiple de 20 pocillos hecho a medida (2,0 ml de capacidad).

45

50 Después de cada acoplamiento, la resina fue agrupada, mezclada y dividida antes de la eliminación de Fmoc con el 20% de piperidina (2 + 18 minutos). Después de cada acilación y fase de desprotección, la resina fue lavada con DMF (6x). Para el acoplamiento de los aminoácidos no glicosilados, una mezcla del aminoácido protegido con Fmoc y Boc (90% de Fmoc y 10% de Boc, 4 equivalentes totales) de soluciones concentradas fue activada con TBTU/NEM durante 5 minutos y luego añadida a los pocillos. Para el acoplamiento de los aminoácidos glicosilados, 3 equivalentes de una mezcla del aminoácido glicosilado (67%) y la marca de codificación alifática (33%) fue activada con Dhbt-OH y directamente añadida a los pocillos (33 y 36, 35 y 37, 34 y 38). Los tiempos de acoplamiento estaban comprendidos entre 4 y 12 horas y la finalización de la reacción fue controlada por la prueba de Kaiser (Kaiser, *et al.*, 1970, Anal. Biochem., 34; pp.595-598).

55

60 Después del acoplamiento final, los grupos de protección de cadena lateral fueron eliminados usando un cóctel que consistía en TFA 87.5%, EDT 2.5%, tianisol 5% y H₂O 5% durante 2.5 horas. Luego, la resina fue lavada con el 90% de ácido acético acuoso (4 x 5 minutos), DMF (2 x 2 minutos), 5% DIPEA en DMF (2 x 2 minutos), DMF (4 x 2 minutos), CH₂Cl₂ (10 x 2 minutos), y finalmente con metanol (5 x 2 minutos), antes de ser secados por liofilización durante toda la noche. Los grupos de protección del acetilo de los carbohidratos fueron eliminados por hidrólisis con hidrato de hidrazina (55 μl) en metanol (1 ml) durante 6 horas, seguido de lavado con metanol (3 x 2 minutos), CH₂Cl₂ (3 x 2 minutos), metanol (3 x 2 minutos), H₂O (3 x 2 minutos), tolueno (3 x 2 minutos), y finalmente éter dietílico (3 x 2 minutos).

65

ES 2 318 266 T3

Ejemplo 8

Resíntesis de ligandos activos

5 Los ligandos para la unión a proteínas en fase sólida fueron resintetizados en PEGA₄₀₀₀ para el análisis de las proteínas de los miocitos y proteínas de la membrana de *E. coli* en los ejemplos sucesivos y en PEGA₆₀₀₀ para la mezcla de 6 proteínas en el ejemplo abajo, usando métodos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida por Fmoc como se describe, por ejemplo, en Atherton *et al.*, 1998, In: Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press: Oxford, págs. 76-79.

10

Ejemplo 9

Proliferación de los miocitos

15

Los miocitos fueron preparados a partir de ratas Wistar neonatales de 1 a 5 días de vida (Universidad de Copenhage) según el procedimiento de la bibliografía descrito en Busk *et al.*, 2002, Cardiovasc. Res., 56, 64-75 y colocados en ocho placas de cultivo P10 a 6 millones de células/placa. Las células crecieron a 37°C y una humedad del 5% de CO₂ en Medios de Eagle modificados (MEM) sin suero. Después de 2 días, las células adherentes fueron lavadas a la temperatura ambiente con MEM sin suero (2x) y se añadió MEM fresco. A cuatro de las placas, también se añadieron 20 10 µM de fenilefrina (PE). Las células crecieron durante dos días más y luego fueron cosechadas como se describe abajo. Las células tratadas con PE fueron significativamente aumentadas en el momento de la cosecha.

25 Ejemplo 10

Proliferación de DH 5α-136 de Escherichia coli

[0194] Un cultivo de 400 ml de DH 5α-136 de *Escherichia coli* (Carlsberg Research Center Collection) fue preparado según los procedimientos descritos en Hanahan, 1985, en: DNA Cloning, Vol 1, Glover, D., ed., IRL Press Ltd, pp. 109- 135. Las células crecieron a partir de inóculos en medios de LB a 37°C durante 5 a 6 horas y fueron cosechadas en esta fase logarítmica a una densidad óptica de 0,8 (600 nm) por centrifugado (10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C). Los medios que contenían proteínas extracelulares fueron retenidos y el granulado fue lavado una vez con PBS, pH 7.6 (peso celular = 2.22 g).

35

Ejemplo 11

Preparación de proteína marcada de miocitos inducidos con PE y basales

40

La proteína fue extraída de miocitos preparados como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 9, usando un procedimiento nuevo modificado de protocolos existentes, principalmente: Arnott, *et Al.*, 1998, anal. Biochem. 258, 1-18. Los medios fueron eliminados de las placas y las células adheridas fueron tratadas durante 10 minutos con tampón fosfato helado (0.25 ml, 10 mM, pH 7.5, aumentado con 0.15 M de NaCl, 60 mM de Benzamidina HCl, 45 5 mM de EDTA, 10 µg/ml E-64, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de pepstatina A, y 1 mM PMSF). Las células fueron descartadas de las placas y luego lisadas (en hielo) en un sonicador (2x) usando ciclos de 10 segundos fuera/10 segundos dentro.

La suspensión resultante fue aumentada con CHAPS, DTT, y urea a una concentración final de CHAPS (1% p/v), 50 DTT (5 mM), y urea (8 M). Después de 10-15 minutos en hielo, la solución fue centrifugada durante 10 minutos a 15.000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el contenido de proteína cuantificado mediante la prueba proteica de NanoOrange (Molecular Probes, Eugene, Oregon): proteína recuperada total: 70.5 µg para células tratadas con PE y 60 µg para células basales.

55 El colorante fluorescente verde Oregon 514 (OR) (Molecular Probes) fue usado para marcar las células saludables/basales mientras que el marcador rojo de rodamina (RR) (Molecular Probes) fue usado para marcar las células tratadas con PE. Los procedimientos de marcado fueron realizados según el protocolo del fabricante. Las soluciones de proteína (0,25 ml, 50,4 µg para células con PE y 0,25 ml, 42. 8 µg para células basales) fueron dializadas contra una solución de tampón fosfato 10 mM, 0,15 M de NaCl, pH 7.5 y luego 1 M de NaHCO₃ (0,025 ml) añadido a un pH final de 8.5. 10 µl de colorante en DMF seco (10 mg/ml) fueron añadidos y la muestra agitada a la temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de proteína fue dializada extensamente contra 10 mM de tampón de fosfato, 0,15 M de NaCl, pH 7.5, para eliminar el exceso de colorante.

65 En otro caso, el colorante fluorescente de cianina 3 (Cy 3) (Molecular Probes) fue usado para marcar las células saludables/basales mientras que cianina 2 (Cy 2) (Molecular Probes) fue usado para marcar las células tratadas con PE. Los procedimientos de marcado fueron realizados según el protocolo del fabricante. Las soluciones de proteína (0,35 ml, 100 µg para células con PE y 0,41 ml, 100 µg para células basales) fueron dializadas contra una solución de 10 mM de tampón fosfato, 0,15 M de NaCl pH 7.5 y luego 1 M de NaHCO₃ (0,03-0,04 ml) fue añadido para obtener

ES 2 318 266 T3

un pH final entre 8.0-9.0. Para un marcado eficaz, 400 pmol de flúor (solución de 5 μ l fue preparada por adición de 2 μ l de solución de fluoroforo reconstruido [1 nmol/ μ l] y 3 μ l de DMF seco) fue usado para marcar 50 μ g de proteína. El fluoroforo y la solución de proteína fueron mezclados íntegramente por agitación en vortex. Las muestras fueron luego centrifugadas brevemente en un microfuge y dejadas en hielo durante 30 min a oscuras. Para detener la reacción, 10 mM de lisina (1 μ l) fueron añadidos a las muestras y las muestras fueron mezcladas por agitación en vortex y centrifugadas brevemente en un microfuge. Las muestras fueron dejadas en hielo durante 10 min a oscuras. Las soluciones de proteína marcadas fueron dializadas extensamente contra 10 mM de tampón fosfato, 0,15 M de NaCl pH 7.5, para eliminar el exceso de colorante. Las muestras marcadas fueron almacenadas a -70°C a oscuras hasta un uso posterior.

Ejemplo 12

Preparación de proteína marcada de E. coli (proteína extracelular)

El sobrenadante conteniendo proteína extracelular obtenido de células cultivadas de *E. coli* preparadas como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 10 (400 ml de caldo), fue concentrado a 80 ml a 4°C en un concentrador Amicon usando una membrana (Millipore, Bedford, Mass.) con un corte de peso molecular de 6,000 Da (mwco). El concentrado fue adicionalmente concentrado a 25 ml (concentración de proteína = 94,5 mg/ml) usando microconcentradores Amicon centrifugados a 3000 r.p.m. durante 1,5 horas. El concentrado fue luego dializado (mwco 10,000 Da) extensamente contra 10 mM de tampón fosfato, pH 6,8 aumentado con 0,15 M de NaCl, 1 mM de ZnCl₂, 1 mM de MnCl₂, 1 mM de CuCl₂, 1 mM de MgSO₄, 1 mM de CaCl₂, y 5 mM de DTT a 4°C. Después de la diálisis, un inhibidor de proteasa; PMSF, fue añadido a una concentración final de 1 mM.

La proteína extracelular fue marcada usando un colorante reactivo a la amina, succinimidil N-metilnitrilato (Molecular Probes), usando procedimientos esencialmente como se ha descrito anteriormente para el marcado de la proteína de los micocitos en el Ejemplo 11. 50 mg del colorante en DMF seco (5 ml) fueron añadidos gota a gota con agitación a la solución de proteína extracelular (25 ml) ajustada a pH 8.35 por la adición de 1 M de NaHCO₃ (2.5 ml). La reacción fue agitada a la temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción fue detenida por la adición de 1 M de hidrocloreuro de hidroxilamina y la agitación continuó durante otra hora. La solución fue dializada durante toda la noche (10.000 mwco Da) a 4°C contra 10 mM de tampón fosfato, pH 6.8 conteniendo, 1 mM de ZnCl₂, 1 mM de MnCl₂, 1 mM de CuCl₂, 1 mM de MgSO₄, 1 mM de CaCl₂.

Ejemplo 13

Preparación de proteína marcada a partir de E. coli (proteínas de membrana)

El aislamiento de proteínas de membrana a partir de *E. coli* fue conseguido a través de la modificación de los procedimientos de la bibliografía publicada: Auer, *et al.*, 2001, *Biochemistry*, 40:6628-6635, y Molloy, *et al.*, 2000, *Eur. J. Biochem.* 267:2871-2881. Tras la incubación de células de *E. coli* durante 2 días, las células lavadas fueron rascadas de las placas y centrifugadas como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 10. El granulado celular (aproximadamente 1 g) fue suspendido en 50 mM de tris HCl, pH 7.5 y prensado (2x) en una prensa francesa a 1500 psi. La suspensión resultante fue centrifugada a 2500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante helado fue diluido con 2,5 ml de 0,1 M tampón de carbonato sódico 11 enfriado en hielo y la solución agitada en hielo durante 1 hora. El ultracentrifugado fue luego realizado a 115.000 x g durante 1 a 1,5 horas a 4°C, produciendo un granulado 1 y sobrenadante 1. El granulado de membrana 1 fue resuspendido en 50 mM de Tris HCl, pH 7,5 y el granulado fue recogido después del centrifugado durante 20 minutos adicionales a 115.000 x g, produciendo un granulado 2 y sobrenadante 2. El granulado 2 fue solubilizado en 50 mM de Tris HCl, pH 7.5 conteniendo 10 mM de imidazol, 0,5 mM de PMSF, 20% de glicerol, y 1% de dodecil Maltósido (DDM) o 33 mM de octil glucósido (OG) durante 30 minutos a 4°C. La suspensión fue luego centrifugada para 10.000 g durante 30 minutos. El granulado y sobrenadante obtenidos fueron marcados como Granulado 3 y sobrenadante 3.

El contenido de proteína fue determinado controlando la absorbencia de la proteína a 280 nm. La concentración de proteína en la muestra de DDM fue 0,93 mg/ml, mientras que en la muestra de OG se obtuvo 0,07 mg/ml de proteína. La proteína fue dializada contra 10 mM de tampón PBS, pH 6.8, conteniendo 1 mM de ZnCl₂, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MnCl₂, y 1 mM de MgSO₄ durante 1 a 2 horas contra tres cambios de tampón.

La proteína fue marcada con colorante de succinilantranilato (azul) amino reactivo DDM (0,49 mg de colorante) y OG (0,03 mg de colorante) según el mismo protocolo usado en el marcado extracelular anteriormente descrito para el Ejemplo 12. La reacción de parada del marcado (adición de hidrocloreuro de hidroxilamina) no fue usada en este caso, para evitar la dilución de la proteína. La mezcla fue dializada durante toda la noche contra 10 mM de tampón PBS, pH 6.8 conteniendo 0.01 mM de ZnCl₂, 0.01 mM de CaCl₂, 0.01 mM de MnCl₂ y 0.01 mM de MnSO₄, contra tres cambios de tampón.

ES 2 318 266 T3

Ejemplo 14

Preparación de mezcla marcada aleatoria de seis proteínas

5 Las proteínas siguientes, Concanavalina A (400 μg), lectina de *Lens culinaris* (390 μg), lectina de *Pisum sativum* (300 μg), lectina de *Wisteria floribunda* (260 μg), albúmina de suero bovino 470 μg , y gliceraldehído-3-fosfato-des-hidrogenasa, (450 μg), fueron solubilizadas en 10 mM de PBS aumentado con 1 mM de CaCl_2 (500 μl) al que se añadió 1 M de Na_2CO_3 (50 μl) para un pH final de 8.3. La mezcla de proteínas fue marcada con colorante Alexa 488 (Molecular Probes) según el protocolo del fabricante. Después de detener la reacción con 1,5 M de hidroxilamina (15 μl) el exceso de colorante fue eliminado mediante lavado (6 x 1 ml) de la mezcla de proteínas en un centricon YM-10 centrifugada a 5000 x g con 10 mM de PBS, pH 6.9, aumentada con 1 mM de CaCl_2 y 1 mM de MnCl_2 . La mezcla de proteínas fue lavada hasta el filtrado que ya no fue fluorescente.

15 Ejemplo 15

Selección en fase sólida de la biblioteca 1 con proteínas de miocitos marcadas

20 La biblioteca de ligandos 1 (200 mg), preparada como se describe para el Ejemplo 5, fue transferida a una jeringa ajustada con una válvula de parada y las perlas de ligando fueron lavadas durante 10 minutos (3x) con 10 mM de tampón fosfato, pH 6.8, suplementado con 0,15 M de NaCl, 1 mM de Ca^{2+} , 1 mM de Zn^{2+} , 1 mM de Mn^{2+} , 1 mM de Cu^{2+} , y 1 mM de Mg^{2+} (3 ml). Las perlas de ligando fueron tratadas con una solución al 1% de BSA durante 30 minutos, luego lavadas con tampón (1x). Una mezcla de proteínas de miocitos marcadas, incluyendo proteína inducida por PE (138 μl , 40 μg) y proteína basal (167 μl , 40 μg) obtenida como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 11, fue preparada en 1,2 ml de tampón, y añadida a la biblioteca de ligandos en la jeringa. Las proteínas y biblioteca de ligandos fueron incubadas a la temperatura ambiente durante 16 horas. La biblioteca fue luego lavada con tampón durante 5 minutos luego con agua durante 3 x 5 minutos. La biblioteca fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia y perlas fluorescentes brillantes rojas, verdes, y amarillas (amarillo indicativo de enlaces con colorantes rojo y verde; la mayoría de las perlas) estaban presentes, al igual que perlas no marcadas. Las perlas fluorescentes fueron separadas y retenidas para análisis.

Ejemplo 16

35 *Selección en fase sólida de bibliotecas con proteínas de membrana marcadas a partir de E. coli*

La biblioteca de ligandos 2 (200 mg) preparada como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 6, fue lavada en una columna de 2 ml (3x10 minutos) con 10 mM de tampón PBS, pH 6.8 conteniendo 1 mM de ZnCl_2 , 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MnCl_2 , y 1 mM de MgSO_4 . A la biblioteca lavada fue añadida una solución de BSA al 1% (600 μl), y la BSA incubada con la biblioteca durante 30 minutos para evitar enlaces no específicos. La biblioteca de ligandos fue luego lavada, y la proteína de membrana marcada de *E. Coli*, preparada como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 13, fue añadida (0,1 ml). La biblioteca de ligandos y mezcla de proteínas fue incubada durante toda la noche a la temperatura ambiente. Al día siguiente, las perlas fueron lavadas muy bien, 5 x 10 minutos con tampón, y luego con agua (3 x 5 minutos). La intensidad de fluorescencia de las perlas fue analizada y las perlas fueron clasificadas manualmente bajo un microscopio de fluorescencia para obtener 37 perlas fluorescentes que contenían pares de unión de ligando-proteína, obtenidos para un análisis adicional.

Ejemplo 17

50 *Selección de fase sólida de bibliotecas con mezcla marcada aleatoria de seis proteínas*

La biblioteca de ligandos 3 (150 mg) preparada como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 7, fue lavada en una jeringa de 5 ml (3x10 minutos) con 10 mM: tampón PBS, pH 6.8 conteniendo 1 mM de CaCl_2 y 1 mM de MnCl_2 . Una solución de BSA al 1% (600 μl) fue añadida a la biblioteca lavada e incubada con la biblioteca durante 30 minutos para evitar enlaces no específicos. La mezcla de seis proteínas preparada como se describe para el ejemplo 14, en 10 mM de tampón PBS, pH 6.8 conteniendo 1 mM de CaCl_2 y 1 mM de MnCl_2 fue luego añadida a la biblioteca de ligandos e incubada durante 3 horas y 15 minutos. Las perlas fueron luego muy bien lavadas (5 x 10 minutos) con tampón y luego agua (3 x 5 minutos). La intensidad de fluorescencia de las perlas fue analizada y las perlas fueron clasificadas manualmente en lotes bajo el microscopio de fluorescencia. 112 perlas fluorescentes conteniendo pares de unión de ligando-proteína fueron retenidos para el análisis.

65

Ejemplo 18

Clasificación de perlas de ligando-proteína marcadas con fluorescente diferencialmente

5 Las perlas de la biblioteca de ligandos fluorescentes conteniendo proteína unida obtenida como se describe en el ejemplo 15 fueron clasificadas usando un COPAS (250) NF Bead Sorter (Union Biometrica, Somerville, Mass.) equipado con una única emisión de fluorescencia. Las perlas que emitían fluorescencia de un sólo color contenían proteínas en un estado físico, p. ej. proteínas expresadas sólo en el estado hipertrófico inducido por PE (rojas) o proteínas expresadas sólo en el estado basal (verdes). Puesto que el instrumento mide una emisión de fluorescencia
10 cada vez, las perlas conteniendo un tipo de fluorescencia de color fueron clasificadas primero y luego las perlas fueron reclasificadas para emisiones del otro color de fluorescencia. La biblioteca fue primero clasificada de manera que todas las perlas conteniendo fluorescencia verde significativa, proteínas basales de miocitos saludables, fueron aisladas. Las perlas fueron luego reclasificadas para excluir aquellas conteniendo tanto fluorescencias verde como roja (perlas conteniendo proteínas de ambas células inducidas por PE y basales). Las perlas restantes, que contienen
15 sólo fluorescencia verde (proteínas de células basales), fueron clasificadas en perlas fluorescentes brillantes y menos brillantes, para dar una indicación bien de la resistencia de unión del ligando a una proteína particular o bien de la cantidad de proteína presente en la muestra que se une al ligando. Las perlas que no contenían ninguna fluorescencia verde fueron reclasificadas para aislarlas con la fluorescencia roja máxima, por ejemplo, perlas conteniendo los mejores ligandos que se unen a proteínas expresados sólo en células tratadas con PE (hipertróficas).

20 De forma alternativa, las perlas de la biblioteca de ligandos fluorescentes que contenían una proteína unida obtenida como se describe en los ejemplos 47, 48, 49 y 51 fueron clasificadas usando un COPAS (250) NF Bead Sorter (Union Biometrica, Somerville, Mass) equipado con un detector doble. Los colorantes de cianina usados en el procedimiento de marcado, es decir Cy 2 (emisión de longitud de onda 510 nm) y Cy 3 (emisión de longitud de onda 570
25 nm) fueron simultáneamente excitados a 514 nm. La ventana de selección de perlas fue luego ajustada de manera que todas las perlas conteniendo fluorescencia verde significativa y ninguna fluorescencia roja fueran aisladas. Las perlas no seleccionadas fueron luego reclasificadas para obtener perlas que contenían fluorescencia roja (proteínas de células basales). Las perlas fluorescentes verdes y rojas seleccionadas fueron luego clasificadas en perlas fluorescentes brillantes y menos brillantes para dar una indicación bien de la resistencia de unión del ligando a una proteína particular o bien de la cantidad de proteína presente en la muestra que se une al ligando.

Ejemplo 19

Identificación de ligandos fijados a perlas fluorescentes por MALDI-TOF MS

Los ligandos pueden ser completa o parcialmente identificados por MALDI TOF-MS si la biblioteca es o no sintetizada por síntesis en escala. Después de la clasificación automática o manual, las perlas de proteína/ligando marcadas fueron lavadas extensivamente con TFA acuoso al 0,1% para eliminar el fluido de la envoltura residual. El
40 ligando es dividido de la perla de resina dependiendo del tipo de enlazador usado. En el caso de que el ligando se fijara a la resina usando un enlazador fotolábil (bibliotecas 1, 2, 3 y 4), las perlas fueron transferidas a un disco de acero inoxidable e irradiadas con luz UV durante 1 a 2 horas. Fragmentos peptídicos (síntesis en escala) o compuestos únicos fueron extraídos de la perla con 0,5 μ l de CH₃CN, luego 0,5 μ l de CH₃CN/H₂O al 70%. Otros 0,5 μ l de CH₃CN/H₂O al 70% fueron añadidos a la perla, seguido inmediatamente por 0,2 μ l de matriz MALDI de ácido -ciano-4-hidroxicinámico: CHC). En el caso del enlazador Rink de ácido lábil (biblioteca 7), el compuesto fue liberado de
45 la perla por tratamiento con 95% de TFA o 30 min. La solución de TFA fue evaporada y los compuestos divididos fueron extraídos en 2 μ l de acetonitrilo al 70% + TFA al 0,1%. Esta mezcla fue luego transferida a un disco de acero inoxidable al que se añadió 0,4 μ l de matriz de CHC + TFA al 1,0%. 0,4 μ l adicionales de matriz de CHC + TFA al 1,0% fueron añadidos para completar la aplicación de la muestra.

