



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 797**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07717962 .0**

96 Fecha de presentación : **13.03.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1866433**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54 Título: **Métodos para la identificación de moléculas que interactúan con LRRK2 y para la purificación de LRRK2.**

30 Prioridad: **14.03.2006 US 782119 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.09.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.09.2009

73 Titular/es: **CELLZOME AG.**
Meyerhofstrasse 1
69117 Heidelberg, DE

72 Inventor/es: **Drewes, Gerard;**
Hopf, Carsten y
Reader, Valerie

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

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

Métodos para la identificación de moléculas que interactúan con LRRK2 y para la purificación de LRRK2.

5 La presente invención se relaciona con métodos para la identificación de moléculas que interactúan con LRRK2 y para la purificación de LRRK2 utilizando al ligando 91 de indol como ligando para LRRK2. Además, la presente invención se relaciona con composiciones farmacéuticas que incluyen a dichas moléculas, por ejemplo para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

10 La enfermedad de Parkinson (PD) [OMIM168600, Online Mendelian Inheritance in Man (OMM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=168600>] es un trastorno de movimientos heterogéneos caracterizado por la degeneración de neuronas dopaminérgicas dentro de la sustancia negra de los ganglios basales. Afecta al 2% de la población mayor de 60 años.

15 Las estrategias terapéuticas actuales para la PD se enfocan principalmente en reducir la severidad de sus síntomas utilizando medicamentos dopaminérgicos (por ejemplo, Levodopa/Carbidopa). Aunque proporcionan beneficios a los pacientes, estos medicamentos presentan efectos secundarios adversos y pueden hacerse ineficientes después e un tratamiento prolongado (efecto de desgaste). Ninguno de estos tratamientos aborda el problema subyacente, la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas.

20 En términos generales, existen dos componentes clínico patológicos de la PD. En primer lugar, existe un parkinsonismo clínicamente definido, un período sindrómico que incluye las características cardinales del trastorno del movimiento Parkinsoniano. Existen un temblor en reposo, bradiquinesia (lentitud de movimiento), rigidez e inestabilidad postural, todos problemas al iniciar o al finalizar los movimientos. Su correlato patológico es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. En segundo lugar, la enfermedad de Parkinson está marcada después de la muerte por la presencia de cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy en neuronas sobrevivientes. Estos son agregados intracelulares de lípidos y proteínas incluidos ubiquitina y alfa sinucleína. Las definiciones patológicas de la PD requieren de la presencia de la patología de Lewy positiva para alfa sinucleína en neuronas sobrevivientes de la sustancia negra, junto con pérdida de células de la sustancia negra y neuronas estriatales intactas (Cookson, 2005. Annual Reviews in Biochemistry 74, 29-52).

30 La teoría céntrica de la alfa sinucleína de la agregación de proteína ha sido complementada en años recientes por el descubrimiento de las proteínas DJ1, PINK1 y OMI/HTRA2, todas las cuales están asociadas con la mitocondria y han sido implicadas en la protección celular contra daño oxidativo (Abou-Sleiman y colaboradores, 2006. Nature Reviews Neuroscience 7, 207-219).

35 Se ha presentado recientemente evidencia genética de que las mutaciones de las repeticiones de quinasa 2 ricas en Leucina (LRRK2, sinónimo de Dardarina) provocan PD autosomal dominante previamente enlazada al locus PARK8. Las mutaciones de LRRK2 se estima que representan del 5 al 6% de los casos de la PD con una historia familiar positiva, y fueron también identificadas en casos esporádicos. LRRK2 codifica una proteína grande de múltiples dominios que consiste de repeticiones N terminales ricas en leucina, un dominio ROC/COR de GTPasa, una proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (MAPKKK) y repeticiones WD40 C terminales (Paisan-Ruiz y colaboradores, 2004. Neuron 44, 595-600; Zimprich y colaboradores, 2004. Neuron 44, 601-607). Paisan-Ruiz y colegas llamaron al producto proteico dardarina, derivada de la palabra vasca "dardara" que significa temblor, pero la proteína fue renombrada luego LRRK2.