50 En el caso del enlazador de base lábil (biblioteca 5), el compuesto fue liberado de la perla de resina por tratamiento con 0,2 μ l de 0,05-0,1M de NaOH durante 1 h. La solución fue neutralizada por la adición de un volumen equivalente de 0,2 μ l de 0,1 N de HCl. La mezcla conteniendo fragmentos peptídicos fue transferida a un disco de acero inoxidable al que se añadió 0,2 μ l de matriz MALDI (ácido-ciano-4-hidroxicinámico, CHC). La mezcla fue dejada vaporizarse
55 lentamente hasta sequedad bajo una lámpara.

Las muestras preparadas de esta manera fueron usadas para obtener espectros en el modo de reflectrón positivo de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo MALDI (Bruker Reflex III, Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania). Un análisis típico empleó 100-300 disparos de láser. Si la biblioteca de ligandos ha sido preparada por síntesis en escala
60 (bibliotecas 1-4), entonces la secuencia (por lo tanto identidad) del compuesto de ligando en la perla fue determinada usando el programa Mass. Diff. del instrumento automático que encuentra la diferencia de masas entre picos de masas con la masa de uno de los aminoácidos codificados genéticamente. En el caso de codificación (tal como el uso de marcas de codificación alifática) y bloques de construcción de aminoácidos innaturales, el programa Mass. Diff. fue modificado de modo que la diferencia de masas entre picos de masas fuera también correspondida con la diferencia
65 de masas prevista de las marcas y los aminoácidos innaturales. Para bibliotecas preparadas sin síntesis en escala (bibliotecas 5 y 7) los espectros fueron también adquiridos en el modo de reflectrón positivo de un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo MALDI (Bruker Reflex III, Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania). Un análisis típico empleó 200-300 disparos de láser. La posible identidad del ligando fue determinada (restringida) comparando la masa

ES 2 318 266 T3

registrada del ligando con las masas de todos los compuestos posibles formados en la biblioteca. Esta comparación se efectuó usando un programa informático creado internamente. La identidad precisa del ligando puede después ser confirmada usando fragmentación en MS como se describe en el ejemplo 41.

5 Ejemplo 20

Unión de proteínas de miocitos marcadas diferencialmente a ligandos identificados

10 Las perlas que contenían 24 ligandos diferentes específicos identificados como elementos específicos de un par de unión de proteína-ligando en los Ejemplos 15, 18, y 19, fueron colocadas en 24 pocillos de una placa de filtración “Multiwell” (placas Multiscreen DV, Millipore). Las perlas que contenían resina PEGA₄₀₀₀ más enlazador separador con componente sin ligandos fueron usadas como un control. La unión se efectuó por duplicado con ambas proteínas basales e inducidas por PE, obtenidas de miocitos y marcadas como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 11.
15 Las perlas fueron lavadas con agua de Millipore durante 3x5 minutos y luego con 10 mM de tampón PBS (anteriormente descrito para el Ejemplo 15) durante 3x5 minutos al vacío. La proteína inducida por PE (33 μ l) y proteína basal (33 μ l) fueron añadidas a cada pocillo respectivamente (10 μ g de PE y 8 μ g de proteína basal/pocillo). La placa fue cubierta con hoja de aluminio y dejada incubar a la temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente la solución que contenía proteína no unida fue eliminada de cada pocillo bajo succión y las perlas fueron lavadas con
20 agua de millipore y 10 mM de tampón PBS respectivamente durante 3x5 minutos al vacío. Las perlas fluorescentes (hits positivos) conteniendo complejos de unión de proteína-ligando fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia y los resultados fueron documentados.

25 Ejemplo 21

“Purificación de Afinidad”: unión de proteínas de miocitos no marcadas a ligandos identificados

30 Las proteínas específicas de miocitos que se unieron a los ligandos identificados fueron aisladas por purificación de afinidad. En tubos sin RNasa ni ADNsa, la proteína inducida por PE no marcada (32 μ l, 13,5 μ g) y la proteína basal no marcada (49,6 μ l, 10,8 μ g) fueron producidas, como se describe en el Ejemplo 11, y precipitadas con acetona (4 volúmenes) durante toda la noche. Los granulados fueron resuspendidos en agua de Millipore (130 μ l PE y 220 μ l basal). Seis ligandos de hits positivos inducidos por PE y basales, aislados como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 20, fueron elegidos y lavados como se ha indicado arriba. Para cada pocillo conteniendo ligandos inducidos
35 por PE, una solución de proteína inducida por PE no marcada de 7 μ l fue añadida. Para cada pocillo conteniendo ligandos basales, 8,2 μ l de solución de proteína basal no marcada fue añadida. Las mezclas fueron incubadas durante toda la noche a la temperatura ambiente, y al día siguiente los pocillos fueron lavados con agua de Millipore para eliminar la proteína no unida durante 3 x 5 minutos, luego con 10 mM de tampón PBS (como se describe para el ejemplo 15) durante 3 x 5 minutos al vacío.
40

Ejemplo 22

Unión de proteínas de membrana no marcadas de E. coli a ligandos identificados

45 Perlas conteniendo 40 ligandos diferentes específicos que se unen a proteínas de *E. coli*, los ligandos de unión aislados por el proceso descrito para el Ejemplo 16 e identificados como se describe para el ejemplo 19, fueron colocadas en 40 pocillos de una placa de filtración “Multiwell” (placas Multiscreen DV, Millipore). Las perlas de control conteniendo resina PEGA₄₀₀₀ más el separador y enlazador sin compuesto de ligando fueron usadas. El enlace
50 de proteínas no marcadas de *E. coli* se efectuó por duplicado. Las perlas de ligando fueron lavadas con agua de Millipore durante 3x5 minutos y luego con 10 mM de tampón PBS (como se describe para el ejemplo 15) durante 3 x 5 minutos al vacío. Proteína no marcada de *E. coli*, producida como se describe para el ejemplo 13; (400 μ g) fue añadida a cada pocillo e incubada a la temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, la solución no unida de proteína de cada pocillo fue eliminada bajo succión y las perlas fueron lavadas con agua de Millipore y
55 tampón respectivamente durante 3 x 5 minutos al vacío.

Ejemplo 23

Purificación de afinidad de la mezcla de seis proteínas

Cada uno de los ocho ligandos glicopéptidos y péptidos fijados a la resina PEGA₆₀₀₀ representativos de los hits positivos obtenidos de la selección de biblioteca como se describe para el Ejemplo 17, identificados y descritos por el Ejemplo 19, fueron transferidos a cada una de las ocho jeringas de 10 ml (4 ml de resina-ligando). La resina
65 de ligando fue lavada con 10 mM de tampón PBS, pH 6.8 conteniendo 1 mM de CaCl₂ y 1 mM de MnCl₂. Una mezcla de proteínas no marcadas, Glicerol-3-fosfato: BSA: Wisteria floribunda: *Lens culinaris*: *Pisatum sativum* en una proporción en peso 4:4:4:1:3:1 fue disuelta en 10 mM de tampón PBS, pH 6.8 conteniendo 1 mM de CaCl₂ y 1 mM de MnCl₂. La mezcla de proteínas (3,5 ml, aprox. 1,2 mg proteína) fue aplicada a cada columna de ligando y

ES 2 318 266 T3

dejada unirse durante toda la noche. La columna fue lavada con el mismo tampón hasta que la proteína dejara de ser eluída (Abs 280 nm). La proteína unida fue eluída de la columna usando 0,5M de manosa en 10 mM de tampón PBS, pH 8.0 conteniendo CaCl_2 y 1 mM de MnCl_2 (tampón filtrado para eliminar el CaOH_2 formado) para glicopéptidos conteniendo sólo manosa, 0,5 M N-acetilglucosamina en 10 CaOH_2 mM tampón PBS, pH 8.0 conteniendo CaCl_2 y 1 mM de MnCl_2 (tampón filtrado para eliminar el CaOH_2 formado) para glicopéptidos conteniendo sólo GlcNAc, y ambos tampones para glicopéptidos conteniendo tanto manosa como GlcNAc, o para péptidos no glicosilados. Las muestras fueron obtenidas en un volumen de aproximadamente 700 μl y congeladas para una identificación posterior de las proteínas.

10

Ejemplo 24

Identificación de proteínas de una mezcla de seis proteínas que se unen al ligando

15 La identidad de cada proteína eluída de las columnas de afinidad al ligando del Ejemplo 23 fue determinada por una combinación de electroforesis en gel y degradación de Edman. La electroforesis en gel se efectuó usando 10% geles Bis/tris NuPAGE bajo condiciones de reducción, usando tampón MOPS y luego MES. Las bandas proteicas fueron coloreadas usando coloración de plata SilverXpress (NuPAGE). Las proteínas individuales, al igual que la mezcla, fueron analizadas junto con las fracciones eluídas. La identidad de cada proteína se obtuvo por comparación de la posición de la banda desde la muestra eluída a aquella de cada una de las seis proteínas conocidas. Las proteínas eluídas fueron también identificadas por secuenciación N-terminal de los 10 primeros aminoácidos.

Ejemplo 25

25

Desnaturalización de la proteína antes de la digesta trípica

La proteína fue despejada de perlas que contenían “hits positivos” de unión de ligando-proteína aislados como se describe para los Ejemplos 21 (proteínas de miocitos) y 22 (proteínas de *E. coli*). El seccionamiento se efectuó de una manera similar para cada perla, usando métodos diferentes, incluyendo digestas enzimáticas con tripsina, Endoproteinasa Arg-C, y Endoproteinasa Lys-C, y seccionamiento químico con CNBr, para aumentar la certeza de que la proteína correcta fue identificada. El seccionamiento se efectuó en diferentes perlas o en perlas individuales en tubos, o en perlas individuales que se encontraban en un disco de acero inoxidable. En algunos casos, las proteínas fueron desnaturalizadas y el enlace bisulfuro dividido antes de la digesta trípica, de modo que la digestión podría durar hasta la finalización. En cualquier caso, resultados similares fueron obtenidos.

Una única perla que contenía un complejo de unión de proteína-ligando fue tratada con 10 M de guanidina HCl (15 μl), 50 mM de tampón bicarbonato de amonio, pH 7.8 (3.8 μl), y 20 mM de DTT (6.2 μl). La solución fue calentada a 60°C durante 45-60 minutos. El volumen de reacción total fue 25 μl . Después de la desnaturalización, la reacción se dejó enfriar y se añadieron 50 mM de tampón bicarbonato de amonio, pH 7.8 (200 μl) de modo que la concentración final de guanidina HCl fue 0.75 M. La digesta trípica en perla fue luego realizada como se describe abajo para el Ejemplo 26.

Ejemplo 26

Digesta trípica de perla individual

Una única perla conteniendo ligando y proteína unida desnaturalizada o no desnaturalizada fue transferida a una ribonucleasa y tubo de PCR sin ADNsa. La perla fue lavada con 15 μl de agua durante 15 minutos con agitación. El agua fue eliminado y la perla fue lavada con 15 μl de acetonitrilo al 100% en un agitador. La perla fue luego colocada en una speedvac hasta secarse completamente. La perla seca fue mezclada con 15 μl de DTT (10 mM en 0,1 M de bicarbonato de amonio) a 56°C durante 1 hora. Tras el enfriamiento el DTT fue eliminado y 50 mM de yodoacetamida fueron añadidos en 0.1 M de bicarbonato de amonio (15 μl). La mezcla fue incubada a oscuras durante 30 minutos a la temperatura ambiente. La yodoacetamida fue eliminada y la perla lavada con 30 μl de acetonitrilo al 100%. La perla fue secada en la speedvac hasta secarse.

A la perla seca se añadió tripsina en 50 mM de bicarbonato de amonio a una concentración de 12,5 ng/ μl . La muestra fue incubada a 37°C durante toda la noche. La solución fue secada y los péptidos divididos fueron extraídos en un tubo de Eppendorf con 0,4 μl de acetonitrilo al 70% + TFA al 0,1%, seguido de una mezcla de 0,4 μl de acetonitrilo y agua (2:1) + TFA al 0,1%, y luego 0,5 μl de TFA al 0,1%. Los extractos fueron combinados, y 0,2 μl de la mezcla anterior fueron transferidos a un disco de acero inoxidable al que se añadieron 0,2 μl de matriz CHC +TFA al 1,0%. En algunos casos, una gama de 0,1-1% de TFA fue usada también, puesto que el ácido fórmico al 1% a veces facilita mejores señales de la muestra durante MALDI-MS. La solución restante fue transferida a un tubo nuevo y almacenada a -20°C. De forma alternativa, la perla fue colocada sobre el disco de acero inoxidable tras el secado y se efectuó la extracción directamente en el disco de acero inoxidable. En ambos casos, se obtuvieron resultados similares.

ES 2 318 266 T3

La digesta trípica fue también realizada en 3-4 perlas en un tubo de Eppendorf de una manera similar a la que se describe para perlas individuales, anteriormente en este ejemplo. Se obtuvieron resultados similares. Las proteínas fueron identificadas como se describe más abajo para el Ejemplo 31.

5 Ejemplo 27

Digesta de endoproteinasa Asp-N en perla

10 La digestión proteolítica por la peptidil-Asp-metaloendopeptidasa se efectuó usando el protocolo descrito en Sturrock, *et al.* 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236:16-19, con modificaciones. Normalmente, después de que la proteína unida a la perla de ligando fuera sometida a reducción y la alquilación fuera realizada según el protocolo descrito en el método de digesta en perla trípica en el ejemplo 26, se añadieron 20 μ l de una solución conteniendo
15 10 μ g de peptidil-Asp-metaloendopeptidasa en 50 mM de tampón bicarbonato de amonio, pH 8.0. La reacción fue realizada durante 16 horas a 37°C. Los solventes fueron evaporados y los péptidos divididos fueron extraídos como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 26, y analizados como se describe abajo para el ejemplo 31.

20 Ejemplo 28

Digesta de endoproteinasa Lys-C en perla

Después de que la proteína unida a la perla de ligando fuera sometida a reducción y la alquilación fuera realizada según el protocolo descrito para el proceso de digesta en perla trípica para el Ejemplo 26, se añadió una solución de 20
25 μ l conteniendo 10 μ g de Endoproteinasa Lys-C (en 50 mM de tampón de bicarbonato de amonio, pH 8.0). La reacción fue realizada durante 24 horas a 37°C. Los solventes fueron evaporados y los péptidos divididos fueron extraídos como se describe para el ejemplo 26, y analizados como se describe abajo para el Ejemplo 31.

30 Ejemplo 29

Digesta de endoproteinasa Arg-C en perla

Después de que la proteína unida a la perla de ligando fuera sometida a reducción y la alquilación fuera realizada según el protocolo descrito para el proceso de digesta trípica en perla para el ejemplo 26, se añadió una solución de 20
35 μ l conteniendo 10 μ g de Endoproteinasa Arg-C (en 50 mM de tampón de bicarbonato de amonio, pH 8.0). La reacción fue realizada durante 16 horas a 37°C. Los solventes fueron evaporados y los péptidos divididos fueron extraídos como se describe para el ejemplo 26, y analizados como se describe abajo para el ejemplo 31.

40 Ejemplo 30

Seccionamiento con CNBr en perla

45 El seccionamiento con CNBr fue realizado según el protocolo descrito en Youngquist *et al.*, 1995, *J. Am Chem. Soc.*, 117:3900-3906. A una única perla de proteína-ligando en un tubo de Eppendorf de 500 μ l se añadieron 15 μ l de 20 mg/ml de CNBr en 0,1 N de HCl. La reacción fue dejada proceder a la temperatura ambiente a oscuras durante 14 horas. Las muestras fueron secadas en una speedvac y los péptidos divididos fueron extraídos como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 26, y se analizaron como se describe abajo para el ejemplo 31.

50

Ejemplo 31

Identificación de proteínas

55 Las proteínas aisladas que se unieron a ligandos específicos fueron identificadas usando la obtención de la huella genética de la masa de péptidos. Los espectros de masa fueron registrados en un espectrómetro de masas de tiempo-de-vuelo MALDI de Bruker Reflex III (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) accionado en el modo de reflectrón positivo usando extracción retardada. Las mediciones fueron realizadas usando los siguientes parámetros: potencia
60 83-84 V; lente 7.300. La cantidad de 200-300 disparos fue usada para cada espectro.

Los espectros fueron calibrados usando el péptido bradiquinina. En algunos casos, la calibración de la masa interna fue realizada usando un producto de autólisis de tripsina porcina. Las masas peptídicas fueron buscadas contra mapas de masa peptídica en la base de datos del centro nacional para la información biotecnológica (NCBI) usando los
65 motores de búsqueda siguientes encontrados en el sitio web (www.) para cada una de ellas:

ES 2 318 266 T3

MS-FIT (prospector.ucsf.edu/ucsfhtml/msfit.htm),

Profound (129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe), y

5 MASCOT (matrixscience.com).

Una búsqueda fue realizada mediante la base de datos bacteriana (*E. coli*) de NCBI y las bases de datos mamíferas para las proteínas aisladas de las muestras de *E. coli* y de miocitos, respectivamente, y las bases de datos mamíferas Swiss Prot y las bases de datos víricas Swiss Prot fueron buscadas para identificar las proteínas porcinas macrófagas y proteínas, respectivamente. Se estimó una gama de masa molecular de 0-250 K Da, permitiendo una exactitud de masa que varió de 0.1 Da (algunos casos 0.3 Da) para cada masa peptídica. Una amplia gama de μ l de 0-14 o 0-12 fue considerada para cada búsqueda. Si ninguna proteína coincidía, la ventana de masas se extendía. Seccionamientos enzimáticos parciales que permitan dos sitios de seccionamiento perdidos y modificación de cisteína por alquilación fueron considerados en los enfoques de búsqueda. Una proteína fue considerada identificada si los péptidos coincidentes cubrían al menos el 30% de la secuencia completa. Una correspondencia inferior al 30% fue considerada en algunos casos, si se obtuvieron picos prominentes. Normalmente, cuatro o más péptidos fueron usados para la identificación. En algunos ejemplos, proteínas hipotéticas o productos genéticos, tal como material bioquímico, bien ARN o proteína, calculados a partir de la expresión prevista de un gen y a los que se les puede asignar una función basándose en la homología secuencial, fueron identificados.

Ejemplo 32

25 *Resultados para Biblioteca de miocitos/ligando 1*

El uso de los procedimientos anteriormente descritos para los Ejemplos 1-5, la biblioteca de ligando 1 (conteniendo aminoácidos innaturales) como se describe para el Ejemplo 5, las proteínas de miocitos preparadas y marcadas como se describe para los Ejemplos 9 y 11, la selección como se describe para el Ejemplo 15, la clasificación e identificación como se describe para los Ejemplos 18 a 21, la digestión e identificación de proteínas como se describe para los Ejemplos 25-31, los pares de unión de proteína-ligando previamente desconocidos específicos diferenciales fueron identificados para las mezclas de proteínas de miocitos normales (basales) y las proteínas de miocitos tratadas con fenilefrina (PE) seleccionadas contra los ligandos de biblioteca 1. La fenilefrina fue usada para proporcionar un modelo *in vitro* de hipertrofia, por ejemplo, hipertrofia cardíaca (Arnott *et al.*, 1998, anal. Biochem., 1, 1-18).

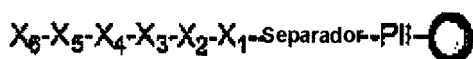
Los resultados mostrados en la Tabla 4 abajo demuestran que el proceso de la invención puede ser usado con éxito para identificar proteínas de membrana tales como canales iónicos, simporters, y receptores acoplados a la proteína G, junto con ligandos específicos que se unen a ellas, en una fase rápida. Éste es un resultado importante a consecuencia de este hecho de que al menos el 50% de todas las dianas de fármaco son proteínas de membrana. Proteínas de abundancia baja, es decir, proteínas con una preferencia codónica de <0,1, tales como factores de transcripción, proteínas quinasas, y fosfatasas (véase, por ejemplo, Gygi *et al.*, 2000, Curr. Opin. Biotechnol., 11 págs. 396-401), fueron también detectadas. La observación de que más de una proteína se une a un ligando implica que cada una de las proteínas identificadas se unen con el mismo ligando o, en algunos casos, las proteínas que trabajan juntas e interactúan entre sí (es decir, complejos de proteína; p. ej. Entradas 1 y 5) fueron aisladas. El tipo de biblioteca usado para la selección restringe el número y tipo de proteínas que puede ser identificado. En la práctica, diferentes tipos de bibliotecas son seleccionadas con la misma mezcla de proteínas. Los procedimientos descritos para la síntesis de la biblioteca, selección, clasificación, e identificación de ligandos y proteínas pueden ser fácilmente automatizados usando procedimientos conocidos para convertir estos procedimientos realmente en "alto rendimiento específico".

Las proteínas catalogadas en la Tabla 4 representan algunas proteínas que son más abundantes en un estado celular que en el otro. En este ejemplo, entradas 1-6 son proteínas que están principalmente presentes en células basales pero no en células hipertrofiadas, mientras que las Entradas 7-12 muestran la situación inversa. Ambos conjuntos de proteínas son en consecuencia importantes en la etiología de la hipertrofia cardíaca e identifican estos pares de proteína-ligando específicos para el uso en el desarrollo de una terapéutica nueva para una enfermedad, por ejemplo, la hipertrofia cardíaca.

Los ligandos identificados también proporcionan una herramienta importante para promover una comprensión de la enfermedad de la hipertrofia a nivel molecular. Algunas proteínas identificadas como enlazadoras de estos ligandos son útiles como marcadores biológicos para la hipertrofia cardíaca y enfermedad relacionada, ayudando al diagnóstico. La modalidad terapéutica tradicional para la mejora de la enfermedad cardíaca incluyendo la hipertrofia es principalmente a través del uso de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), β -bloqueadores, y moduladores del canal iónico. En la tabla 4, las entradas 5 y 11 son canales iónicos identificados como proteínas de unión, y el efecto de estos en la hipertrofia cardíaca puede ahora ser investigado usando los ligandos identificados. Además, puesto que los canales iónicos son importantes en una gama amplia de enfermedades (p. ej. epilepsia e hipertensión) los ligandos identificados proporcionan moldes diseñados para nuevos candidatos de fármacos para enfermedades existentes relacionadas con los canales iónicos identificados. Es conocido, por ejemplo, que una de las proteínas identificadas por este proceso (véase la tabla abajo), quinasa de cadena ligera de la miosina, es

importante en la etiología de la hipertrofia cardíaca (Aoki *et al.*, 2000, Nat. Med., 6, 183-188). A partir del análisis genómico de los genes afectados en modelos alternativos de hipertrofia cardíaca, los genes que fueron enriquecidos con hipertrofia inducida por carga y en corazones neonatales (estado hipertrófico) incluían genes que codificaban para la proteína fosfatasa 1 gamma, NADH-deshidrogenasa mitocondrial y la proteína ribosómica L3 60S (Johnatty *et al.*, 2000, J. Mol. Cell. Cardiol., 32, 805-825). Además, la expresión genética de la ATP sintasa mitocondrial en ratones fue regulada a la baja después de la inducción de la hipertrofia con isoprenalina (Friddle *et al.*, 2000, Proc. Nat. Acad. Sci., 97, 6745-6750). Estas proteínas o aquellas cercanamente relacionadas fueron identificadas como proteínas de unión específicas en este ejemplo, junto con ligandos de unión específicos (ver tabla 4, entradas 4, 7 y 11). Las proteínas de identidad o función desconocida en la hipertrofia cardíaca fueron también observadas (p. ej. proteínas SPTR, reguladores de receptores de la proteína G usados para señalar proteínas hipotéticas). Los ligandos asociados identificados para estas proteínas pueden utilizarse para dilucidar su importancia en la hipertrofia cardíaca.

La importancia de seis ligandos en la hipertrofia cardíaca fue investigada examinando el efecto del ligando en el aumento en la síntesis de proteínas (medida por aumento en la síntesis de ADN) en miocitos que han sido tratados con suero para inducir un estado hipertrófico (figura 3). Tres ligandos Phe-Gua-Pal-Tyr-Gua-Tyr [SEQ ID NO: 66], Abi-Thr-Hyp-Hyp-His-[SEQ ID NO: 68], y Pya-Gua-Abi-Asp-Abi-Tyr [SEC ID NO: 69] redujeron la extensión de la síntesis de ADN en miocitos normales e hipertrofiados.



X₁₋₆ = aminoácidos naturales e innaturales (3-12, 21-30)

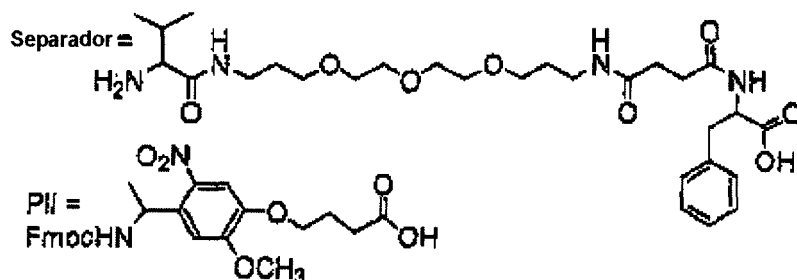


TABLA 4

Lista de ligandos y proteínas identificados para la biblioteca 1 y proteínas de miocitos

Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
Miocitos normales		
1	Pip-Pal-Pal-Phe-Pya-Pip [SEC ID NO: 7]	quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca ²⁺ /calmodulina (gi 284660) (LA, MA); regulador de la

ES 2 318 266 T3

		<p>variante de señalización de proteína G (RGS 14) (gi 2708808) componente de ATP sintasa (subunidad e) (gi 258788) (M);; citocromo P450 (gi 544086) (M); proteínas ribosómicas (60s) (gi 21426891); SPTR (gi 20837095) (M)</p>
2	<p>Py-a-Hyp-Hyp-Phe-Acm-Tyr [SEC ID NO: 8]</p>	<p>Troponina T (gi 547047); quinasa de cadena ligera de la miosina activada con Ca²⁺/calmodulina (gi 284660) (LA, MA); proteína quinasa dependiente de cGMP (gi 284660)(LA)</p>
3	<p>Py-a-Gua-Pip-Acc-Phe-Pip [SEC ID NO: 9]</p>	<p>NADH-deshidrogenasa; componente de unión de ATP (gi 18598538) (M); polipéptido pesado 9 de miosina (gi 13543854); proteínas asociadas a histona (gi 20893760) (M)</p>
4	<p>Phe-Aze-Gly-su-Gly-Aze [SEC ID NO: 10]</p>	<p>Proteínas hipotéticas (gi 20474763); proteínas ricas en cisteína y tirosina de función desconocida (gi17064178) (M); (ATP sintasa mitocondrial (gi 13386040); proteínas ribosómicas (60s L series)(gi 21426891)); SPTR (gi12842570).</p>
5	<p>Phe-Thr-Pya-Pip-Asp-His [SEC ID NO: 11]</p>	<p>(Canal de sodio (gi 18591322) (M); canal de cloruro (gi 6978663/4502867) (M)) troponina I (gi 1351298);; proteína de dedo de Zn (gi 18591322) (MA); SPTR (portador de soluto dependiente de Ca peroxisómico (putativo) (gi 12853685); receptor adrenérgico Beta-2 (gi 12699028)</p>
6	<p>Phe-Ppy-Acc-Ala-Ppy-Hpy [SEC ID NO: 12]</p>	<p>Proteínas hipotéticas; troponina T gi 547047;; (fosfolipasa C (MA);</p>

ES 2 318 266 T3

		transferasa de acil esterol fosfatidicolina (400167;LCAT-PIG 9)).
5	7	Phe-Thr-Tyr-Phe-Ala-Lys [SEC ID NO: 13];
10		Proteína serina/treonina quinasa (gi 5730055); anhidrasa carbónica VII (gi10304383).
15	8	His-Tyr-Pip-Thr-Acm-Abi [SEC ID NO: 14];
20		complejo P27 ciclina A-CDK2 de cadena C: (Ciclina A?) (gi2392395); proteína Hipotética XP_154035.
25	9	Tyr-Pip-Thr-Acm-Aze-His [SEC ID NO: 15];
30		N4-(β-glucosaminil-L-asparaginasa; (gi7435941); elemento II de subfamilia A de 4 dominios de expansión de membrana (gi7435941).
35	10	Phe-Phe-Phe-Pip-Aze-Gua [SEC ID NO: 16];
40		Fosfatidil transferasa de acil esterol colina (400167; LCAT-PIG 9).
45	11	Phe-Gua-Asp-Abi-His-Aze [SEC ID NO: 17];
50		Proteína hipotética XP_043250 (gi 14773490)
55	Miocitos tratados con fenilefrina (Hipertróficos)	
60	12	Phe-Abi-Pal-Hyp-Thr-Hyp [SEC ID NO: 65]
65		Proteína asociada con dedos de zinc gi 20304091; proteínas ribosómicas 40S Serie L (gi 206736/133023);
	13	Phe-Gua-Pal-Tyr-Gua-Tyr [SEC ID NO: 66]
		Glucosa-6-fosfatasa (gi 6679893/15488608); succinato deshidrogenasa; proteína de interacción con ARL (gi 4927202) (M); SPTR (gi 12834839) (M), proteína de unión a ácidos nucleicos.
	14	Pal-Abi-Gly-Gly-Abi-His [SEC ID NO: 67]
		Proteína ribosómica (60s + 40s) (gi 20875941/6677773 y gi 20846353); receptor de lipoproteína de baja densidad (gi 20846353).
	15	Abi-Thr-Hyp-Hyp-His- [SEC ID NO: 68]
		Fosfofructoquinasa (gi 7331123); Proteína de unión de selenio (gi 8848341/6677907); (proteína quinasa

ES 2 318 266 T3

		rica en arginina de serina (LA); guanilato quinasa (gi 20986250) (LA), (M); SPTR (gi 12842823) (M , proteína de interacción con actina.
16	Pya-Gua-Abi-Asp-Abi-Tyr [SEC ID NO: 69]	SPTR (gi 20869775) (M); proteínas ribosómicas (60s) (gi 20875941/6677773); (canal de calcio (gi 3202010) (M); isoforma de proteína de canal Slo (gi 3644046) (M); canal activado con calcio de conductancia de potasio (gi 6754436,NP 034740) (M);; regulador de señalización 8 de proteína G (gi 9507049).
17	Abi-Phe-Abi-Phe-Che-Tyr [SEC ID NO: 18]	Catepsina E (gi 4503145); proteínas ribosómicas (60s Serie L) (gi 20826861).
18	Pal-Gly-Abi-Hyp-Pya-Trp [SEC ID NO: 56];	NAS putativa sin clasificar (gi 12861084); proteína con dedos de Zn 64 Putativa (gi 12849329).
19	Lys-Met-Hyp-Trp-Tyr- Gua [SEC ID NO: 57];	Glicoproteina de superficie celular (gi 23603627); proteína Hipotética (XP- 179829; gi 14720727).
20	Phe-Asp-Trp-Gua-Thr- Gua [SEC ID NO: 58];	Receptor nuclear huérfano similar a hsp40 (NRID 26166582).
<p>En la tabla arriba,</p> <p>Abi = ácido 3-amino-3-(bifenil)-propanoico; Acc = 3-Amino-carboximetil-caprolactamo;</p> <p>Aze = ácido L-Azetina-2-carboxílico;</p> <p>ARL = factor tipo ribosilación de ADP;</p> <p>Che = ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico;</p> <p>Gua = 4-S-(Di-Boc-Guanidino)-L-Prolina; Hip = L-hidroxirolina-OH;</p> <p>Pal = L-Dapa(Palmitoil)-OH;</p> <p>Pil = ácido 4-Fenil-Piperidina-4-carboxílico; Ppi = ácido 5-Fenil-Pirrolidina-2-carboxílico;</p>		

Pya = L-3-PiridilAla-OH;

SPTR = proteínas transportadoras de membrana hipotética;

5

10 Complejos de proteína posibles, familias de proteínas o proteínas que trabajan cercanamente juntos están incluidos entre paréntesis. El círculo grande relleno representa una perla de resina. Las letras entre paréntesis tienen la siguiente designación: LA: proteínas de baja abundancia, M: proteína es una de transmembrana o parcialmente incluida en ella. MA: la proteína está unida con una membrana.

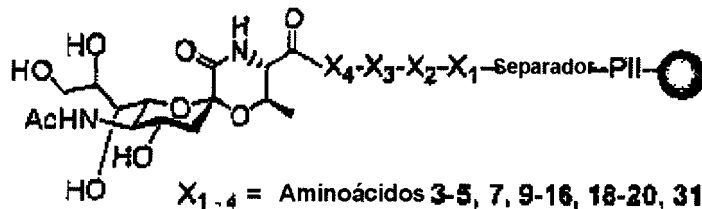
15 Ejemplo 33

15

Resultados para proteína/ligando de *E. coli* y biblioteca 2

20 Usando los procesos y procedimientos descritos para los ejemplos arriba, la biblioteca 2 de lactamo de ácido siálico del Ejemplo 6, y proteínas de membrana de *E. coli* (es decir, extracto de proteína de *E. coli* que ha sido procesado para acceder principalmente a las proteínas de membrana internas y externas) producidas, aisladas y marcadas como se describe en los Ejemplos 10 y 13 fueron mezcladas entre sí y los pares de unión a proteínas y ligandos específicos fijados a perlas de resina fueron aislados como se describe en el Ejemplo 16. La identidad de los ligandos fue establecida por MS como se describe en el Ejemplo 19, los ligandos fueron resintetizados en fase sólida como en el Ejemplo 8 y los compañeros de unión a proteínas fueron aislados en la perla de resina como se detalla en el Ejemplo 22. La identidad de los compañeros de unión a proteínas para cada ligando fue determinada desnaturalizando primero la proteína unida a la perla como en el Ejemplo 25, seguido de una digesta trípica de una o varias perlas como se describe en el Ejemplo 26 y los péptidos resultantes fueron usados para buscar bases de datos para la identidad de las proteínas como se describe en el Ejemplo 31. De los 37 ligandos aislados, 34 fueron concluyentemente identificados y usados para el aislamiento e identificación de las proteínas unidas. Los pares específicos identificados hasta el momento están mostrados en la tabla 5 abajo, donde T(Sa) = lactamo treonina de ácido siálico (véase tabla 2 para estructuras de ligando específicas). Las letras entre paréntesis tienen la designación siguiente: LA: proteínas de baja abundancia, M: la proteína está localizada bien en la membrana interna o externa y puede ser una de transmembrana o parcialmente incluida en ella, P: proteínas localizadas principalmente en el espacio periplásmico.

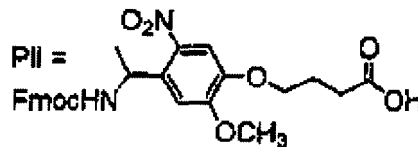
35



45

Separador = -GPPFPF.

50



60

65

ES 2 318 266 T3

TABLA 5

Lista de ligandos y proteínas identificados para la biblioteca 2 y proteínas de membrana de E. coli

Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
1	T(Sa)-F-N-H-S [SEC ID NO: 19]	Fosfato acetil transferasa (gi 1799680); proteína de choque ácido (gi 1742632); proteína C de biosíntesis de la molibdopterina (gi 15800534).
2	T(Sa)-F-A-L-V [SEC ID NO: 20]	chaperona DnaK (dnak_E.coli), hidrolasa putativa (yhaG_E.coli) transposasa (gi 158316821); peroxidasa de citocromo C (yhjA_E.coli).
3	T(Sa)-F-G-I-W [SEC ID NO: 21]	histidina sintetasa (gi 15803037), aspartato carbamoil transferasa (pyrI_E. coli), proteína de transporte de permeasa putativa (b0831_E.co) (M); proteína hipotética Orf (yids_E.coli).
4	T(Sa)-F-G-I-M [SEC ID NO: 22]	Regulador transcripcional de la transposasa (gi 18265863) (LA), GroEL (GroEL_E.coli), proteína implicada en el sistema de transporte

ES 2 318 266 T3

		de taurina (tauC_E.coli) (M).	
5	T(Sa)-G-V-F-L [SEC ID NO: 23]	Lipoproteína de unión hemo (gi 4062402/40624079) (M), regulador para D-glucarato, D-glicerato y D-galactarato (gi 158294209), glutamina ARNt sintetasa (gi146168).	
10			
15	6	T(Sa)-Y-S-M-P [SEC ID NO: 24]	Biotina sintetasa (gi 145425), deshidrogenasa de uDP-glucosa (ugd_E.coli), proteína tirosina quinasa (gi 20140365) (LA), proteínas de complejo de ácido graso oxidasa (gi 145900).
20			
25	7	T(Sa)-L-S-W-W [SEC ID NO: 25]	7-alfa-hidroxiesteriode deshidrogenasa dependiente de NAD (gi 15802033), homocisteína transferasa, nitrato reductasa (P), lactato deshidrogenasa dld_E.coli, citrato sintetasa (CISY_E.coli).
30			
35	8	T(Sa)-H-W-H-I [SEC ID NO: 26]	Manosa-1-fosfato guanil transferasa (gi 3243143/ 324314), isopropil malato deshidrogenasa (guaB_E.coli) (M).
40			
45	9	T(Sa)-H-W-V-V [SEC ID NO: 27]	Aspartato descarboxilasa dependiente de piruvoil (gi 3212459), colicina E2. (gi809671/809683), histidina quinasa (parte pertenece a narQ_E.coli)(M).
50			
55	10	T(Sa)-H-L-G-Y [SEC ID NO: 28]	Proteína implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos (gi 16131496) (M), fosfomanosa isomerasa (gi147164), proteína de tipo citocromo C (gi 15802755), proteína TrwC (TrwC_E.coli).
60			
65			

ES 2 318 266 T3

5	11	T(Sa)-I-Y-L-F [SEC ID NO: 29]	Subunidad b de sector Fo de ATP sintetasa unida a la membrana (atpF_E.coli) (M), ATP hidrolasa (gi 1407605).
10	12	T(Sa)-F-G-L-M [SEC ID NO: 30]	Hemolisina C (gi7416115; gi 7438629), sistema de transporte de potasio de alta afinidad (kdpC_E.coli) (M), quinona oxidorreductasa (qor_E.coli) (M), NA(D)PH oxidorreductasa dependiente de ferredoxina (fpr_E.coli) (M).
15	13	T(Sa)-W-V-N-M [SEC ID NO: 31]	Transposasa (gi 161295379), proteína de membrana interna para fijación en el fago (pspA_E.coli) (M).
20	14	T(Sa)-M-V-N-W [SEC ID NO: 32]	Helicasa dependiente de ATP (gi 2507332/16128141), mob C (gi 78702); proteína hipotética Orf (yciL_E.coli); proteína Tral (Tri6_E.coli); transposasa putativa (gi 16930740).
25	15	T(Sa)-H-I-G-Y [SEC ID NO: 33]	Subunidad fimbrial (gi 2125931), piruvato quinasa de membrana externa (gi16129807/15831818) (LA, M)
30	16	T(Sa)-L-Y-L-F [SEC ID NO: 34]	Precursor de proteína fimbrial (gi120422), fosfatasa alcalina (gi581186) (P), citocromo, componente de ATP sensible al zinc (cydD_E.coli) (P), aldolasa putativa.
35	17	T(Sa)-H-W-H-L [SEC ID NO: 35]	Corismato mutasa (gi 1800006), xantina deshidrogenasa (gi 157999), carbamoil fosfato sintetasa (carB_E.coli); glutamato sintasa
40			
45			
50			
55			
60			
65			

ES 2 318 266 T3

		(NaDPH) (gi 2121143).
5	18	T(Sa)-F-V-W-H [SEC ID NO: 36]
10		NADH deshidrogenasa (gi 1799644) (M), proteína implicada en la biosíntesis flagelar y componente de conmutación motriz (gi1580237)(M).
15	19	T(Sa)-Y-G-A-M [SEC ID NO: 59]
20		Proteína de unión de lisina-arginina-ornitina (argT_E.coli) (P), componente de unión de ATP de proteína de transporte de glicina-betaína-prolina (gi 16130591)(P).
25	20	T(Sa)-L-Y-I-F [SEC ID NO: 37]
30		Colicina (gi 809683), proteína de membrana hipotética (yhiU_E.coli) (M) lipoproteína de membrana externa (blc_E.coli) (M).
35	21	T(Sa)-S-V-W-F [SEC ID NO: 60]
40		Acetil Coa carboxilasa: subunidad beta (gi 146364); citocromo b (cibC_E.coli), fosfato acetil transferasa (gi 1073573), ureasa: subunidad beta (gi 418161).
45	22	T(Sa)-H-Y-F-F [SEC ID NO: 61]
50		Proteína de transporte de molibdeno (gi1709069), subunidad C de glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (gi 146179), proteína de división celular (ftsN_E.coli).
55	23	T(Sa)-I-Y-Y-F [SEC ID NO: 62]
60		Transposasa (gi10955467); serina ARNt sintetasa (gi15830232); Metilasa (gi1709155); Coenzima A transferasa (gi1613082); proteína de membrana TraD (TraD_E.coli).
65	24	T(Sa)-Q-P-G-M [SEC ID NO: 63]
		Helicasa dependiente de ATP: Homólogo de hrpA (NCBIBAA15034); precursor ydcP de proteasa putativo (NCBI P76104).

25	T(Sa)-G-P-H-G [SEC ID NO: 64]	Uroporfirinógeno descarboxilasa (hemE_E.coli); proteína J de exportación putativa para ruta secretora general (yheJ_E.coli).
----	-------------------------------	--

Los resultados del ejemplo 33 mostrados en la tabla 5 demuestran que el proceso de la invención puede ser usado con éxito para identificar proteínas de la membrana y ligandos de unión específica en una fase rápida. Este es un resultado importante en vista de que al menos el 50% de todas las dianas de fármaco son proteínas de membrana. Las proteínas identificadas fueron proteínas de membrana internas y externas al igual que proteínas del espacio periplásmico y algunas del citosol.

Proteínas con una gama amplia de funciones, incluyendo transporte (p. ej. proteína implicada en el sistema de transporte de taurina), síntesis de proteína (transposasa y chaperona DnaK), metabolismo (corismato mutasa, citrato sintetasa), y biosíntesis del lipopolisacárido (proteína implicada en la biosíntesis del lipopolisacárido) fueron identificadas al igual que proteínas con una función todavía desconocida. El tipo de biblioteca usado restringe el número y tipo de proteínas que puede ser identificado. En la práctica, diferentes tipos de bibliotecas son seleccionados con la misma mezcla de proteína. Para tipos de células más complejos, donde, por ejemplo, millares de proteínas serán aislados, los procesos descritos pueden ser fácilmente automatizados, mediante métodos conocidos.