45 Actualmente, se sabe poco acerca de la función de LRRK2 pero se han hecho observaciones preliminares en sistemas de sobreexpresión *in vitro*. LRRK2 codifica una proteína quinasa y es capaz de autofosforilación (West y colaboradores, 2005. PNAS 102, 16842-16847, Gloeckner y colaboradores, 2005. Hum. Mol. Genet. 15, 223-232). La publicación de West y colaboradores, describe la purificación de LRRK2 recombinante con la ayuda de un anticuerpo específico. Sin embargo, la cantidad de proteína obtenida fue muy pequeña.

50 Significativamente, tres mutaciones de LRRK2 asociadas con PD, dos en el dominio de la quinasa (G2019S y L2020T) y una en el dominio de la GTPasa de ROC/COR (R1441C) incrementan la autofosforilación de LRRK2, sugiriendo un mecanismo dominante de ganancia de función. En realidad, la sobreexpresión de R1441C, Y1699C o G2019S mutantes de LRRK2 es suficiente para inducir degeneración neuronal en neuronas corticales primarias de ratón (Smith y colaboradores, 2005. PNAS 102, 18676-18681).

Además, la manipulación de la actividad de la quinasa de LRRK2 por medio del reemplazo del dominio de la quinasa con una versión mutada de "quinasa muerta" bloquea la formación de cuerpos de inclusión y retrasa la muerte celular, dos fenotipos celulares de PD (Greggio y colaboradores, 2006. Neurobiol. Dis. 23(2), 329-341). Esta observación sugiere que los inhibidores de quinasa serán agentes terapéuticos útiles para pacientes con mutaciones de LRRK2 y presumiblemente también PD esporádica.

65 El reciente descubrimiento de que las mutaciones de LRRK2 conducen a un inicio tardío de la PD con patología pleomórfica, incluida la patología de sinucleína alfa, tau y ubiquitina colocan a places LRRK2 secuencia arriba en una ruta neurodegenerativa común para parkinsonismo. Por lo tanto, LRRK2 se ha convertido en un objetivo terapéutico atractivo para intervención y neuroprotección en la enfermedad de Parkinson (Taylor y colaboradores, 2006. Trends in Molecular Medicine 12, 76-82).

ES 2 325 797 T3

WO 02/081466 describe derivados de pirrol-indolinona como inhibidores de la serina/treonina quinasa (mismo grupo que LRRK2).

5 WO 2004/006838 describe métodos de selección de compuestos que modulan la actividad de proteína quinasa, incluida LRRK2 (SEQ ID NO: 117).

En vista de lo anterior, existe la necesidad de proveer métodos efectivos para la identificación de compuestos que interactúan con LRRK2 así como de métodos para la purificación de LRRK2.

10 Para cumplir con este requisito, la invención proporciona en un primer aspecto, un método para la identificación de un compuesto que interactúa con LRRK2, que comprende las etapas de

- a) proveer una preparación de proteína que contenga LRRK2,
- 15 b) poner en contacto la preparación de proteína con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizada sobre un soporte sólido bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2,
- 20 c) incubar al complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 con un compuesto dado, y
- d) determinar si el compuesto es capaz de separar LRRK2 del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida).

25

Además, en un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de un compuesto que interactúa con LRRK2, que comprende las etapas de:

- 30 a) proveer una preparación de proteína que contenga LRRK2,
- b) poner en contacto la preparación de proteína con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizada sobre un soporte sólido y con un compuesto dado bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2, y
- 35 c) detectar al complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 formado en la etapa b).

40

En un tercer aspecto preferido, la invención provee un método para la identificación de un compuesto que interactúa con LRRK2, que comprende las etapas de:

- 45 a) proveer dos alícuotas de una preparación de proteína que contenga LRRK2,
- b) poner en contacto una alícuota con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizado sobre un soporte sólido bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2,
- 50 c) poner en contacto la otra alícuota con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizado sobre un soporte sólido y con un compuesto dado bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2, y
- 55 d) determinar la cantidad de complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 formado en las etapas b) y c).