De las proteínas identificadas en este análisis, una es una diana probada para fármacos antibacterianos. La proteína ribosómica 50 S (tabla 5, entrada 13) es una diana de cloranfenicol y antibióticos macrólidos que bloquean la síntesis de la proteína bacteriana (véase, por ejemplo, sección 13: Infectious Disorders, Capítulo 153: Antibacterial Drugs, En: The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, M.H. Beers y R Markow (Eds), 17ª ed. 1999, Merck & Co). A consecuencia de la creciente resistencia bacteriana, hay una urgente necesidad de desarrollar antimicrobianos alternativos. Los antibióticos aprobados actuales focalizan 15 enzimas bacterianas y complejos macromoleculares (Strohl, W.R. (Ed): Biotechnology of antibiotics. Marcel Dekker, New York, 1997) en la región de biosíntesis de la pared celular, permeabilidad de la membrana celular, síntesis de proteína y replicación de ADN y síntesis de reparación (sección 13: Infectious Disorders, capítulo 153: "Antibacterial drugs", M.H. Beers and R. Markow (Eds), 17ª ed. 1999, Merck & Co.). En la presente invención, todas las proteínas identificadas en este ejemplo son dianas de fármacos putativas para antibacterianos. Esta premisa puede ser rápidamente evaluada en ensayos biológicos usando el compañero de unión de ligandos correspondientes que han sido también identificados. Así, todos los ligandos de unión identificados son agentes antibacterianos putativos, a condición de que estos interactúen selectivamente con proteínas bacterianas en el huésped o interactúen con una proteína bacteriana para la que no hay ningún equivalente humano.

En la era de la genómica, donde los genomas completos de diferentes patógenos son conocidos, diferentes dianas antibacterianas putativas nuevas han sido postuladas después de un análisis de secuencias intensivo. Algunas de estas dianas de fármacos antibacterianas recién reconocidas también han sido identificadas en este ejemplo y están mencionadas más abajo. La histidina quinasa (tabla 5, entrada 17) ha sido reconocida recientemente como una proteína diana para agentes antimicrobianos. (Matsushita *et al.*, 2002, Bioorg. Med. Chem., 10, 855-67; Deschenes *et al.*, 1999, Antimicrob. Agents Chemother., 43: 1700-03; Lyon *et al.*, 2000, Proc. Nat. Acad. Sci., 97, 1330-35). Una empresa constituida en Filadelfia, Chaperone Technologies (ver el sitio web: chaperonetechnologies.com/technology.htm), se basa en el desarrollo de fármacos antimicrobianos de compuestos que se unen con la chaperona DnaK (tabla 5, entrada 10). La empresa farmacéutica anterior SmitKline Beecham ha desarrollado métodos de uso de la subunidad alfa de la nitrato reductasa (tabla 5, entrada 15) para seleccionar antibacterianos eficaces contra *S. aureus* (Molecular Targets, 2001, 12, pp. 13; sitio web: experts.co.uk). La fosfomanosa isomerasa (tabla 5, entrada 18) es una enzima esencial en la síntesis de GDP-manosa que es utilizada en la síntesis de lipopolisacáridos, glicoproteínas, y exopolisacáridos (Wills *et al.*, 2000, Emerging Therapeutic Targets, 4(3): 1-30). Esta enzima ha sido reconocida como una diana de fármaco potencial para antifúngicas y en *Candida*, ha sido inhibida por sulfadiaceno (Wells *et al.*, 1996, Biochemistry, 34, pp. 7896-7903). Todas las aminoacil ARNt sintetasas son dianas putativas para agentes antibacterianos. De hecho, el antibiótico aprobado, mupirocina, inhibe la enzima isoleucina ARNt sintetasa, (sección 13: Infectious Disorders, capítulo 153: Antibacterial Drugs, en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, M.H. Beers y R. Markow (Eds), 17ª ed. 1999, Merck & Co.) para el que el análogo de glutamina ha sido identificado por este ejemplo de la invención (tabla 5, entrada 13).

A partir del análisis microbiano genómico, diferentes clases de proteínas, tales como proteínas de la membrana externa, factores de interacción con el huésped, peneasas, enzimas metabólicas, replicación y transcripción de ADN y aparato de reparación, han sido identificadas como dianas de fármaco antibacterianas putativas (M. Y. Galperin y E.V. Koonin, 1999, Curr. Opin. Biotechnol., 10, 571-578) y están entre las proteínas de unión detectadas por este ejemplo de la invención y están mencionadas más abajo. Un análisis de los factores de virulencia, dianas de fármaco potenciales en *H. pylori* y *N. meningitidis*, demostró que la carbamoil fosfato sintetasa (tabla 5, entrada 25), NADH-ubiquinona oxidoreductasa (véase Tabla 5, entrada 20), proteína Fimbrial (tabla 5, entradas 23 y 24), proteína de bio-

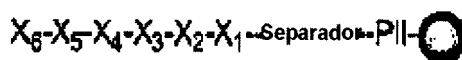
síntesis del LPS (tabla 5, entrada 18), y helicasa dependiente de ATP (tabla 5, entrada 22) fueron dianas prometedoras (Junaid Gamieldeen, Ph.D Dissertation, Capítulo 4: "Novel Approaches for the Identification of Virulence Genes and Drug Targets in Pathogenic Bacteria", 2001, University of Western Cape, Sudáfrica). Además, el análisis de la desactivación de genes seleccionados en *H. pylori* mostró que la desactivación del gen para la carbamoil fosfato sintetasa resultó en una eficiencia de la colonización disminuida mientras que el gen que codificaba para la NADH-ubiquinona oxidorreductasa demostró ser esencial para la supervivencia de las bacterias. Finalmente, las enzimas en la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos que están ausentes en los seres humanos producen dianas de fármaco atractivas. Una tal enzima, la corismato mutasa (tabla 5, entrada 25) ha sido identificada por este ejemplo de la invención. Otras proteínas identificadas por este proceso tienen funciones diversas que pueden ser esenciales para la supervivencia de las bacterias, o funciones todavía desconocidas. La función de estas proteínas puede ser evaluada usando los ligandos identificados como un punto de partida.

Ejemplos 34

Resultados para mezcla de seis proteínas y biblioteca de ligandos 3

Usando los procesos y procedimientos descritos para los ejemplos anteriores, la biblioteca de glicopéptidos 3 del Ejemplo 7, y la mezcla de seis proteínas: Con A, lectina de *P. sativum*, lectina de *L. culinaris*, lectina de *W. floribunda*, Gliceraldehído 6 fosfato, y albúmina de suero bovino (BSA) marcada como se describe en el ejemplo 14 fueron mezcladas entre sí y los pares de unión de proteínas y ligandos específicos fijados a perlas de resina fueron aislados como se describe en el ejemplo 17. La identidad de los ligandos fue establecida por MS como se describe en el Ejemplo 19, los ligandos fueron resintetizados en fase sólida como en el ejemplo 8 y los compañeros de unión a proteínas aislados en la perla de resina como se detalla en el ejemplo 23. La identidad de los compañeros de unión a proteínas para cada ligando fue determinada por una combinación de electroforesis en gel y degradación de Edman como se describe en el ejemplo 24.

Los pares de proteína-ligando identificados están mostrados en la Tabla 6 abajo, donde ManS = manosa unida al grupo hidróxilo de Ser; ManN = amina de manosa unida al grupo carboxilo de la cadena lateral de Asp (*N*^α-manosilasparagina) y GlcNN = *N*-Acetilglucosamina unida al grupo carboxilo de la cadena lateral de Asp (*N*^α-*N*-Acetilglucosaminilasparagina) (véase tabla 2 para estructuras exactas). El círculo grande relleno representa una perla de resina.



X₁₋₆ = aminoácidos 3-12, 14-17, 19, 20, 31, 33-35 separador = -APRPPRA-

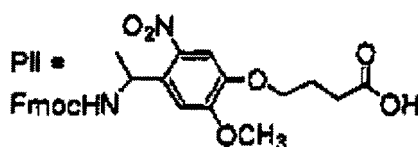


TABLA 6

Lista de ligandos y proteínas identificados para la biblioteca 3 y mezcla de seis proteínas

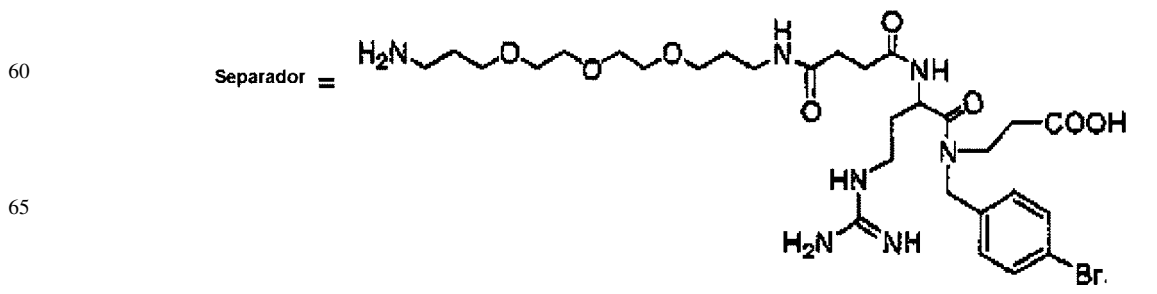
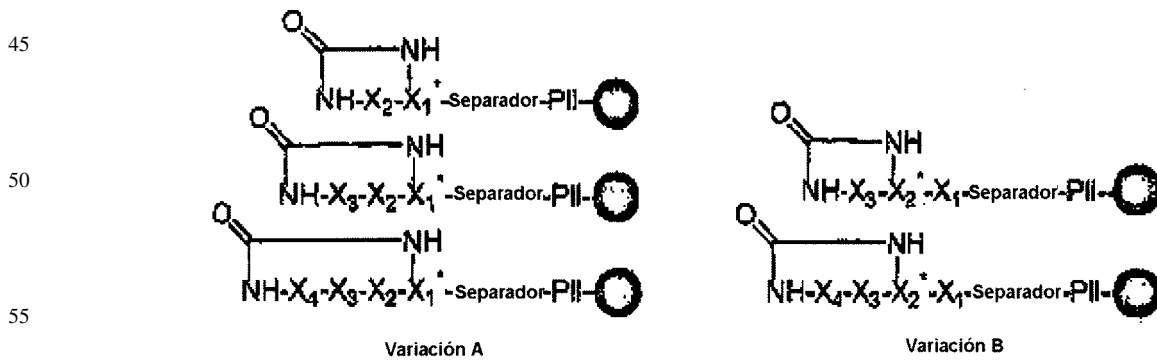
Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
1	ManS-Gly-ManS-Asp-Asn-Ala [SEC ID NO: 38]	Con A, lectina de <i>P. sativum</i>
2	ManS-Gly-GlcNN-Asn-ManS-Tyr [SEC ID NO: 39]	Con A, lectina de <i>P. sativum</i> , lectina de <i>L. culinaris</i>

3	ManN-Phe-Trp-Ser-Lys-His [SEC ID NO: 40]	Con A, lectina de <i>P. sativum</i>
4	GlcNN-Trp-Phe-Asp-Trp-pro [SEC ID NO: 41]	Con A
5	GlcNN-Val-GlcNN-His-ManS-Gly [SEC ID NO: 42]	Con A, lectina de <i>P. sativum</i>
6	ManN-ManS-ManN-Trp-Ser-Trp [SEC ID NO: 43]	Con A, lectina de <i>P. sativum</i> , lectina de <i>L. culinaris</i>
7	Gly-pro-Lys-Lys-Tyr-His [SEC ID NO: 44]	Con A, lectina de <i>P. sativum</i> , lectina de <i>L. culinaris</i>
8	His-Thr-Trp-Gly-Tyr-Trp [SEC ID NO: 45]	Con A

En este ejemplo, algunos ligandos y proteínas de unión identificadas coincidentes son glico-herramientas útiles para dilucidar los mecanismos moleculares de la unión de lectina-ligando y mimetismo molecular. Es interesante que GlcNN-Trp-Phe-Asp-Trp-Pro se una sólo a Con A y no a las otras lectinas, aunque éstas no presentan especificidad similar para un ligando conteniendo azúcar. Además, el ligando 8, que no contiene un residuo de azúcar, se une selectivamente a Con A, suministrando una herramienta para el estudio del mimetismo molecular en las interacciones lectina-ligando. Todos los ligandos identificados, cuando se fijan a resinas cromatográficas (p. ej. sefacril, sefarosa), son útiles para la purificación de afinidad de las tres lectinas usadas en el estudio (un poco selectivamente). Estos ligandos de unión identificados son también útiles para purificar nuevas lectinas específicas con manosa/glucosa que pueden ser usadas para la producción comercial a gran escala de proteínas que se unen específicamente a lectinas, incluyendo anticuerpos para el uso clínico y otras glicoproteínas.

Ejemplo 35

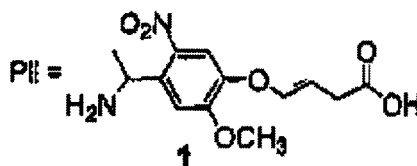
Síntesis de biblioteca 4: Ureas macrocíclicas



ES 2 318 266 T3

X* = 8, 39-41, 43

X₁₋₄ = aminoácidos naturales e innaturales (3-5, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 19-22, 24, 28, 45, 47, 73, 106, 128)



15 En una forma de realización, la biblioteca 4, mostrada arriba, fue preparada en resina PEGA₄₀₀₀ (2 g, 0,1 mmol/g; 500-700 μ m de perlas) usando el método de síntesis en escala, tal y como se describe anteriormente en St. Hilaire *et al.*, 1998, J. Am. Chem. Soc. 120, 13312-13320. La síntesis de variación A está mostrada en el esquema 12A, donde para péptidos X₂ X₁*. [SEC ID NO: 46], X₃ X₂ X₁*. [SEC ID NO: 47], y X₄ X₃ X₂ X₁. [SEC ID NO: 48], X₁* es elegido de los aminoácidos 8, 39-41, 43, y X₄ X₃ X₂ son cada uno independientemente elegidos de aminoácidos 3-5, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 19-22, 24, 28, 45, 47, 73, 106, 128, como se muestra en tablas 1; -3, y 9. La síntesis de variación B mostrada en el Esquema 12B se efectuó de forma similar, donde para péptidos X₃ X₂* X₁ [SEC ID NO: 49], y X₄X₃X₂*X₁ [SEC ID NO: 50], X₂ es elegida de aminoácidos 8, 39-41, 43, y cada uno de X₁, X₃, X₄ es elegido de aminoácidos ácidos 3-5, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 19-22, 24, 28, 45, 47, 73, 106, 128, como se muestra en las tablas 1-3, y 9. Ha sido mostrado que los compuestos que contienen urea cíclica y alifática son inhibidores de la quinasa Cdk4 (véase, por ejemplo; Dolle, 2002, J. Comb. Chem., 4: 369-418). En consecuencia está previsto que una biblioteca de ureas cíclicas peptídicas tales como la biblioteca 4 se enlace principalmente a quininas presentes en la mezcla de proteínas celulares usada para la selección. Puesto que ninguna quinasa particular está focalizada, la biblioteca no está diseñada basándose en los datos de función de actividad de la estructura. Los bloques de construcción usados son elegidos de forma arbitraria, y de una manera para presentar tantos otros grupos funcionales como fueran posibles en las cadenas laterales: incluyendo, por ejemplo, ácidos carboxílicos, aminas, indoles, piridinas, alifáticos, aromas, imidazoles, hidróxilos. Se espera que las proteínas que no son quininas también se unan con algunos elementos de la biblioteca. Los bloques de construcción usados están mostrados en las tablas 1-3 y 9 arriba.

30 PEGA₄₀₀₀ (500-700 μ m, 0.1 mmol/g, 2 g) fue lavada con 10% TFAIDCM y luego DCM. Para aumentar la carga de la resina, una mezcla de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0.6 mmol, 354 mg), TBTU (0.56 mmol, 180 mg) y NEM (1.2 mmol, 0.15 ml) en DMF (40 ml) fueron añadidas a las perlas después de permanecer durante 5 min. Después de la agitación durante toda la noche, el solvente fue drenado y las perlas fueron lavadas con 4xDMF y 4xDCM, luego tratadas con 2+18 min 20% piperidina/DMF y lavadas con 4xDMF y 4xDCM.

35 El enlazador fotolábil 1 (1.2 mmol, 620 mg), fue acoplado a la resina, bajo activación con TBTU (TBTU: 1.12 mmol, 363 mg, NEM (2.4 mmol, 0.3 ml en DMF (30 ml)) durante toda la noche, luego desprotegida por el 20% piperidina/DMF como se ha descrito anteriormente. Una molécula separadora formada por acoplamiento secuencial de Fmoc-N-BrBn- β -Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, y compuesto 2 después de la preactivación de TBTU fue luego añadida al enlazador. La molécula separadora fue usada para permitir la identificación de un ligando usando MALDI-TOF MS, puesto que el separador aumenta la masa de los fragmentos de ligando hasta más de 600 mu, más allá de los picos matriciales. El separador fue diseñado para tener pocas o ninguna interacción con las proteínas en la mezcla. Además, el separador contenía una marca isotópica (Br) para permitir una identificación fácil de los picos de ligando en un espectro de masa. Consecuentemente, después de la desprotección del enlazador, la resina anterior fue tratada con Fmoc-N-BrBn- β -Ala-OH (1.2 mmol, 576 mg), TBTU (1 mmol, 321 mg) y NEM (2,4 mmol, 0.3 ml) en DMF (20 ml) durante toda la noche, luego desprotegida por el 20% de piperidina/DMF como se ha descrito anteriormente. Después de la desprotección, Fmoc-Arg(Pmc)-OH (1,2 mmol, 800 mg) fue acoplado a la resina usando activación por TBTU (1 mmol, 321 mg) y NEM (2,4 mmol, 0,3 ml) en DMF (25 ml) durante toda la noche, luego desprotegido por 20% de piperidina/DMF como se ha descrito anteriormente. El compuesto 2 (1,2 mmol, 650 mg), fue luego acoplado a la resina, usando también activación con TBTU (TBTU (1,1 mmol, 353 mg) y NEM (2,4 mmol, 0,3 ml) en DMF (25 ml) durante toda la noche) luego desprotegido por el 20% de piperidina/DMF como se ha descrito anteriormente.

55 Las posiciones aleatorizadas de la biblioteca son generadas usando el enfoque de división y de mezcla descrito en Furka *et Al.*, 1991, Int. J. Peptide Protein Res., 37, 487-493 y Lam *et Al.*, 1991, Nature, 354, 82-84 en uno o más generadores de biblioteca de la columna múltiple de 20 pocillos hecha a medida (2,0 ml de capacidad). En la estrategia de la síntesis en escala, el 5 0/0 del oligómero de crecimiento es cubierto usando el análogo de aminoácido protegido con Boc del bloque de construcción con Fmoc. En consecuencia, una mezcla del aminoácido protegido con Fmoc y Boc (95% de Fmoc y 5% de Boc, 4 equivalentes) de soluciones de base son activadas con TBTU/NEM durante 6 minutos y luego añadidas a los pocillos. La biblioteca 4 contiene variaciones en la posición y tamaño de la urea cíclica formada y la variación posicional es designada A y B. En la Variación A, 1 g de la resina anterior fue dividida en un sintetizador de 20 pocillos. Cinco di-aminoácidos diferentes (8, 39-43) fueron acoplados a las perlas mediante el tratamiento con una mezcla de bloque de construcción de di-aminoácidos protegida con Fmoc (45 μ mol), bloque de construcción de di-aminoácidos protegido con Boc (5 μ mol), TBTU (16,1mg, 48 μ mol) y NEM (25 μ l, 200 μ mol) en DMF (0,5 ml) durante toda la noche. Después de la mezcla y desprotección del grupo de protección con Fmoc por tratamiento con 20% de piperidina en DMF durante 4 + 16 minutos. 20 bloques de construcción de aminoácidos

ES 2 318 266 T3

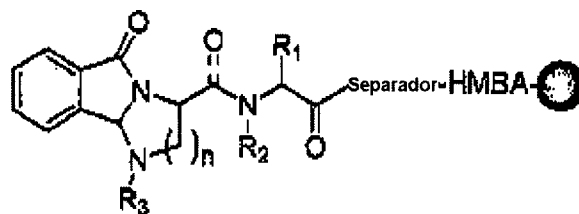
diferentes son acoplados sobre las perlas mediante el tratamiento con una mezcla del bloque de construcción de aminoácidos protegido con Fmoc (45 μmol), bloque de construcción de aminoácidos protegido con Boc (5 μmol), TBTU (15,4 mg, 48 μmol) y NEM (25 μl , 200 μmol) en DMF (0,5 ml) durante toda la noche. Después de la eliminación de la protección con Fmoc durante 2+18 min 20% piperidina/DMF, el 0,25% de las perlas fueron eliminadas. El resto fue acoplado con otro ciclo de 20 aminoácidos diferentes como se ha descrito anteriormente y desprotegido. El 5% de las perlas fueron eliminadas. El resto fue acoplado con otro ciclo de 20 aminoácidos diferentes y luego deprotegido.

En la Variación B, 1 g de la resina anterior fue puesta en un sintetizador de 20 pocillos. 20 bloques de construcción de aminoácidos diferentes son acoplados en las perlas mediante el tratamiento con una mezcla de bloque de construcción de aminoácidos protegida con Fmoc (45 μmol), bloque de construcción de aminoácidos protegido con Boc (5 μmol), TBTU (15,4 mg, 48 μmol) y NEM (25 μl , 200 μmol) en DMF (0,5 ml) durante toda la noche. Después de la mezcla y la desprotección del grupo de protección con Fmoc por tratamiento con el 20% de piperidina en DMF durante 4 + 16 minutos, 5 bloques de construcción di-aminoácidos diferentes son acoplados en las perlas mediante el tratamiento con una mezcla de bloque de construcción de di-aminoácidos protegidos con Fmoc (45 μmol), bloque de construcción de di-aminoácidos protegidos con Boc (5 μmol), TBTU (16.1mg, 48 μmol) y NEM (25 μl , 200 μmol) en DMF (0,5 ml) durante toda la noche. Después de la eliminación de la protección con Fmoc, las perlas fueron acopladas con otro ciclo de 20 aminoácidos diferentes y desprotegidas como se ha descrito anteriormente. El 5% de la resina fue eliminado y las perlas restantes fueron acopladas con otro ciclo de 20 aminoácidos diferentes y luego deprotegidas.

Todas las porciones de la resina en ambas variaciones A y B fueron combinadas y lavadas 6 veces con DCM. La amina N-terminal es luego tratada con carbonildiimidazol (CDI) (4 mmol, 650 mg) en DMF (40 ml) a la temperatura ambiente durante toda la noche. El grupo de protección con Boc fue eliminado por tratamiento con 0,5+5 min 10% de TFA/DCM y la amina resultante fue desprotonada con el 10% de NEM/DMF. Después del lavado con DMF, la ciclización del péptido fue efectuada por irradiación de microondas en DMF (100 ml) a 100°C durante 1 hr. La resina fue luego filtrada, lavada con 6xDCM, desprotegida con el 85% de TFA conteniendo el 2% de triisopropilsilano, 2,5% de EDT, 5% de tioanisol, 5% de agua durante 1-2.5 horas. Luego la resina es lavada con el 90% de ácido acético acuoso (4 x 5 minutos), DMF (2 x 2 minutos), 5% de DIPEA en DMF (2 x 2 minutos), DMF (4 x 2 minutos), CH_2Cl_2 (10 x 2 minutos), y finalmente metanol (5 x 2 minutos), antes de ser secados por liofilización durante toda la noche.

Ejemplo 36

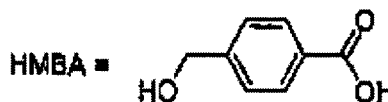
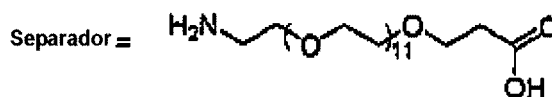
Síntesis de la biblioteca 5: compuestos tipo diazepina



R₁ = Cadenas laterales de varios aminoácidos naturales e innaturales (3, 4, 12, 13, 15, 20-24, 28, 29, 31, 47, 64, 66, 67, 71, 73, 74, 103-106, 128)

R₂ = Varios grupos acilo (117 - 126)

R₃ = Varios arilo y alquilo (103 - 116, 128)



La biblioteca 5, mostrada arriba, fue preparada en resina PEGA₄₀₀₀ como se muestra más abajo en los Esquemas 13A y 13B. La biblioteca fue diseñada para crear moldes tipo diazepina (cuando n = 3) y compuestos tipo isoindolona.

Muchas benzodiazepinas tienen actividades biológicas potentes (véase Pigeon *et al*, 1998, Tetrahedron, 54: 1497-1506). Compuestos tipo isoindolona, poseen propiedades antiinflamatorias, analgésicas, reductoras de la presión sanguínea, espasmolíticas, tranquilizantes y antitusivas. En cuanto a las bibliotecas, 1-4, ninguna proteína única particular fue prevista y los bloques de construcción usados fueron elegidos de forma arbitraria, pero de manera que tantos otros grupos funcionales como fueran posibles se presentaran en las cadenas laterales: p. ej. ácidos carboxílicos, aminas, indoles, piridinas, alifáticos, aromas, imidazoles, hidróxilos. Para R₁, los bloques de construcción usados fueron ele-

ES 2 318 266 T3

gidos juiciosamente, por ejemplo, de los compuestos 3-127 mostrados en las tablas 1-3 y 9 arriba. Los compuestos conteniendo aminas protegidas con Boc como una cadena lateral fueron inadecuados para la primera posición. R₂ comprende varios grupos acilo, mientras que R₃ es arilo o alquilo (ver Tabla 9).

5 Resina PEGA₄₀₀₀ (500-700 urn, 0,087 mmol/g, 1 g) fue lavada con el 10% de TFA/DCM y luego DCM. Una mezcla de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0.3 mmol, 180 mg), TBTU (0,295 mmol, 95 mg) y NEM (0,87 mmol, 0,1 ml) en DMF (18 ml) fue añadida a las perlas después de reposar durante 5 min. Después de la agitación durante 5 hr, el solvente fue drenado y las perlas fueron lavadas con 4 DMF y 4 DCM, luego tratadas con 2+18 min 20% de piperidina/DMF y lavadas con 4 DMF y 4 DCM. El enlazador fotolábil, 1 o enlazador de HMBA ((3 equivalentes) fue luego acoplado
10 bajo activación con TBTU. La biblioteca 5 no fue sintetizada por el método en escala. Una molécula separadora (O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol) facilitó la identificación de ligandos activos por MALDI-MS. Posiciones aleatorizadas de la biblioteca fueron generadas usando el enfoque de división y de mezcla descrito en Furka *et al.*, 1991, Int. J. Peptide Protein Res., 37, 487-493 y Lam *et al.*, 1991, Nature, 354, 82-84, en uno o más generadores de biblioteca de columna múltiple de 20 pocillos hecha a medida (2,0 ml de capacidad).

15 En la síntesis de la biblioteca 5, el separador (O-(N-Fmoc-2-aminoetil)-O-(2-carboxietil)-undecaetilenglicol (0.5 mmol, 420 mg) fue acoplado usando r usando activación con TBTU /NEM. Después del seccionamiento del grupo de protección con Fmoc por tratamiento con el 20% de piperidina en DMF durante 4 + 16 minutos, todas las perlas anteriores fueron puestas en un sintetizador de 20 pocillos. El 92% de estas perlas (Porción A) fue dividido en 19 pocillos y acoplado con 19 bloques de construcción de aminoácidos primarios protegidos con Fmoc mientras que el resto (Porción B) fue dividido en 7 pocillos y acoplado con 7 aminoácidos secundarios protegidos con Fmoc elegidos de 3, 4, 12, 13, 15, 20-24, 28, 29, 31, 47, 64, 66, 67, 71, 73, 74, 103-106 y 128 (3 equivalentes). Después del acoplamiento, la porción A y porción B fueron combinadas por separado y deprotegidas con el 20% de piperidina/DMF como se ha descrito anteriormente.

25 El 10% de porción A y el 33% de porción B fueron combinadas (Porción C) y divididas en dos mitades. Éstas fueron acopladas con Fmoc-Daba(Boc)-OH y Fmoc-Orn(Boc)-OH (100 μmol, TBTU 96 μmol, NEM 40 μl en 0,5 ml). El resto de la Porción A (Porción D) fue tratado con Fmoc-Dapa(Boc)-H (1,37 mmol, 560 mg) y NaCNBH₃ (650 mg) en MeOH:DMF: ortoformato de trietilo=1:1:1 (4,5 ml) durante toda la noche. El resto de la porción B (Porción E) fue tratado con Fmoc-Dapa(Boc)-H (137 μmol, 56 mg) y NaCNBH₃ (80 mg) en MeOH:DMF:ortoformato de trietilo=1:1:1 (0,5 ml) durante toda la noche.

30 La Porción D fue dividida en 10 pocillos y tratada con cloruro de ácido o complejo de ácido-TBTU (117-126) en TEA (0.2 ml) y DMF (3 ml) durante toda la noche.

35 Todas las perlas de Porciones C, D y E fueron combinadas y desprotegidas con el 20% de piperidina/DMF. Éstas fueron luego tratadas dos veces, 1 hr cada vez, con 3-bromoftaluro (53, 230 mg, 1 mmol) y trietilamina (1 ml) en DMF (10 ml). Después del lavado con 6xDCM, fueron tratadas con 2x 10% TFA/DCM.

40 Todas las perlas anteriores fueron divididas en 10 pocillos y tratadas con aldehído (100 μmol) y NaBH(OAc)₃ (1.6 mmol) en 2.5% de ácido acético en DCM (2 ml) durante toda la noche. Todas las perlas son lavadas con 6xDCM y 6 H₂O.

45 Ejemplo 38

Síntesis de Fmoc-N^α-(p-BrBn)-(β-alanina (102)

50 Fmoc-N^α-(p-BrBn)-β-alanina fue preparada como se muestra en el Esquema 16. β-alanina (3 g, 34,77 mmol) y p-bromobenzaldehído (6,43 g, 34,77 mmol) fueron agitadas en MeOH (150 ml) a la temperatura ambiente durante 1 hr. Cianoborohiduro de sodio (2,38 g, 35 mmol) fue añadido y la solución fue agitada a la temperatura ambiente durante 48 hr. Otra porción de cianoborohiduro de sodio (2,38 g, 35 mmol) fue añadida y la solución fue agitada a la temperatura ambiente durante otras 48 hr. El solvente fue eliminado al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en columna rápida con DCM: MeOH (6:1) para dar producto puro (4,23 g, 45%) como un aceite:

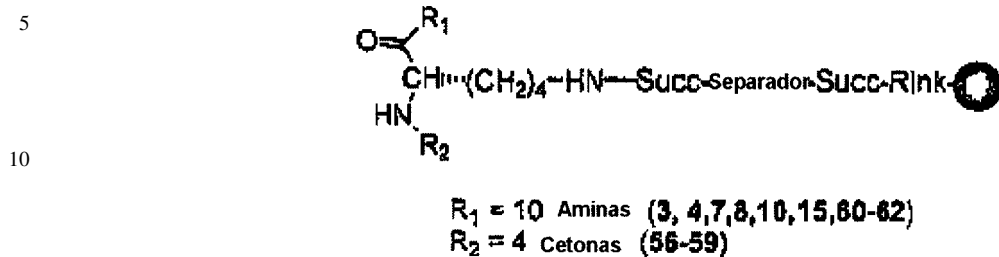
55 ¹H RMN (CDCl₃, δ) 7.34 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.09 (m, 2H), 2.85 (t, 2H), 2.15 (t, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, δ) 136.72, 135.42, 128.05, 54.27, 48.46, 35.51.

60 El producto (2 g, 7.78 mmol) y carbonato sódico (1,77 g, 16,67 mmol) fue disuelto en agua (60 ml). Fmoc-OSu (3,7 g, 11,11 mmol) en THF (60 ml) fue añadido en una porción. La solución fue agitada a la temperatura ambiente durante 1 hora, luego concentrada al vacío. El residuo fue neutralizado a pH 2 por 1 N de HCl y extraído con acetato de etilo (300 ml). El extracto fue lavado con solución salina (2 x 50 ml), secado sobre MgSO₄ y concentrado al vacío. El residuo fue purificado por cromatografía en columna rápida con hexano:acetato de etilo (6:1) dando 2,69 g (72%) de producto puro como un aceite:

65 ¹H RMN (CDCl₃, δ) 8.50 (br, 1H), 6.51-7.59 (m, 12H), 3.82-4.48 (m, 5H), 3.30 (br, 1H), 2.95 (br, 1H), 2.36 (br, 1H), 2.06 (br, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, δ) 175.3, 175.1, 163.7, 156.8, 156.4, 144.2, 141.8, 137.1, 132.0, 129.9, 129.2, 128.6, 128.1, 127.5, 125.1, 121.5, 120.4, 67.6, 50.9, 48.2, 47.7, 47.6, 37.2, 33.4, 32.1.

Ejemplo 39

Síntesis de biblioteca 6



15 La Biblioteca 6 fue sintetizada en paralelo en resina PEGA₄₀₀₀ (0.5 g, 0,12 mmol/g, 300-500 μ M perlas) según el esquema 14 con diez aminas diferentes en posición R_1 y cuatro cetonas diferentes en posición R_2 , dando lugar a una biblioteca de cuarenta elementos. El enlazador Rink, 54 (2 equivalentes) fue acoplado a la resina bajo activación con TBTU en una jeringa de plástico. Para invertir la reactividad en la resina (de amina a carboxilato) anhídrido succínico (15 equivalentes) se acopló al enlazador Rink usando DIPEA (15 equivalentes) como base (Czerwinski *et al.*, 1998, PNAS, 95, 11520-11524). El separador, azido-PEG-amina (n= 10, 3 equivalentes), fue luego acoplado bajo activación con TBTU a la resina, seguido de la reducción de la azida con 0,1 M de DTT en DMF con DBU (2 equivalentes). El acoplamiento de anhídrido succínico (15 equivalentes) nuevamente invirtió la reactividad en la resina y después de la activación con Pfp, Fmoc-Lys-OH (5 equivalentes) fue acoplado. Después de la activación con Pfp de la resina, la resina es dividida en diez porciones separadas y luego reaccionada con diez aminas (3, 4, 7, 8, 10, 15, 20, 60-62). El grupo Fmoc fue eliminado por tratamiento con el 20% de piperidina en DMF y cada una de las diez partes fue dividida adicionalmente en cuatro porciones nuevas (en total 40 porciones). Cuatro cetonas diferentes (56-59, 30 equivalentes) fueron acopladas a cada amina por aminación reductiva usando NaCNBH₃ (St. Hilaire *et al.*, 2002, J. Med. Chem. 45.: 1971-1982). Partes con grupos de éster fueron tratadas con 1M de NaOH (7,5 h, temp. amb.) para hidrólisis de los grupos de éster, los grupos tritilo fueron eliminados por tratamiento con el 90% de ácido acético a 60°C durante 3 h y los grupos Boc fueron eliminados calentando la resina en DMF a 120°C durante 3 h.

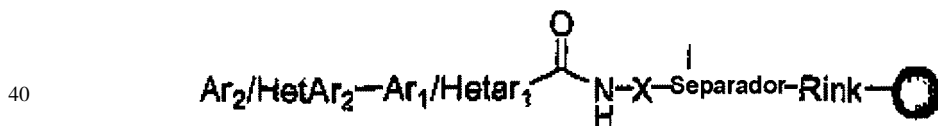
20

25

30

Ejemplo 40

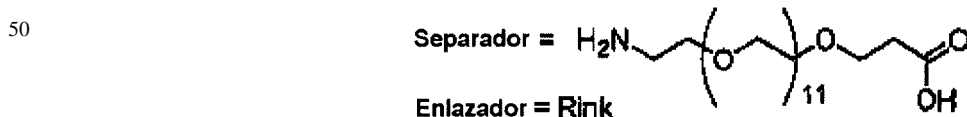
Síntesis de una pequeña biblioteca 7 de moléculas de biarilo



$X =$ Cadenas laterales de varios aminoácidos naturales e innaturales (e.g. 3 - 47, 64-75, 106)

45 $Ar_1/Hetar_1 =$ Varios grupos arilo y heteroarilo de haloácidos (76-81)

$Ar_2/Hetar_2 =$ Varios grupos arilo y heteroarilo de ácidos borónicos y ésteres (82-101)



55 El esquema sintético para construir la biblioteca 7 que tiene los sistemas de anillos aromáticos o heteroaromáticos de estructura $Ar_2/Hetar_2-Ar_1/Hetar_1-X$ ($Ar/Hetar_1$ y 2 (heteroátomo(s): O, S, N) con varios sustituyentes p. ej. Haluro(s) (F, Cl), CH_3 -, CF_3 -, metoxi, tiometil-, aldehído(s)-alcoholes-ácidos carboxílicos, ésteres, grupos nitro etc.), la X corresponde a diferentes aminoácidos, naturales o innaturales elegidos de 3-47 y 64-75 y 106.

60 Para producir la biblioteca 7, como se muestra en esquema 15, un enlazador Rink de ácido lábil protegido con Fmoc (3 equivalentes) fue fijado a Pega₄₀₀₀ funcionalizada con NH_2 (400 mg \sim 0.1 mmol/g) bajo activación con TBTU (2.88 eq. TBTU, 4 eq. NEM, 3 eq. Fmoc-Rink-OH), en DMF seco. El enlazador de ácido lábil fue usado para resistir las condiciones básicas usadas para los acoplamientos cruzados de Suzuki descritos más tarde. Después del lavado con DMF (6x), la resina fue tratada con el 20% de piperidina/DMF (durante 2 + 18 min) para eliminar el grupo Fmoc en el enlazador de Rink. La adición del separador (Fmoc-NH-((CH_2)₂O)₁₂-CH₂OOH) fue conseguida usando nuevamente la activación con TBTU. Después del lavado, la resina fue dividida en 40 pocillos y la eliminación del grupo Fmoc fue realizada con el 20% de piperidina/DMF (durante 2 + 18 min) y la resina lavada otra vez con DMF. A cada pocillo fue acoplado un aminoácido natural o innatural protegido con Fmoc (3 equivalentes usando activación con TBTU. Después

65

ES 2 318 266 T3

del acoplamiento y lavado, la resina fue agrupada, dividida en 6 porciones, tratada con el 20 0/0 de piperidina/DMF (2+18 min), lavada, y acoplada con 6 ácidos carboxílicos haloaromáticos diferentes o heteroaromáticos o cloruros de ácido usando activación con TBTU o Et₃N en DMF respectivamente. Las reacciones fueron dejadas durante la noche y en cada caso 5 eq. de la entidad aromática o heteroaromática fueron usadas en comparación con la carga de resina. Las resinas fueron lavadas y agrupadas otra vez. En todas las fases sintéticas anteriormente descritas para la biblioteca 7, la prueba de Kaiser fue usada para evaluar los resultados de las reacciones. Las resinas secas fueron divididas en 20 frascos y acopladas con 20 ácido o éster aril o heteroaril borónico diferentes usando Acoplamientos cruzados de Suzuki-Miyaura modificados (Miyaura, N.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* 1979, 20, 3437; Suzuki, A. *Acc. Chem. Res.* 1982, 15, 178). Usando esta estrategia para el acoplamiento C-C entre los dos grupos aromáticos o heteroaromáticos, una variedad amplia de grupos funcionales fueron tolerados. Los acoplamientos fueron bien realizados a temp. amb. o a 60°C. Normalmente 1 eq. de resina fue reaccionado con 10 eq. de ácido o éster aril/heteroaril borónico, 5 eq. 2M K₃PO₄, 0.1 eq. Pd(PPh₃)₄ en tolueno/EtOH (1:1) y la mezcla reactiva fue purgada con argón durante 5 min. Después de la reacción, las resinas fueron cuidadosamente lavadas. En algunos casos Pd negro fue capturado en la resina. No obstante, el tratamiento con 0.5% de Et₂NCS₂Na/DIPEA recién preparado en DMF eliminó el Pd negro del soporte sólido. Finalmente, las resinas fueron suspendidas en DMF y calentadas a 120°C en un horno de microondas (<500W) durante 20 min, para eliminar los grupos de protección con Boc. Las resinas fueron lavadas con DMF (3x) y CH₂Cl₂ (5x) y secadas bajo alto vacío durante toda la noche.

20 Ejemplo 41

Identificación de moléculas pequeñas de ligando por fragmentación por MS

Ligandos fijados a perlas individuales y aislados después de la selección de bibliotecas preparadas sin síntesis en escala (bibliotecas 5 y 7) como se describe en ejemplos 36 y 40 fueron divididos como se describe en el ejemplo 19. Las muestras fueron micropurificadas en micro columnas C18 y fragmentadas usando un Micromass Ultima Global. La identidad del ligando podía ser determinada de la fragmentación.

30 Ejemplo 42

Preparación de proteína no marcada de miocitos basales y tratados con PE

La proteína fue extraída de miocitos preparados como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 9, usando un procedimiento nuevo (para preservar la actividad de las metaloproteasas) modificado de los protocolos existentes, principalmente: Arnott, *et Al.*, 1998, *Anal. Biochem.* 258, 1-18. Los medios fueron eliminados de las placas y las células fueron lavadas con tampón fosfato helado (5ml, 10 mM, pH 7.5, suplementadas con 0.15 M de NaCl) para eliminar trazas de componentes de los medios. Las células adheridas fueron tratadas durante 10 minutos con tampón fosfato helado (2 ml, 10 mM, pH 7.5, aumentado con 0.15 M de NaCl, 10 µg/ml E-64, 10 µg/ml leupeptina, y 10 µg/ml de pepstatina A). Las células fueron descartadas de las placas y luego lisadas (en hielo) en un sonicador (2x) usando ciclos de 10 segundos fuera/10 segundos dentro.

La suspensión resultante fue aumentada con CHAPS (1% p/v), KCl (50 mM), NaCl (0.5 M), ZnCl₂ (0.1 mM), DTT (5 mM), y urea (2 M). Después de 10-15 minutos en hielo, la solución fue centrifugada durante 10 minutos a 15.000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el contenido de proteína cuantificado mediante la prueba proteica NanoOrange (Molecular Probes, Eugene, Oregon): total de proteína recuperada: 195 µg para células inducidas por PE y 200 µg para células basales.

Las soluciones de proteína fueron dializadas extensamente contra 20 mM de tampón MES (ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico) pH 6.0, suplementadas con 0.15 M de NaCl y 1 mM de ZnCl₂ para eliminar el exceso de detergente y urea.

55 Ejemplo 43

Selección de fase sólida de biblioteca 6 con proteínas de miocitos no marcadas

La Biblioteca 6, preparada como se describe para el Ejemplo 39, fue dividida en 80 partes (60-70 perlas de cada compuesto), y lavada durante 10 minutos (3x) con 20 mM de tampón MES (ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico) pH 6.0, suplementado con 0.15 M de NaCl, 1 mM de Ca²⁺, 1 mM de Zn²⁺, 1 mM de Mn²⁺, 1 mM de Cu²⁺, y 1 mM de Mg²⁺ (3 ml). Las soluciones (15 µl, 5 µg proteína) conteniendo proteínas de miocitos, proteína inducida por PE o proteína basal obtenida como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 42, fueron añadidas a las perlas de la biblioteca. Las perlas conteniendo resina PEGA₄₀₀₀ sólo con enlazador y separador fueron usadas como un control. Las proteínas y bibliotecas de ligando fueron incubadas a 4°C durante 16 horas. Las bibliotecas fueron luego lavadas con tampón MES durante 5 minutos luego con agua durante 3 x 5 min.