60

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que el (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) es un ligando para LRRK2. Esto permite el uso del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) en ensayos de selección, esto es en ensayos competitivos de selección así como en métodos para la purificación de LRRK2.

65

La estructura del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) también ligando 91), se da en la Fig. 1. Este compuesto es una molécula estructuralmente similar al inhibidor de quinasa de Sutent (SU11248; Sun y colaboradores, 2003. J. Med. Chem. 46, 1116-1119). El (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) puede ser acoplado en forma covalente a un material adecuado que sirve de soporte sólido a través del grupo amino primario y ser utilizado para el aislamiento de proteínas de enlazamiento. La síntesis del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) es descrita en el Ejemplo 1. De acuerdo con la invención, la expresión “(ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidroindol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)” también incluye compuestos que contienen un núcleo idéntico pero que tienen otro enlazador, preferiblemente acoplado al grupo NH que no hace parte de las estructuras cíclicas, para enlazamiento al soporte sólido. Típicamente, los enlazadores pueden tener una columna vertebral de 8, 9 ó 10 átomos y pueden contener ya sea un grupo activo carboxilo o un grupo activo amino.

De acuerdo con la presente invención, la expresión “LRRK2” no solamente significa la proteína como se muestra en la Figura 3 sino también un derivado funcionalmente activo de la misma, o un fragmento funcionalmente activo de la misma, o un homólogo de la misma, o una variante codificada por un ácido nucleico que hibrida al ácido nucleico que codifica dicha proteína bajo condiciones poco rigurosas. Preferiblemente, estas condiciones poco rigurosas incluyen hibridación en un amortiguador que contiene 35% de formamida, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, BSA al 0,02%, 100 µg/ml de ADN de esperma desnaturalizado de salmón, y sulfato de dextrano al 10% (p/v) durante 18-20 horas a 40°C, lavando en un amortiguador que consiste de 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% durante 1-5 horas a 55°C, y lavando en un amortiguador que consiste de 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% durante 1,5 horas a 60°C.

Además, de acuerdo con la presente invención, la expresión “LRRK2” incluye formas mutantes de LRRK2, preferiblemente tales formas mutantes que se observan en la PD (en formas familiares así como en casos esporádicos). Las mutaciones en el gen que codifica para LRRK2 se ha demostrado que causan la PD dominante autosomal familiar (West y colaboradores, 2005. PNAS 102, 16842-16847). Más preferiblemente, estas formas mutantes incluyen mutaciones de aminoácidos individuales.

La sustitución de un solo aminoácido G2019S es una de las mutaciones más frecuentemente observadas (Taylor y colaboradores, 2006. Trends in Molecular Medicine 12, 76-82). Esta mutación se localiza en el dominio de la quinasa dentro de una región conservada del bucle de activación sugiriendo que la modulación de la actividad de la quinasa puede estar involucrada en el mecanismo patogénico. Otras mutaciones observadas en la PD incluyen R1441C, Y1699C, y I2020T (ver la Tabla 2 de Taylor y colaboradores).

Por lo tanto, en una modalidad preferida, la expresión “LRRK2” también incluye una proteína LRRK2 que tiene una mutación G2019S, R1441C, Y1699C, o I2020T. Más preferiblemente, la expresión “LRRK2” también incluye una proteína LRRK2 que tiene una de las siguientes mutaciones individuales: G2019S, R1441C, Y1699C, o I2020T.

Además, se han identificado 15 sustituciones adicionales de aminoácidos putativamente patógenos en LRRK2 (Taylor y colaboradores, 2006. Trends in Molecular Medicine 12, 76-82, ver especialmente la Fig. 2).

Por lo tanto, en una modalidad preferida, la expresión “LRRK2” también incluye una proteína LRRK2 que tiene una mutación R793M, Q930R, R1067Q, S1096C, I1122V, S1228T, I1371V, R1441G, R1441H, R1514Q, M1869T, R1941H, I2012T, T2356I o G2385R. Más preferiblemente, la expresión “LRRK2” también incluye una proteína LRRK2 que tiene una de las siguientes mutaciones individuales: R793M, Q930R, R1067Q, S1096C, I1122V, S1228T, I1371V, R1441G, R1441H, R1514Q, M1869T, R1941H, I2012T, T2356I o G2385R.

En los métodos de la invención, se proporciona primero una preparación de proteína que contiene LRRK2. Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo con una preparación de proteína como material de partida, mientras se solubiliza la LRRK2 en la preparación. Los ejemplos incluyen una mezcla líquida de varias proteínas, un lisado parcial de células que no contiene a todas las proteínas presentes en la célula original o una combinación de diferentes lisados celulares.

Los lisados parciales de células se pueden obtener primero por medio del aislamiento de organelos celulares (por ejemplo núcleos, mitocondrias, ribosomas, Golgi etc.) y luego por medio de la preparación de preparaciones de proteína derivadas de estos organelos. Los métodos para el aislamiento de organelos celulares son conocidos en el arte (Capítulo 4.2 Purification of Organelles from Mammalian Cells en “Current Protocols in Protein Science”, Editors: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8).

Además, se pueden preparar las preparaciones de proteína por medio de fraccionamiento de extractos celulares enriqueciendo de este modo tipos específicos de proteína tales como proteínas citoplasmáticas o de membrana (Capítulo 4.3 Subcellular Fractionation of Tissue Culture Cells en “Current Protocols in Protein Science”, Editors: John.E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8).

Además, se pueden utilizar preparaciones de proteína de fluidos corporales (por ejemplo sangre, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal y orina).

Por ejemplo, se pueden utilizar lisados de embriones completos derivados de etapas definidas de desarrollo o etapas adultas de organismos modelo tales como *C. elegans*. Además, órganos completos tales como corazones disecados de ratones pueden ser la fuente de preparaciones de proteína. Estos órganos pueden ser también bombeados *in vitro* con el propósito de obtener una preparación de proteína.

Además, la preparación de proteína puede ser una preparación que contiene LRRK2 que ha sido producida en forma recombinante. Los métodos para la producción de proteínas recombinantes en células procariotas y eucariotas están completamente establecidos (Capítulo 5 Production of Recombinant Proteins en “Current Protocols in Protein Science”, Editors: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, 1995, ISBN: 0-471-14098-8).

En una modalidad preferida de los métodos de la invención, la provisión de una preparación de proteína incluye las etapas de cosechar al menos una célula que contiene LRRK2 y lisarla.

En una modalidad preferida, la célula es parte de un sistema de cultivo celular y los métodos para cosechar una célula de un sistema de cultivo celular son conocidos en el arte (ver la literatura más arriba).

La escogencia de la célula dependerá principalmente de la expresión de LRRK2, ya que se debe garantizar que la proteína esté presente principalmente en la célula de escogencia. Con el propósito de determinar si una célula dada es un sistema adecuado de partida para los métodos de la invención, métodos tales como transferencias tipo Western, métodos de detección de ácidos nucleicos con base en PCR, transferencias tipo Northern y métodos de microarreglos de ADN (“chips de ADN”) podrían ser adecuados con el propósito de determinar si una proteína dada de interés está presente en la célula.

La escogencia de la célula estará también influenciada por el propósito del estudio. Si se requiere analizar la eficacia *in vivo* para un fármaco dado entonces se seleccionarán las células o los tejidos en los cuales se presenta el efecto terapéutico deseado (por ejemplo, tejido cerebral para fármacos antineurodegenerativos). Por el contrario, para la elucidación de proteínas objetivo que medien efectos secundarios no deseados, se analizará la célula o el tejido en el cual se observa el efecto secundario (por ejemplo tejido de hígado para el metabolismo de la droga).

Además, está concebido dentro de la presente invención que las células que contienen LRRK2 se puedan obtener a partir de un organismo, por ejemplo por medio de una biopsia. Los métodos correspondientes son conocidos en el arte. Por ejemplo, una biopsia es un procedimiento diagnóstico utilizado para obtener una pequeña cantidad de tejido, que puede ser luego examinada microscópicamente o con métodos bioquímicos. Las biopsias son importantes para diagnosticar, clasificar y representar una enfermedad, pero también para evaluar y monitorear el tratamiento con un fármaco.