ES 2 318 266 T3

Ejemplo 44

Detección de proteína unida por coloración de plata

5 Para detectar ligandos unidos a proteínas, las perlas fueron coloreadas de plata usando un procedimiento nuevo, modificado de los protocolos existentes descritos en Rabilloud, T., 1990, *Electrophoresis* 11(10): 785-94 y Rabilloud, T., 1992, *Electrophoresis* 13(7): 429-39. Las perlas de biblioteca fueron fijadas durante 30 minutos usando una solución conteniendo etanol (40% v/v) y ácido acético glacial (10% v/v). Las perlas fueron luego sensibilizadas durante 30 minutos con una mezcla de etanol (30% v/v), tiosulfato de sodio (0,2% p/p) y acetato sódico (6,8% p/v) seguido de un lavado con agua (3 x 5 min). La coloración de plata de las bibliotecas fue realizada usando una solución de nitrato de plata (0,25% p/v) durante 20 minutos después de lo cual se eliminó el exceso de plata de las perlas mediante lavado con agua (2x) durante 2 minutos. Una solución reveladora conteniendo carbonato sódico (2,5% p/v), formaldehído (0,007% p/v) y glutardialdehído (0,125% v/v) fue añadida a las perlas durante 2-5 min. La reacción fue detenida añadiendo una solución de EDTA de sodio (1,46% p/v). Las perlas fueron examinadas y comparadas con las perlas de separador de control. Las perlas fueron conservadas para el análisis.

Ejemplo 45

Digesta trípica en perlas de proteínas coloreadas de plata

20 Las perlas coloreadas de plata que contenían tanto ligando como proteína unidos fueron transferidas a tubos de PCR sin RNasa ni ADNsa. Las perlas fueron lavadas secuencialmente con agua (100 μ l) durante 15 minutos, y acetonitrilo (50 μ l) luego secadas en una speedvac. Las perlas secas fueron mezcladas con 50 μ l de DTT (10 mM en 0.1 M de bicarbonato de amonio) a 56°C durante 1 hora. Tras el enfriamiento, el DTT fue eliminado y 50 mM de yodoacetamida fueron añadidos en 0,1 M de bicarbonato de amonio (50 μ l). Las mezclas fueron incubadas a oscuras durante 30 minutos a la temperatura ambiente. La yodoacetamida fue eliminada, las perlas fueron lavadas con acetonitrilo (100 μ l) luego secadas en la speedvac.

30 A las perlas secas se les añadió tripsina en 25 mM de bicarbonato de amonio a una concentración de 75 ng/ μ l. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 4-5 horas. El sobrenadante de la digesta trípica fue luego eliminado y concentrado. Los péptidos trípticos fueron luego micropurificados usando un disco de extracción de alto rendimiento conteniendo resina de octadecilo (C18) (3M Filtration Products, MN, EEUU). Los discos fueron primero hinchados en acetonitrilo luego equilibrados con el 1% (v/v) de ácido fórmico después de lo cual la muestra de péptidos trípticos fue aplicada. La columna fue lavada con el 0,1% (v/v) de TFA acuoso y la muestra fue eluída con el 1% (v/v) de TFA. La muestra fue analizada por MALDI-TOF-MS como se describe para el Ejemplo 26 y la proteína identificada como se describe para el Ejemplo 31.

Ejemplo 46

40 *Preparación de proteínas marcadas de macrófagos porcinos normales e infectados por el virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)*

La proteína fue extraída de macrófagos infectados por el virus reproductivo y respiratorio porcino y macrófagos normales preparados usando un procedimiento nuevo modificado de protocolos existentes, principalmente: Arnott, *et al.*, 1998, *Anal. Biochem.* 258, 1-18. Después de la eliminación de los medios, las células fueron tratadas durante 10 minutos con 20 mM de tampón fosfato helado (1 ml), pH 7.2, suplementado con 122 mM de NaCl, 60 mM de Benzamidina HCl, 5 mM de EDTA, 10 μ g/ml de E-64, 10 μ g/ml de leupeptina, 10 μ g/ml de pepstatina A, y 1 mM de PMSF. La suspensión resultante fue aumentada con CHAPS (4% p/v), y las células lisadas usando ciclos de congelación-descongelación. Después de 10-15 minutos en hielo, la solución fue centrifugada durante 10 minutos a 15.000 r.p.m. a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el contenido de proteína cuantificado mediante la prueba proteica NanoOrange (Molecular Probes, Eugene, Oregon): total de proteína recuperada: 150 μ g para células infectadas con el virus y 142,4 μ g para células normales.

55 Colorante fluorescente Cianina 3 (Cy 3) (Amersham) fue usado para marcar la proteína de células no infectadas mientras que la proteína cianina 2 (Cy 2) (Amersham) fue usada para marcar la proteína extraída de las células infectadas con el virus. Los procedimientos de marcado fueron realizados según el protocolo del fabricante. Las soluciones de proteínas (0,7 ml, 100 μ g para células infectadas con el virus y 0,66 ml, 100 μ g para células normales) fueron dializadas contra una solución de 10 mM de tampón fosfato, 0,15 M de NaCl, pH 7.5 y luego 1 M de NaHCO₃ (0,03-0,06 ml) se añadió a un final pH entre 8.0-9.0. Para un marcado eficaz, una proporción de proteína:colorante de 50 μ g:400 μ mol de fluoroforo fue mantenida. El fluoroforo (5 μ l de solución preparada añadiendo 2 μ l de una solución de fluoroforo reconstruido 1 nmol/ μ l a 3 μ l de DMF seca) y las soluciones de proteína fueron mezcladas íntegramente mediante agitación en vortex. Las muestras fueron luego centrifugadas brevemente en un microfuge y dejadas en hielo durante 30 min a oscuras. Para detener la reacción, se añadió lisina (10 mM, 1 μ l) a las muestras, que fueron luego mezcladas por agitación en vortex y recogidas por centrifugado en un microfuge. Las muestras fueron dejadas en hielo durante 10 min a oscuras. Las soluciones de proteína marcadas fueron dializadas extensamente contra 10 mM de tampón fosfato, 0,15 M de NaCl, pH 7.5, para eliminar el exceso de colorante. Las muestras marcadas fueron almacenadas a -70°C a oscuras hasta un uso posterior.

ES 2 318 266 T3

Ejemplo 47

La selección de fase sólida de una biblioteca 7 de moléculas pequeñas con proteínas de macrófagos marcadas víricas y porcinas

5 Biblioteca de ligando 7 (200 mg), preparada como se describe para el Ejemplo 40, fue transferida a una jeringa apta con una válvula de parada y las perlas de ligando fueron lavadas durante 10 minutos (3x) con 10 mM de tampón fosfato, pH 6.8, suplementado con 0,15 M de NaCl, 1 mM de Ca²⁺, 1 mM de Zn²⁺, 1 mM de Mn²⁺, 1 mM de Cu²⁺ y 1 mM de Mg²⁺ (3 ml). Una mezcla de proteínas marcadas, incluyendo mezcla de proteínas de macrófagos porcinos y víricos respiratorios y reproductivos porcinos (660 µl, 100 µg) y proteína de macrófagos (700 µl, 100 µg) obtenida como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 46, fue añadida a la biblioteca de ligandos en la jeringa. Las proteínas y la biblioteca de ligandos fueron incubadas a la temperatura ambiente a oscuras durante 16 horas. La biblioteca fue luego lavada con tampón durante 5 minutos seguido de agua durante 3 x 5 minutos. La biblioteca fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia y las perlas fluorescentes brillantes rojas, verdes, y amarillas (amarillo indicativo de unión con colorantes rojos y verdes; la mayoría de las perlas) estuvieron presentes, al igual que perlas no marcadas. Las perlas fluorescentes fueron separadas usando una clasificadora de perlas como se describe en el ejemplo 18.

Ejemplo 48

Selección en fase sólida de una biblioteca 7 de moléculas pequeñas de biarilo con proteínas de miocitos marcadas

20 La biblioteca de ligandos 7 (200 mg), preparada como se describe para el ejemplo 40, fue transferida a una jeringa apta con una válvula de parada y las perlas de ligando fueron lavadas durante 10 minutos (3x) con 10 mM de tampón fosfato, pH 6.8, suplementadas con 0,15 M de NaCl, 1 mM de Ca²⁺, 1 mM de Zn²⁺, 1 mM de Mn²⁺, 1 mM de Cu²⁺, y 1 mM de Mg²⁺ (3 ml). Una mezcla de proteínas de miocitos marcadas, que contiene tanto proteínas inducidas por PE (0,35 ml, 100 µg) como proteínas normales/saludables (0,41 ml, 100 µg) obtenidas como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 11, fueron añadidas a la biblioteca de ligandos en la jeringa. Las proteínas y la biblioteca de ligandos fueron incubadas a la temperatura ambiente a oscuras durante 16 horas. La biblioteca fue luego lavada con tampón durante 5 minutos luego con agua durante 3 x 5 minutos. La biblioteca fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia y perlas no marcadas, perlas fluorescentes brillantes rojas, verdes, y amarillas (amarillo indicativo de unión con colorantes rojos y verdes; la mayoría de las perlas) estuvieron presentes. Las perlas fluorescentes fueron separadas usando una clasificadora de perlas como se describe en el Ejemplo 18.

Ejemplo 49

Selección en fase sólida de la biblioteca 4 con proteínas porcinas víricas y macrófagos marcadas

40 La biblioteca de ligandos 4 (300 mg), preparada como se describe para el ejemplo 35, fue transferida a una jeringa ajustada con una válvula de parada y las perlas de ligandos fueron lavadas durante 10 minutos (3x) con 10 mM tampón fosfato, pH 6.8, suplementadas con 0,15 M de NaCl, 1 mM de Ca²⁺, 1 mM de Zn²⁺, 1 mM de Mn²⁺, 1 mM de Cu²⁺, y 1 mM de Mg²⁺ (3 ml). Una mezcla de proteínas porcinas macrófagos marcadas, incluyendo tanto proteína porcina infectada por virus reproductivo y respiratorio (660 µl, 100 µg) como proteína normal (700 µl, 100 µg) obtenida como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 46, fue añadida a la biblioteca de ligandos en la jeringa. Las proteínas y la biblioteca de ligandos fueron incubadas a la temperatura ambiente a oscuras durante 16 horas. La biblioteca fue lavada con tampón durante 5 minutos luego con agua durante 3 x 5 minutos. La biblioteca fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia y perlas fluorescentes brillantes rojas, verdes, y amarillas (amarillo indicativo de unión de colorantes rojos y verdes; la mayoría de las perlas) estuvieron presentes, al igual que las perlas no marcadas. Las perlas fluorescentes fueron separadas usando una clasificadora de perlas como se describe en el Ejemplo 18.

Ejemplo 50

55 *Selección en fase sólida de la biblioteca 5 con proteína de miocitos marcada*

60 La biblioteca de ligandos 5 (250 mg), preparada como se describe para el Ejemplo 36, fue transferida a una jeringa ajustada con una válvula de parada y las perlas de ligandos fueron lavadas durante 10 minutos (3x) con tampón fosfato 10 mM, pH 6.8, suplementado con 0,15 M de NaCl, 1 mM de Ca²⁺, 1 mM de Zn²⁺, 1 mM de Mn²⁺, 1 mM de Cu²⁺, y 1 mM de Mg²⁺ (3 ml). Una mezcla de proteínas de miocitos marcadas incluyendo tanto proteína inducida por PE (138 µl, 40 µg) como proteína basal (167 µl, 40 µg) obtenida como se ha descrito anteriormente para el Ejemplo 11, fue preparada en 1,2 ml de tampón, y añadida a la biblioteca de ligandos en la jeringa. Las proteínas y la biblioteca de ligandos fueron incubadas a la temperatura ambiente a oscuras durante 16 horas. La biblioteca fue lavada con tampón durante 5 minutos luego con agua durante 3 x 5 minutos. La biblioteca fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia y perlas fluorescentes brillantes rojas, verdes, y amarillas (amarillo indicativo de unión de colorantes rojos y verdes; la mayoría de las perlas) estuvieron presentes, al igual que las perlas no marcadas. Las perlas fluorescentes fueron separadas usando una clasificadora de perlas como se describe en el Ejemplo 18.

ES 2 318 266 T3

Ejemplo 51

Identificación de proteínas y ligandos fijados a la misma perla individual

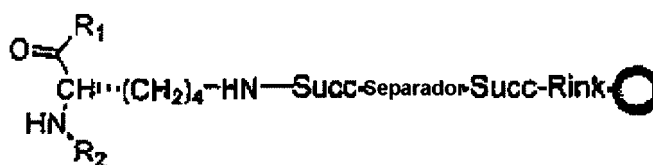
5 Después de la clasificación automática o manual, una perla individual conteniendo proteína(s) marcada(s) unida(s) al ligando fue lavada extensamente con agua (2X), 1% (v/v) de ácido acético (2X) y agua (2X) para eliminar el flujo residual de la vaina. A la perla se le añadió tripsina en 25 mM de solución de bicarbonato de amonio a una concentración de 75 ng/ μ l. La muestra fue incubada a 37°C durante 4-5 horas. El sobrenadante de la digesta trípica fue luego eliminado y concentrado. Los péptidos tríplicos fueron luego micropurificados usando un disco de extracción de alto rendimiento conteniendo resina de octadecilo (C18) (3M Filtration Products, MN, EEUU). Los discos fueron inicialmente tratados con acetonitrilo y luego equilibrados con 1% (v/v) de ácido fórmico: la identidad de la(s) proteína(s) unida(s) fue luego determinada como se describe en el ejemplo 31.

10 Después de la eliminación del sobrenadante de los péptidos tríplicos, la perla fue transferida a un tubo de Eppendorf nuevo (sin RNAsa ni ADNsa) y el ligando fue dividido mediante las condiciones apropiadas para el enlazador como se describe en el Ejemplo 19. Las muestras para la identificación de ligandos preparadas de esta manera fueron adicionalmente analizadas usando MALDI-TOF-MS como se describe en el Ejemplo 19 y/o usando fragmentación por MS como se describe en el ejemplo 41.

20 Ejemplo 52

Resultados para la selección de proteínas de miocitos de la biblioteca 6

25



30

$\text{R}_1 = 10$ Aminas (3, 4, 7, 8, 10, 15, 80-82)
 $\text{R}_2 = 4$ Cetonas (56-59)

35

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

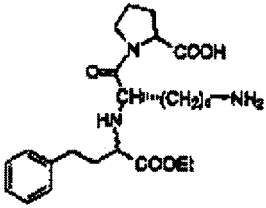
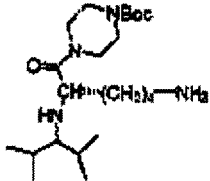
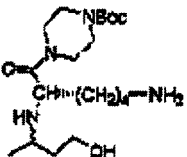
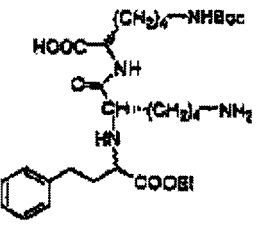
60

65

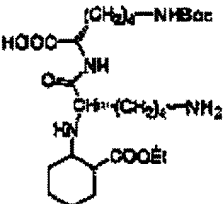
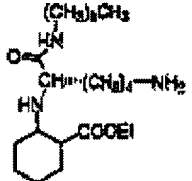
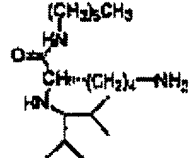
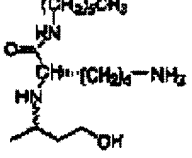
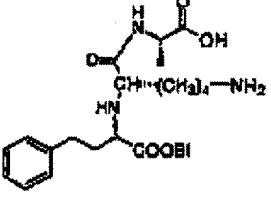
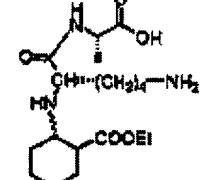
ES 2 318 266 T3

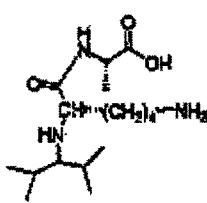
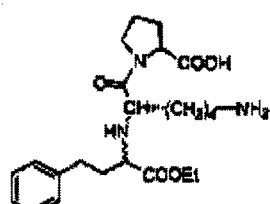
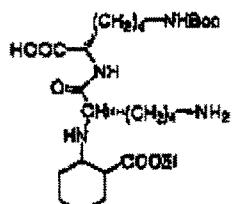
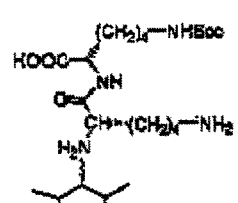
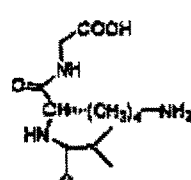
TABLA 10

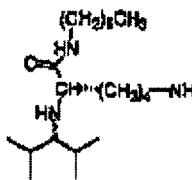
Lista de ligandos y proteínas identificados para la biblioteca 6 y proteínas de miocitos

Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
Miocitos normales		
1	<p>AJ1: R1 = 20 R2= 56</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967); factor auxiliar de la ribonucleoproteina nuclear U2 (gi 2842676).</p>
2	<p>AJ7: R1 =61 R2= 58</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967).</p>
3	<p>AJ8: R1 =61 R2= 59</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967).</p>
4	<p>AJ9: R1 = 8 R2= 56</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967).</p>

ES 2 318 266 T3

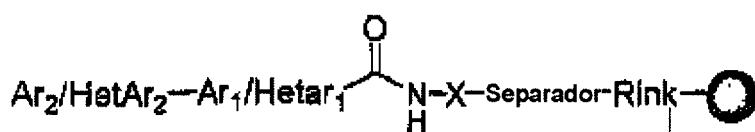
5	<p>AJ10: R1 = 8 R2= 57</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967); factor auxiliar de la ribonucleoproteina nuclear U2 (gi 2842676).</p>
6	<p>AJ18: R1 =62 R2= 57</p> 	<p>Canal de potasio 13 rectificador interno (Q9QZ65, IRKD_CAVPO); receptor de sulfonilurea 2 (Q63563); canal de potasio de poca conductancia (P58391).</p>
7	<p>AJ19: R1 =62 R2= 58</p> 	<p>Proteína de choque térmico 70kDa proteína 12A (Q8KOU4); proteína serina/treonina quinasa (088866); proteína activadora 2 de Ras GTPasa (GAP1m) (P58069).</p>
8	<p>AJ20: R1 =62 R2= 59</p> 	<p>Proteína hipotética E330017A01 de cadena pesada de miosina, tipo no muscular (AQ62812); (XP-148690.1).</p>
9	<p>AJ25: R1 = 3 R2= 56</p> 	<p>Testasa 1 o disintegrina 5 conteniendo dominio de metaloproteinas 24 (gi 31981793); factor de ribosilación con ADP tipo proteína 8 (Q96KC2).</p>
10	<p>AJ26: R1 = 3 R2= 57</p> 	<p>Proteína enrollada de Golgi GCC185 (Q8CHG3).</p>

<p>5 10</p> <p>11</p>	<p>AJ27: R1 = 3 R2= 58</p> 	<p>Miosina de cadena pesada de tipo no muscular (AQ62812).</p>
<p style="text-align: center;">Miocitos tratados con PE</p>		
<p>15 20 25</p> <p>12</p>	<p>AJ1: R1 =20 R2= 56</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967); factor auxiliar de la ribonucleoproteina nuclear U2 (gi 2842676).</p>
<p>30 35</p> <p>13</p>	<p>AJ10: R1 = 8 R2= 57</p> 	<p>Enzima de conversión de la angiotensina (P22967); factor auxiliar de la ribonucleoproteina nuclear U2 (gi 2842676).</p>
<p>40 45</p> <p>14</p>	<p>AJ11: R1 = 8 R2= 58</p> 	<p>precursor B3 de cadena Laminina beta 2 (P15800); ubiquitina proteína ligasa E3 (AO08759).</p>
<p>50 55 60</p> <p>15</p>	<p>AJ15: R1 = 4 R2= 58</p> 	<p>factor beta de glucógeno sintasa quinasa 3 (AQ9WV60).</p>

16	<p>AJ18: R1 = 62 R2 = 58</p> 	<p>Proteína de choque térmico 70kDa proteína 12A (Q8KOU4).</p>
----	--	--

Ejemplo 53

Resultados para selección de proteína vírica/macrófago de biblioteca 7



X = Cadenas laterales de varios aminoácidos naturales e innaturales (p. ej. 3 - 47, 64-75, 106)

Ar₁/HetAr₁ = Varios grupos arilo y heteroarilo de haloácidos (76-81)

Ar₂/HetAr₂ = Varios grupos arilo y heteroarilo de ácidos borónicos o ésteres (82-101)

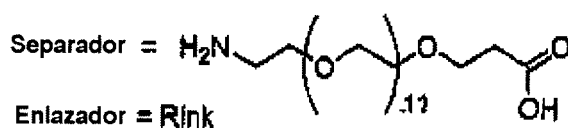
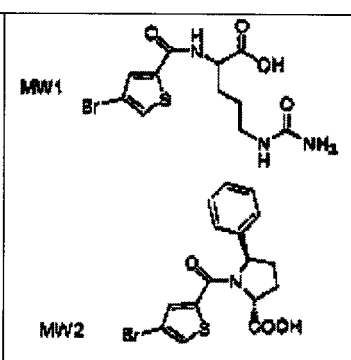
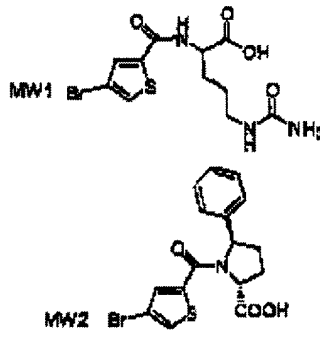
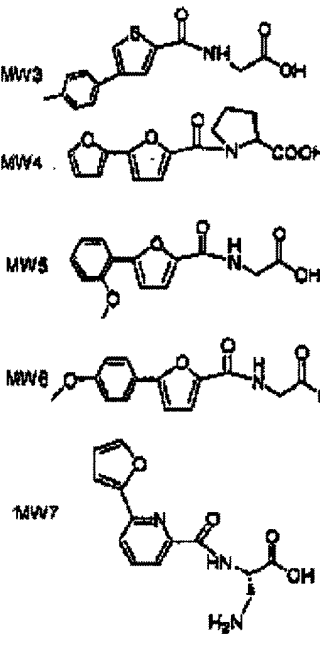
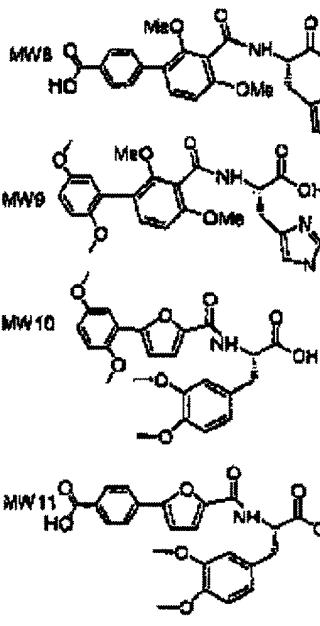
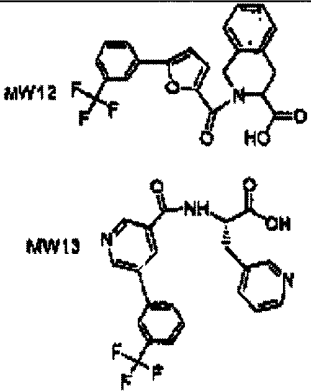
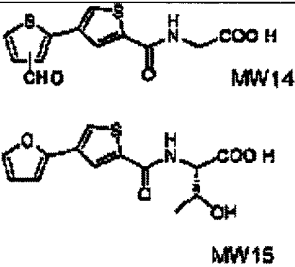
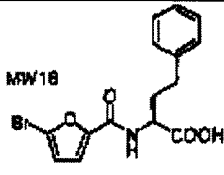


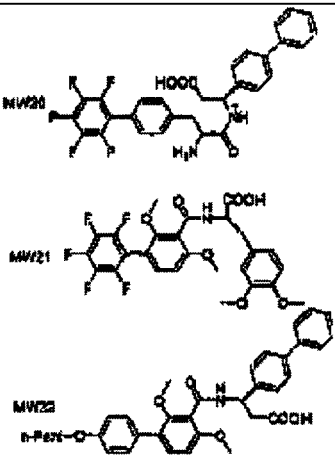
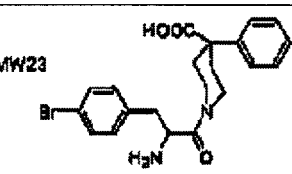
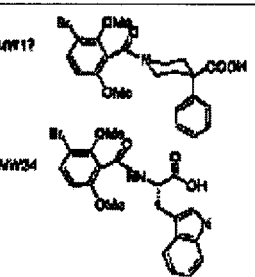
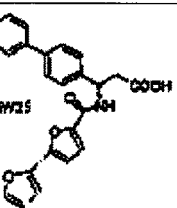
TABLA 11

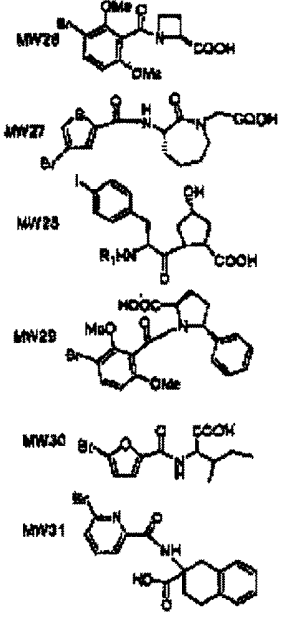
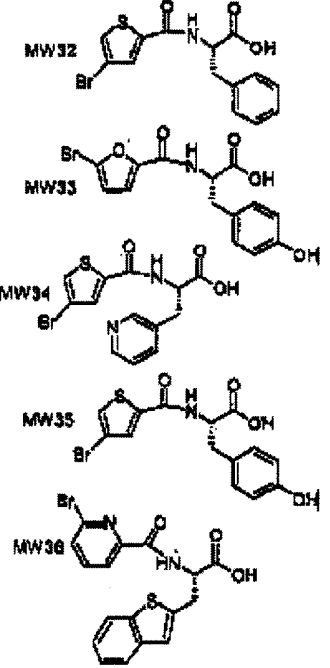

Lista de ligandos y proteínas identificados para la biblioteca 7 y proteínas de macrófagos/víricas

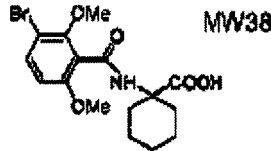
Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
Macrófagos normales		
1		<p>Antígeno APK1 (2134769); Hialuronano sintasa 2 (gi12049586)</p>

<p>2</p>		<p>Calreticulina 63 kDa (gi 253851); proteína de unión de calcio</p>
<p>3</p>		<p>Quinasa 2 inducible por Sal (27529963); enzima 2 interactuante con PVHL-ubiquitina (23208620); similar al gliceral- dehidro-3-fosfato deshidrogenasa (gi27686413)</p>
<p>Macrófagos infectados por virus</p>		
<p>4</p>		<p>Carbohidrato (condroitina sintasa 2) (28466981); subunidad alfa de glucosidasa II (gi5452936); similar al marco de lectura 24 del cromosoma 9 (gi29437020)</p> <p>(V) región C2V3 de la glicoproteína de revestimiento (gi3925092); glicoproteína de revestimiento (gi15705767)</p>

5	 <p>MW12</p> <p>MW13</p>	<p>Similar al factor de intercambio de nucleótido de guanina Rho (GEF)</p> <p>(gi 28510159/XP 109946.2); similar al gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (gi 28546240/XP 205430.2); proteína hipotética MGC7050 (gi 23601917) (V) proteína Rev (gi 13172687); proteína de revestimiento (gi 19919954); glicoproteína precursora (gi 731113); repetición rica en leucina:similar a Amsacta moorei Entomopoxvirus (gi 9631418)</p>
6	 <p>MW14</p> <p>MW15</p>	<p>Producto de proteína sin nombre (26336134); serina/treonina quinasa 9 dependiente de serina/treonina quinasa 9/cilina (23271297/4507281); Caveolina 1(gi 4972627/AAD347221) (V) glicoproteína de revestimiento (gi 3832399)</p>
7	 <p>MW16</p>	<p>Receptor de 7 hélices transmembrana (gi 21928697); polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp). (gi 19527256); mito precursor proteína L12 ribosómica 60s (gi 1710600) (V) proteína de unión a HLA (gi</p>

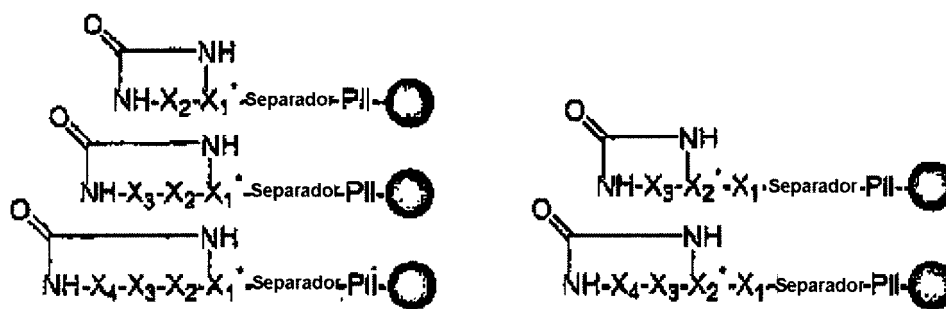
<p>2</p> <p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p>		<p>Citocromo P450 2C23 (epoxigenasa de ácido araquidónico) (CYPIIC23, P24470); Calcitonina de isoforma de empalme, variante desplazada de precursor de Calcitonina P41547 (CAL0_CANFA, P22892); subunidad gamma-1 de complejo de proteína de adaptador AP-I con subunidad gamma-1 de adaptador de Golgi HA1/adaptina AP1) (P41547-00- 00-00).</p>
<p>3</p> <p>30</p> <p>35</p>		<p>Proteína con dedos de zinc 198 (Fusionada en proteína de trastornos mieloproliferativos) (Q9UbW7); producto de proteína sin nombre (gi 12844245).</p>
<p>4</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>50</p>		<p>Citocromo P450 2C31 (CYPIIC31) (CPCV_CAPAE,Q29478); proteína de unión de ácidos grasos, (FABPI, P02693); similar a la subunidad alfa de proteína quinasa CK2 (gi 28527943).</p>
<p>5</p> <p>55</p> <p>60</p>		<p>Proteína de interacción de receptor de tiroides 11 (TRIP- 11,Q15643); producto de proteína sin nombre (gi 26338976).</p>

<p>6</p>	 <p>MW26 MW27 MW28 MW29 MW30 MW31</p>	<p>Proteína beta-5 de unión gap (Connexin 31.1), (Q02739); proteína Hipotética XP_238677 (gi 208598980).</p>
<p>Miocitos inducidos con suero (hipertrofiados)</p>		
<p>7</p>	 <p>MW32 MW33 MW34 MW35 MW36</p>	<p>Similar al precursor de la proteína miccional 3 (gi 27719895); glutamina sintetasa (gi 29150629); casete de unión de ATP (sub-familia B, elemento 10, (Q9NRK6).</p>
<p>8</p>	 <p>MW37</p>	<p>Serina-treonina quinasa (gi 474842); precursor de Hemopexina (glicoproteína Beta-1B) (P02790); componente de ribonucleoproteína nuclear pequeña U5 de 116 kDa (008810).</p>

<p>9</p>	 <p>MW38</p>	<p>proteína X asociada a la translina (Q99598); proteína Hipotética ORF-1137 (P11260); alfa-1 Integrina (Laminina y receptor de colágeno VLA-1, CD49a) (P56199).</p>
----------	---	--

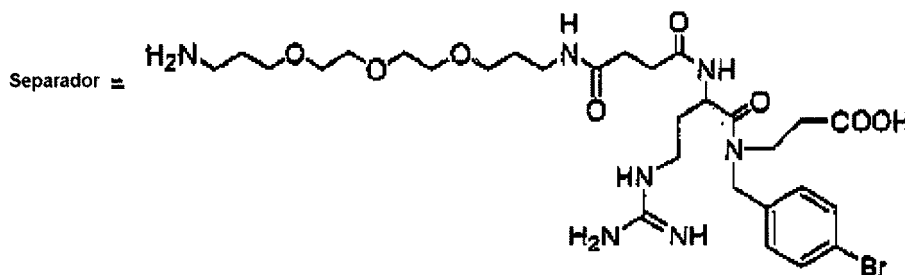
Ejemplo 55

Resultados para selección de proteína vírica/macrófaga de biblioteca 4



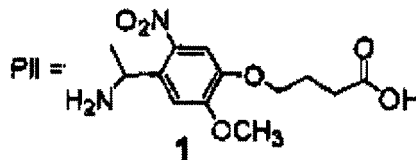
Variación A

Variación B



$X^* = 8, 39-41, 43$

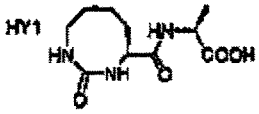
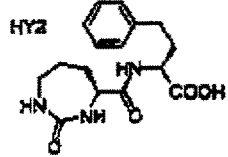
$X_{1-4} =$ Aminoácidos naturales e innaturales (3-5, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 19-22, 24, 28, 45, 47, 73, 106, 127)



ES 2 318 266 T3

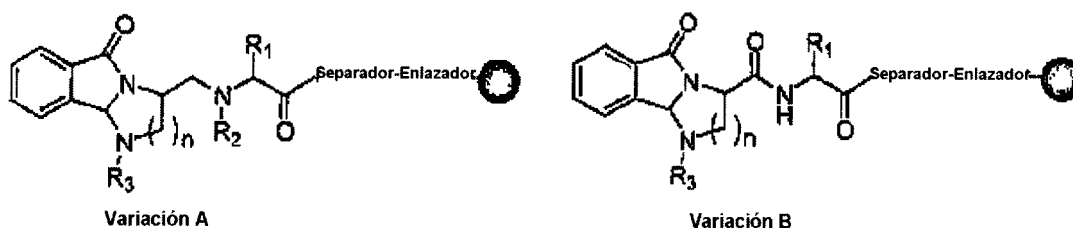
TABLA 13

Lista de ligandos y proteínas identificados para biblioteca 4 y proteínas macrófagos/víricas

Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
Macrófagos normales		
1		Proteína 1 de unión a la proteína quinasa C también contiene un dominio de dedos de zinc con proteína 8) (Q9U1U4); proteína de unión de nucleótido de guanina G(S), subunidad alfa (proteína alfa G estimulante de la adenilato ciclasa) (P048949).
2		Proteína quinasa byr2 (proteína quinasa ste8) (MAP quinasa) (P28829); similar a la proteína quinasa 2 (testicular) (Q885R6); tiamina trifosfatasa (Q8CgV7).

Ejemplo 56

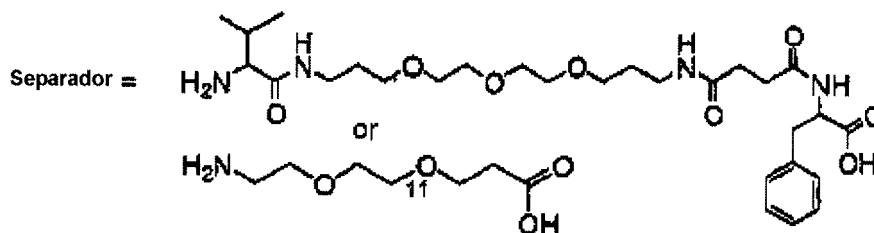
Resultados para selección de proteína de miocitos de la biblioteca 5



R_1 = Cadenas laterales de varios aminoácidos naturales e innaturales (p.ej. 3 -47)

R_2 = Varios grupos acilo

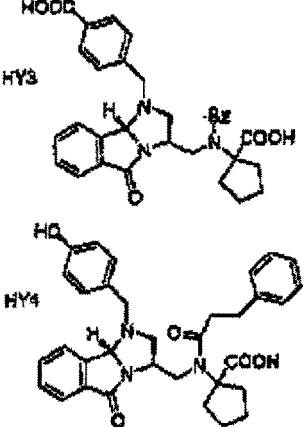
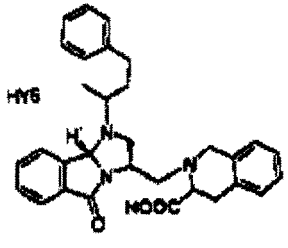
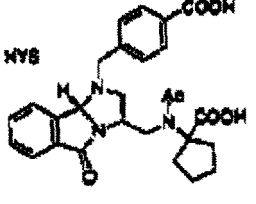
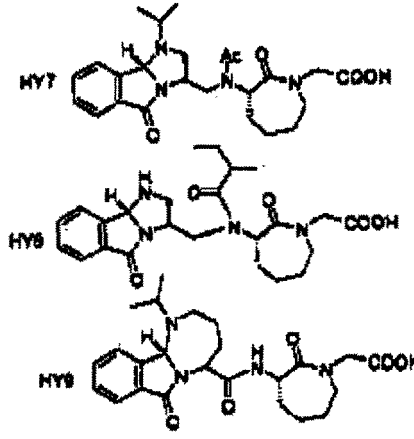
R_3 = Varios arilo y alquilo



Enlazador = Pfl o HMBA

TABLA 14

Lista de ligandos y proteínas identificados para la biblioteca 5 y proteínas de miocitos

Entrada	Ligando identificado	Proteína(s) identificada(s)
Miocitos normales		
1		subunidad B14 de NADH-ubiquinona oxidorreductasa (Q9CQZ5).
2		Miosina Va (Miosin 5A, cadena pesada de miosina diluida, sin músculo (Q9Y411).
Miocitos inducidos con suero		
3		Cadena de miosina (Q63358); factor NF-kappa B-represión (proteína ITBA4 de factor de transcripción) (O15226).
4		Proteína con dedos de zinc 339 (Q9BRPO); homólogo RAD52 de proteína de reparación del ADN (P43351).

La invención pretende ser definida en las siguientes reivindicaciones.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5834318 A [0003]
- US 5783663 A [0003]
- US 9838329A1 PCT [0003]
- WO 0063694 A [0004] [0013]
- WO 0063701 A [0005]
- US 5622699 A [0007]
- US 6306365 A [0007]
- WO 09638553 A, Inoxell [0008]
- US 6153390 A, Rigel [0008]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- PENG *et al. J. Mass Spectrom.*, 2001, vol. 36, 1083-1091 [0009]
- YARMUSH *et al. Annu. Rev. Biomed Eng.*, 2002, vol. 4, 349-373 [0009]
- UNLU *et al. Electrophoresis*, 1997, vol. 18, 2071-2077 [0009]
- GYGI *et al. Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 994-999 [0009]
- WASHBURN *et al. Nat. Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 242-247 [0009]
- DEFRANCESCO *The Scientist*, 1999, vol. 13, 16- [0009]
- DAVIES *et al. Biotechniques*, 1999, vol. 27, 1258-1261 [0010]
- WINSSINGER *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, vol. 40, 3152-3155 [0011]
- BOEIJEN *et al. J. Org. Chem.*, 2001, vol. 66, 8454-8462 [0025]
- MONNEE *et al. Tetrahedron Lett.*, 2000, vol. 41, 7991-95 [0025]
- DOLLE *et al. J. Comb. Chem.*, 2000, vol. 2, 716-31 [0025]
- GRAVEN *et al. J. Comb. Chem.*, 2001, vol. 3, 441-52 [0025] [0033]
- ST. HILAIRE *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2000, vol. 39, 1162-79 [0025]
- JAMES *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2001, vol. 1, 540-6 [0025]
- MARCAURELLE *et al. Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, vol. 6, 289-96 [0025]
- BREINBAUER *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, vol. 41, 2879-90 [0025]
- KHALIL *et al. J. Med. Chem.*, 1999, vol. 42, 2977-87 [0025]
- SMITH *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, vol. 11, 2775-78 [0025]
- THOMPSON *et al. Chem. Rev.*, 1996, vol. 96, 555-600 [0025] [0037]
- AL-OBEIDI *et al. Mol. Biotechnol.*, 1998, vol. 9, 205-23 [0025] [0037]

ES 2 318 266 T3

- NEFZI *et al. Biopolymers*, 2001, vol. 60, 212-9 [0025] [0037]
- DOLLE *J. Comb. Chem.*, 2002, vol. 4, 369-418 [0025] [0037]
- 5 • RENIL *et al. Tetrahedron Lett.*, 1996, vol. 37, 6185-88 [0033] [0035]
- RADEMANN *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, 5459-66 [0033] [0035]
- CHEN *et al. Methods Enzymol.*, 1996, vol. 267, 211-19 [0033]
- 10 • LEON *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, vol. 8, 2997-3002 [0033]
- ST. HILAIRE *et al. J. Comb. Chem.*, 1999, vol. 1, 509-23 [0033]
- 15 • SMITH *et al. J. Comb. Chem.*, 1999, vol. 1, 326-32 [0033]
- PARK *et al. Lett. Peptide Sci.*, 2002, vol. 8, 171-78 [0033]
- MELDAL M. *Tetrahedron Lett.*, 1992, vol. 33, 3077-80 [0035]
- 20 • DOLLE *et al. J. Comb. Chem.*, 2002, vol. 4, 369-418 [0036]
- FURKA *et al. Int. J. Peptide Protein Res.*, 1991, vol. 37, 487-493 [0036] [0182] [0184] [0189] [0249] [0255]
- 25 • LAM *et al. Nature*, 1991, vol. 354, 82-84 [0036] [0182] [0184] [0189] [0249] [0255]
- NICOLAU *et al. Biopolymers*, 2001, vol. 60, 171-193 [0037]
- BACKES *et al. Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, vol. 1, 86-93 [0039]
- 30 • GORDON *et al. J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1999, vol. 74, 835-851 [0039]
- RINK *Tetrahedron Lett.*, 1987, vol. 28, 387- [0039]
- 35 • PLUNKETT *et al. J. Org. Chem.*, 1995, vol. 60, 6006-7 [0039]
- ATHERTON *et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 1981, vol. 1, 538- [0039]
- HOMLES *et al. J. Org. Chem.*, 1995, vol. 60, 2318-2319 [0039]
- 40 • BOEHM *et al. J. Org. Chem.*, 1996, vol. 62, 6498-99 [0039]
- KUNZ *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, vol. 27, 711-713 [0039]
- 45 • KENNER *et al. Chem. Commun.*, 1971, vol. 12, 636-7 [0039]
- 2-D Proteome Analysis Protocols *Humana Press* 1999. [0047]
- Handbook of Fluorescent Probes and Research Products **RICHARD P. HAUGLAND** Molecular Probes Europe
50 BV: Leiden or world 2002. [0048]
- MELDAL *Biopolymers*, 2002, vol. 66, 93-100 [0055]
- YOUNGQUIST *et al. J. Am Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 3900-06 [0059]
- 55 • ST. HILAIRE *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 13312-13320 [0059] [0180] [0246]
- FITCH *Mol. Divers.*, 1998, vol. 4, 39-45 [0060]
- 60 • Analytical Techniques in Combinatorial Chemistry *Marcel Dekker* 2000. [0060]
- GOTFREDSEN *et al. J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2000, vol. 1, 1167-71 [0061]
- BARNES *et al. Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, vol. 4, 346-50 [0062]
- 65 • 2-D Proteome Analysis Protocols *Humana Pr* 1999. [0066]
- COMPAGNINI *et al. Proteomics*, 2001, vol. 1, 967-74 [0066]