Esta comprendido dentro de la presente invención que por medio de la recolección de al menos una célula, se lleva a cabo simultáneamente la lisis. Sin embargo, se prefiere igualmente que la célula sea primero cosechada y luego lisada en forma separada.

Los métodos para la lisis de las células son conocidos en el arte (Karwa y Mitra: Sample preparation for the extraction, isolation, and purification of Nuclei Acids; capítulo 8 en “Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry”, Wiley 2003, Editor: Somenath Mitra, ISBN para impreso: 0471328456; ISBN en línea: 0471457817). La lisis de diferentes tipos de células y tejidos se puede lograr por medio de homogenizadores (por ejemplo, el homogenizador de Potter), desintegradores ultrasónicos, lisis enzimática, detergentes (por ejemplo, NP-40, Triton X-100, CHAPS, SDS), choque osmótico, congelación y descongelación repetidas, o una combinación de estos métodos.

De acuerdo con los métodos de la invención, se pone en contacto la preparación de proteína con ligando 91 de indol inmovilizado sobre un soporte sólido bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de ligando 91 de indol-LRRK2.

En la presente invención, el término “un complejo de ligando 91 de indol-LRRK2” indica un complejo donde el ligando 91 de indol interactúa con LRRK2, por ejemplo por medio de enlazamiento covalente o, más preferiblemente, por medio de un enlace no covalente.

La persona capacitada sabrá que condiciones se pueden aplicar con el propósito de permitir la formación del complejo ligando 91 de indol-LRRK2.

En el contexto de la presente invención, el término “bajo condiciones que permitan la formación del complejo” incluye todas las condiciones bajo las cuales es posible tal formación, preferiblemente tal enlazamiento. Esto incluye la posibilidad de tener el soporte sólido sobre una fase inmovilizada y verter el lisado sobre él. En otra modalidad preferida, también está incluido que el soporte sólido sea en forma de partículas y mezclada con el lisado celular.

En el contexto del enlazamiento no covalente, el enlazamiento entre el ligando 91 de indol y LRRK2 es, por ejemplo, a través de puentes de sales, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas o una combinación de los mismos.

En una modalidad preferida, las etapas de la formación del complejo del ligando 91 de indol-LRRK2 se llevan a cabo bajo condiciones esencialmente fisiológicas. El estado físico de las proteínas dentro de las células está descrito en Petty, 1998 (Howard R. Petty, Capítulo 1, Unidad 1.5 en: Juan S. Bonifacino, Mary Dasso, Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Kenneth M. Yamada (eds.) Current Protocols in Cell Biology Copyright© 2003 John Wiley & Sons, Inc. Todos los derechos reservados. DOI: 10.1002/0471143030.cb0101s00 Fecha de Envío en Línea: Mayo, 2001 Fecha de Publicación en Imprenta: Octubre, 1998).

El contacto bajo condiciones esencialmente fisiológicas tiene la ventaja de que las interacciones entre el ligando, la preparación de la célula (esto es, la enzima que va a ser caracterizada) y opcionalmente el compuesto reflejan en la medida de lo posible las condiciones naturales. “Condiciones esencialmente fisiológicas” son entre otras aquellas condiciones que están presentes en el material original de la muestra no procesada. Ellas incluyen la concentración fisiológica de la proteína, el pH, la concentración salina, la capacidad amortiguadora y las modificaciones posteriores a la traducción de las proteínas involucradas. El término “condiciones esencialmente fisiológicas” no requiere de condiciones idénticas a aquellas en el organismo vivo original, de donde se deriva la muestra, sino esencialmente de condiciones como las de las células o condiciones cercanas a las condiciones celulares. La persona capacitada en el arte, desde luego, se dará cuenta que pueden surgir ciertas limitaciones debido a la puesta en marcha experimental que eventualmente conducirá a condiciones menos parecidas a las de las células. Por ejemplo, la ruptura eventualmente necesaria de las paredes celulares o de membranas celulares cuando se toma y se procesa una muestra de un organismo vivo puede requerir de condiciones que no son idénticas a las condiciones fisiológicas encontradas en el organismo. Las variaciones adecuadas de las condiciones fisiológicas para llevar a cabo los métodos de la invención serán evidentes para aquellos capacitados en el arte y están abarcadas por el término “condiciones esencialmente fisiológicas” como se lo utiliza aquí. En resumen, se entiende que el término “condiciones esencialmente fisiológicas” se relaciona con condiciones cercanas a las condiciones fisiológicas, como se encuentran por ejemplo en células naturales, pero no necesariamente se requiere que esas condiciones sean idénticas.