ES 2 318 266 T3

- **MILOVIC** *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, 4759-69 [0066]
- 2-D Proteome Analysis Protocols 1999. [0069]
- 5 • **TAMAKI** *et al. J. Org. Chem.*, 2001, vol. 66, 1038-1042 [0175]
- **KAISER** *et al. Anal. Biochem.*, 1970, vol. 34, 595-598 [0182] [0184] [0190]
- 10 • **ATHERTON** *et al. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach Oxford University Press* 1989. 76-79 [0183]
- **ATHERTON** *et al. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach IRL Press at Oxford University Press* 1998. 76-79 [0192]
- 15 • **BUSK** *et al. Cardiovasc. Res.*, 2002, vol. 56, 64-75 [0193]
- **HANAHAN** DNA Cloning *IRL Press Ltd* 1985. vol. 1, 109-135 [0194]
- **ARNOTT** *et al. Anal. Biochem.*, 1998, vol. 258, 1-18 [0195] [0269] [0276]
- 20 • **AUER** *et al. Biochemistry*, 2001, vol. 40, 6628-6635 [0201]
- **MOLLOY** *et al. Eur. J. Biochem.*, 2000, vol. 267, 2871-2881 [0201]
- 25 • **STURROCK** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, vol. 236, 16-19 [0223]
- **YOUNGQUIST** *et al. J. Am Chem. Soc.*, 1995, vol. 117, 3900-3906 [0226]
- **ARNOTT** *et al. Anal. Biochem.*, 1998, vol. 1, 1-18 [0230]
- 30 • **GYGI** *et al. Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, vol. 11, 396-401 [0231]
- **AOKI** *et al. Nat. Med.*, 2000, vol. 6, 183-188 [0233]
- 35 • **JOHNATTY** *et al. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2000, vol. 32, 805-825 [0233]
- **FRIDDLE** *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, 6745-6750 [0233]
- Antibacterial drugs, In: The Merck Manual of Diagnosis and Therapy *Merck & Co* 1999. [0239]
- 40 • Biotechnology of antibiotics *Marcel Dekker* 1997. [0239]
- Section 13: Infectious Disorders Antibacterial drugs *Merck & Co.* 1999. [0239]
- 45 • **MATSUSHITA** *et al. Bioorg. Med. Chem.*, 2002, vol. 10, 855-67 [0240]
- **DESCHENES** *et al. Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, 1700-03 [0240]
- **LYON** *et al. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, 1330-35 [0240]
- 50 • **S. AUREUS Molecular Targets**, 2001, vol. 12, 13- [0240]
- **WILLS** *et al. Emerging Therapeutic Targets*, 2000, vol. 4, no. 3. 1-30 [0240]
- 55 • **WELLS** *et al. Biochemistry*, 1996, vol. 34, 7896-7903 [0240]
- Section 13: Infectious disorders Antibacterial drugs, In The Merck Manual of Diagnosis and Therapy *Merck & Co.* 1999. [0240]
- 60 • **M. Y. GALPERIN E.V. KOONIN** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, vol. 10, 571-578 [0241]
- Novel Approaches for the Identification of Virulence Genes and Drug Targets in Pathogenic Bacteria **JUNAID GAMIELDIEN** Ph.D Dissertation 2001. [0241]
- 65 • **DOLLE** *J. Comb. Chem.*, vol. 4, 369-418 [0246]
- **PIGEON** *et al. Tetrahedron*, 1998, vol. 54, 1497-1506 [0254]

ES 2 318 266 T3

- **CZERWINSKI** *et al.* *PNAS*, 1998, vol. 95, 11520-11524 [0264]
- **ST. HILAIRE** *et al.* *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, 1971-1982 [0264]
- 5 • **RABILLOUD**, T. *Electrophoresis*, 1990, vol. 11, no. 10. 785-94 [0273]
- **RABILLOUD**, T. *Electrophoresis*, 1992, vol. 13, no. 7. 429-39 [0273]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para identificar elementos específicos de un par de unión ligando-proteína previamente desconocido, que incluye las etapas de:
- (a) sintetizar una biblioteca de ligandos sobre perlas de resina para formar una biblioteca de ligandos inmovilizada, donde cada perla de la biblioteca inmovilizada comprende un elemento de la biblioteca de ligandos;
 - 10 (b) incubar la biblioteca de ligandos inmovilizada con dos o más mezclas de proteínas marcadas diferencialmente;
 - (c) detectar un par de unión de proteína-ligando inmovilizado de la mezcla de incubación;
 - 15 (d) identificar el ligando del par de unión de ligando específico; y
 - (e) identificar la proteína del par de unión de proteína-ligando donde el ligando y la proteína identificados son elementos específicos de un par de unión de proteína-ligando diferencial previamente desconocido.
- 20 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la fase de detección de un par de unión de proteína-ligando inmovilizado comprende detectar un ligando de la biblioteca que se une diferencialmente con las mezclas de proteínas marcadas diferencialmente para formar un par de unión de proteína-ligando diferencial.
3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la resina comprende polietilenglicol.
- 25 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la biblioteca comprende pequeñas moléculas orgánicas, y donde dichas pequeñas moléculas orgánicas son compuestos no oligoméricos que contienen carbono con un tamaño inferior a 600 unidades de masa.
- 30 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde cada mezcla de proteína es marcada con una sonda de detección, y donde cada par de unión de proteína-ligando es detectado por detección de la sonda.
6. Proceso según la reivindicación 5, donde al menos una sonda de detección produce fluorescencia.
- 35 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una mezcla de proteínas es derivada de células vivas.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una mezcla de proteínas es una mezcla de proteínas mamíferas.
- 40 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una mezcla de proteínas es una mezcla de proteínas vegetales.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la biblioteca de ligandos es una biblioteca peptídica.
- 45 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la biblioteca de ligandos comprende peptidomiméticos.
- 50 12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos una mezcla de proteínas comprende una familia de proteínas, y donde el par de unión de ligando-proteína es detectado por inmunoensayo.
13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ligando es identificado usando espectrometría de masas.
- 55 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el ligando es identificado usando espectroscopia por RMN.
15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína es identificada usando espectrometría de masas.
- 60 16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo además el aislamiento de una perla de resina que contiene el par de unión de proteína-ligando inmovilizado de la masa de la biblioteca de ligandos.

Figura 1

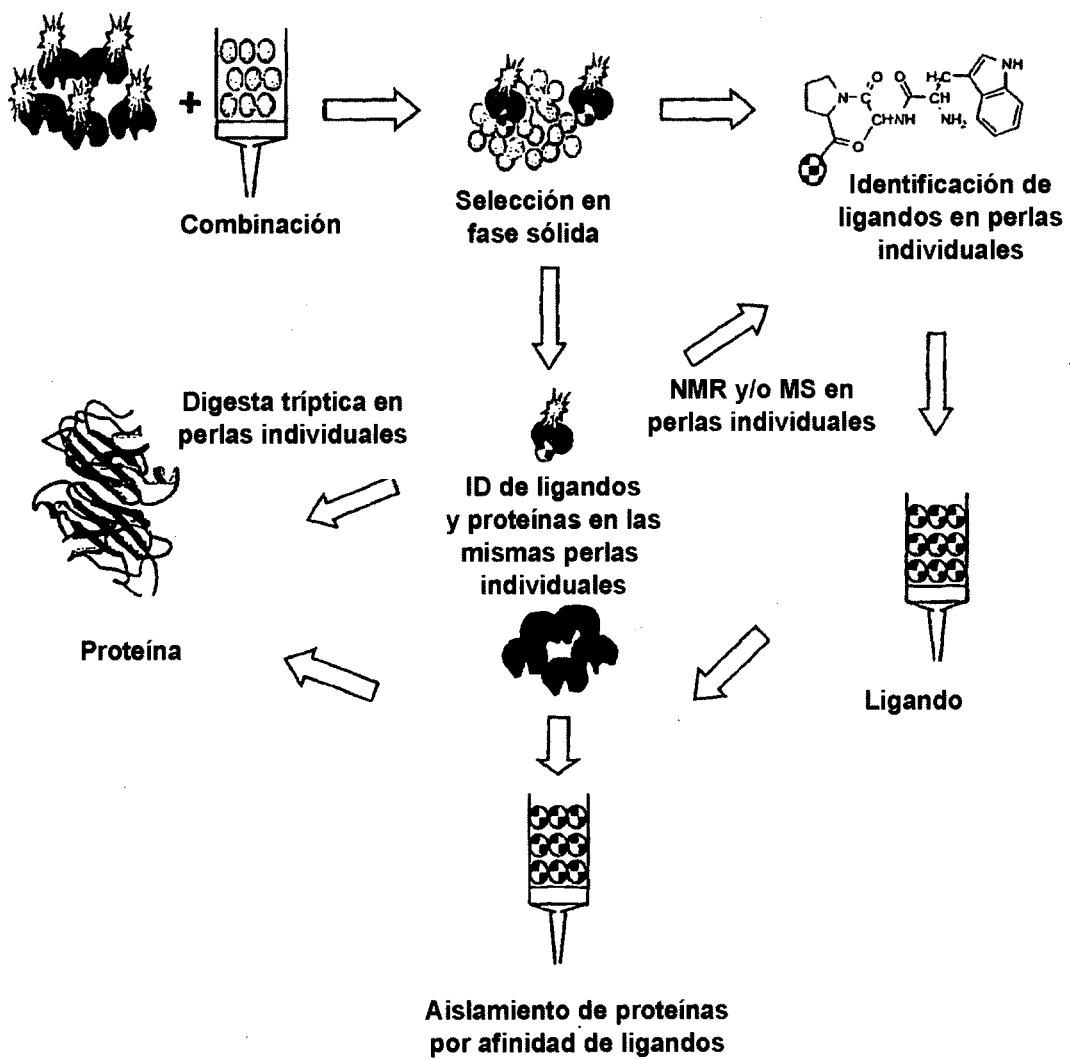


Figura 2

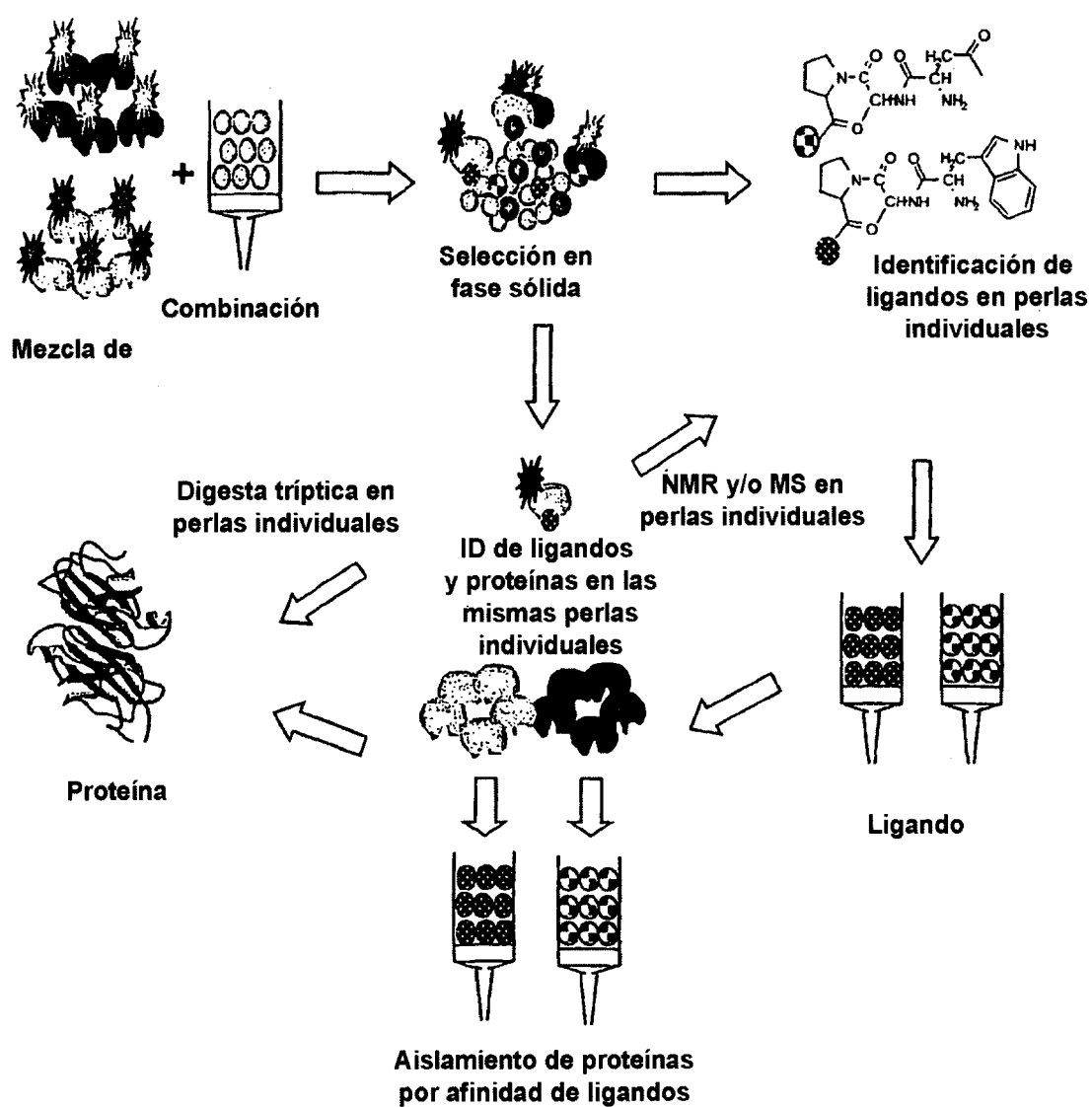
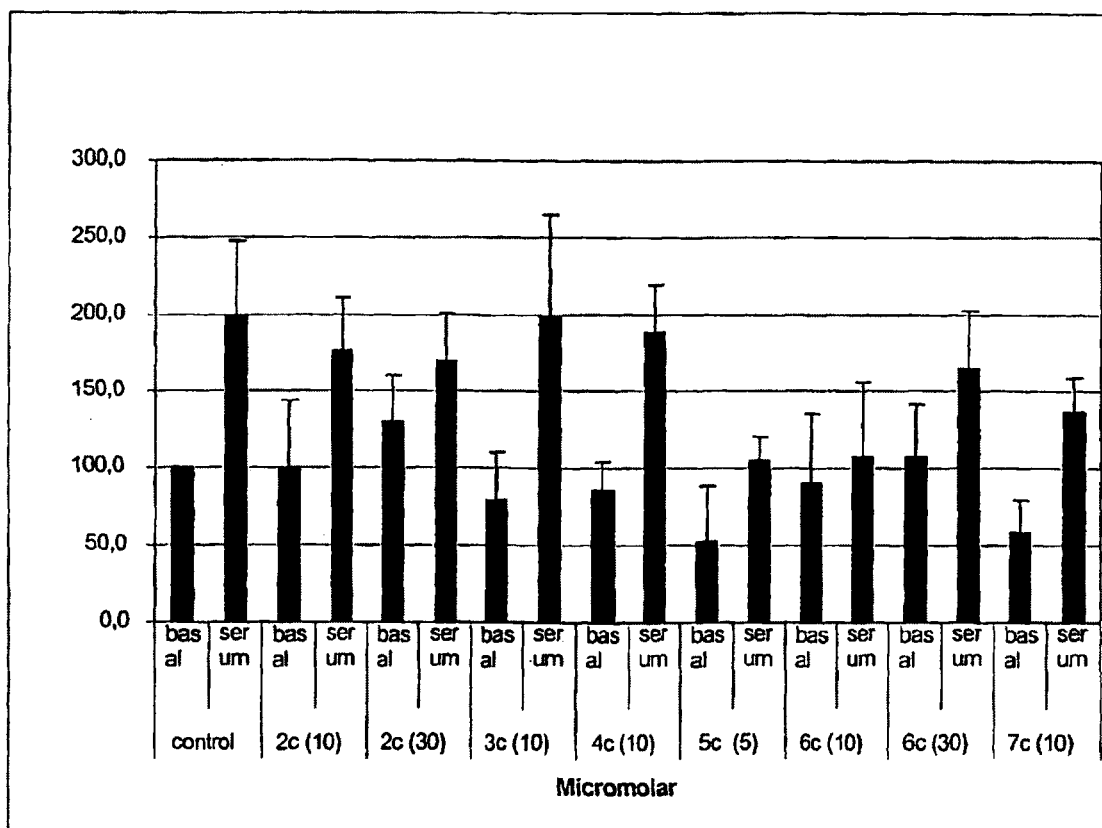


Figura 3



ES 2 318 266 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Carlsberg Research Center
- 5 <120> BÚSQUEDA DE AFINIDAD PARA LIGANDOS Y RECEPTORES DE PROTEÍNAS
- <130> P 782 PC00
- 10 <160> 52
- <170> PatentIn version 3.1
- 15 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Separador peptídico
- 25 <400> 1
Gly Pro Pro Phe Pro Phe
1 5
- 30 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Separador peptídico
- 40 <400> 2
Ala Pro Arg Pro Pro Arg Ala
1 5
- 45 <210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica
- 55 <220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es Pip
- 60 <220>
- 65 <221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (2)..(3)
<223> Xaa es Pal

ES 2 318 266 T3

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
5 <223> Xaa es Pya

<220>
10 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es Pip

15 <400> 3

Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa
1 5

20 <210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

30 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1).. (1)
35 <223> Xaa es Pya

<220>
40 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (2)..(3)
<223> Xaa es Hyp

45 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es Acn

50 <400> 4

Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Tyr
1 5

55 <210> 5
<211> 6
<212> PRT
60 <213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

ES 2 318 266 T3

<400> 6

Phe Xaa Gly His Gly Xaa

5

1

5

10 <210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

20

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (3)..(3)

25

<223> Xaa es Pya

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

30

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Pip

<400> 7

35

Phe Thr Xaa Xaa Asp His

1

5

<210> 8

40

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

50

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Ppy

55

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

60

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Acc

<220>

65

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es Ppy

ES 2 318 266 T3

<220>
<221> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

5 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es Abi

10 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (3)..(4)
<223> Xaa es Hyp

15 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es desconocido

20 <400> 12

25

30 **Xaa Thr Xaa Xaa His Xaa**
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

40 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es Pya

45 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es Gua

50 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (3)..(3)
<223> Xaa es Abi

55 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es ABS

60 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es ABS

65

ES 2 318 266 T3

<400> 13

Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Tyr

5

1 5

<210> 14

10

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

20

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es Abi

25

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

30

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es Abi

<220>

35

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es Che

40

<400> 14

Xaa Phe Xaa Phe Xaa Tyr

1 5

45

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

55

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

60

<223> Xaa es T(Sa)

<400> 15

65

Xaa Phe Asn His Ser

1 5

ES 2 318 266 T3

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica
10 <220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
15 <222> (1)..(1)
<223> Xaa es T(Sa)

<400> 22
20 **Xaa His Trp His Ile**
1 5

<210> 23
25 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>
35 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es T(Sa)

40 <400> 23
45 **Xaa His Trp Val Val**
1 5

<210> 24
<211> 5
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
60 <222> (1)..(1)
<223> Xaa es T(Sa)

65

ES 2 318 266 T3

<400> 24

Xaa His Leu Gly Tyr
1 5

5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

20

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

<400> 25

25

Xaa Ile Tyr Leu Phe
1 5

30

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

40

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

45

<400> 26

Xaa Phe Gly Leu Met
1 5

50

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

55

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

65

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

ES 2 318 266 T3

<400> 27

	Xaa	Trp	Val	Asn	Met
	1				5

5

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica
15

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
20 <222> (1)..(1)
<223> Xaa es T(Sa)

<400> 28

	Xaa	Met	Val	Asn	Trp
	1				5

25

<210> 29
30 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>
40 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es T(Sa)

45 <400> 29

	Xaa	His	Ile	Gly	Tyr
	1				5

50

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
65 <222> (1)..(1)
<223> Xaa es T(Sa)

ES 2 318 266 T3

<400> 30

Xaa Leu Tyr Leu Phe
1 5

5

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

20

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa es T(Sa)

<400> 31

25

Xaa His Trp His Leu
1 5

<210> 32

30

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

40

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

45

<400> 32

Xaa Phe Val Trp His
1 5

50

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

60

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

65

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

ES 2 318 266 T3

<400> 33
 Xaa Leu Tyr Ile Phe
 1 5

5 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

15 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
20 <223> Xaa es ManS

 <220>
25 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es ManS

30 <400> 34
 Xaa Gly Xaa Asp Asn Ala
 1 5

35 <210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

45 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
50 <223> Xaa es ManS

 <220>
55 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es GlcNN

60 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (5)..(5)
65 <223> Xaa es ManS

ES 2 318 266 T3

<400> 35

Xaa Gly Xaa Asn Xaa Tyr
1 5

5

<210> 36

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

20 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es ManN

<400> 36

25

Xaa Phe Trp Ser Lys His
1 5

30 <210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

40 <220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

45 <223> Xaa es GlcNN

<400> 37

Xaa Trp Phe Asp Trp Pro
1 5

50

<210> 38

<211> 6

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

65 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es GlcNN

ES 2 318 266 T3

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (3)..(3)
5 <223> Xaa es GlcNN

<220>
10 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es ManS

15 <400> 38
Xaa Val Xaa His Xaa Gly
1 5

20 <210> 39
<211> 6
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

30 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
35 <223> Xaa es ManN

<220>
40 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es ManS

45 <220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (3)..(3)
<223> Xaa es ManN
50 <400> 39
Xaa Xaa Xaa Trp Ser Trp
1 5

55 <210> 40
<211> 6
60 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

ES 2 318 266 T3

<400> 40

Gly Pro Lys Lys Tyr His
1 5

5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<400> 41

His Thr Trp Gly Tyr Trp
1 5

20

<210> 44

<211> 6

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Ligando de unión

<400> 44

35

Gly Pro Lys Lys Tyr His
1 5

40

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

50

<223> Ligando de unión

<400> 45

His Thr Trp Gly Tyr Trp
1 5

55

<210> 46

<211> 6

60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

65

<221> MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Ligando de unión

ES 2 318 266 T3

<400> 46

<210> 41

5 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Ligando de unión de la biblioteca peptídica

<400> 41

15
His Thr Trp Gly Tyr Trp
1 5

20 <210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<223> Ligando de unión

30 <400> 44

35
Gly Pro Lys Lys Tyr His
1 5

<210> 45

40 <211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<223> Ligando de unión

50 <400> 45

His Thr Trp Gly Tyr Trp
1 5

55 <210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<223> Ligando de unión

65

ES 2 318 266 T3

<400> 58

Phe Asp Trp Xaa Thr Xaa
1 5

5

<210> 59

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<223> Ligando de unión

<220>

20 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

25

<400> 59

Xaa Tyr Gly Ala Met
1 5

30

<210> 60

<211> 5

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<223> Ligando de unión

<220>

45 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es T(Sa)

50

<400> 60

Xaa Ser Val Trp Phe
1 5

55

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

60 <213> Artificial

<220>

65 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<223> Ligando de unión