Preferiblemente, “condiciones esencialmente fisiológicas” pueden incluir NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-45°C, y un catión divalente 0,001-10 mM (por ejemplo Mg^{++} , Ca^{++}); más preferiblemente aproximadamente NaCl o KCl 150 mM, pH 7,2 a 7,6, un catión divalente 5 mM y a menudo incluye 0,01-1,0 por ciento de proteína no específica (por ejemplo BSA). Un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton-X100) puede a menudo estar presente, usualmente aproximadamente entre 0,001 y 2%, típicamente entre 0,05 y 0,2% (volumen/volumen). Como guía general, se pueden aplicar las siguientes condiciones acuosas amortiguadas: NaCl 10-250 mM, Tris HCl 5-50 mM, pH 5-8, con adición opcional de un catión(es) divalente(s) y/o de quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos.

En el contexto de la presente invención, se inmoviliza el ligando 91 de indol sobre un soporte sólido. A todo lo largo de la invención, el término “soporte sólido” se relaciona con cada soporte no disuelto que sea capaz de inmovilizar un ligando de molécula pequeña sobre su superficie.

De acuerdo con una modalidad preferida adicional, se selecciona el soporte sólido del grupo que consiste de agarosa, agarosa modificada, gránulos de sefarosa (por ejemplo, sefarosa activada con NHS), látex, celulosa, y partículas ferrosas o ferromagnéticas.

El ligando 91 de indol se puede acoplar al soporte sólido ya sea en forma covalente o no covalente. El enlazamiento no covalente incluye al enlazamiento a través de ligandos de afinidad de biotina que se enlazan con matrices de estreptavidina.

Preferiblemente, el ligando 91 de indol se acopla en forma covalente con el soporte sólido.

Antes del acoplamiento, las matrices pueden contener grupos activos tales como NHS, Carbodiimida, etc. para permitir la reacción de acoplamiento con el ligando 91 de indol. El ligando 91 de indol se puede acoplar con el soporte sólido por medio de acoplamiento directo (por ejemplo, utilizando grupos funcionales tales como grupos amino, sulfhidrilo, carboxilo, hidroxilo, aldehído y cetona) y por medio de acoplamiento indirecto (por ejemplo, a través de biotina, estando la biotina enlazada covalentemente al ligando 91 de indol y enlazada en forma no covalente a estreptavidina que está enlazada directamente a un soporte sólido).

El enlazamiento con el material sólido de soporte puede involucrar enlazadores que se pueden escindir y que no se pueden escindir. La escisión se puede lograr por medio de ruptura enzimática o por tratamiento con métodos químicos adecuados.

Las interfaces de enlazamiento preferidas para enlazamiento del ligando 91 de indol con el material sólido de soporte son enlazadores con una columna vertebral de átomos de carbono. Típicamente los enlazadores tienen una columna vertebral de 8, 9 ó 10 átomos. Igualmente preferidos son los enlazadores de polietilenglicol (PEG).

La persona capacitada se dará cuenta que entre las etapas individuales de los métodos de la invención, pueden ser necesarias etapas de lavado. Tal lavado hace parte del conocimiento de la persona capacitada en el arte. El lavado sirve para remover los componentes no enlazados del lisado celular del soporte sólido. Las interacciones no específicas de enlazamiento (por ejemplo, iónicas simples) se pueden minimizar por medio de la adición de bajos niveles de detergente o por medio de ajustes moderados con concentraciones de sal en el amortiguador de lavado.

De acuerdo con los métodos de identificación de la invención, el sistema de lectura es ya sea para la detección o la determinación de LRRK2 (primer aspecto de la invención), para la detección del complejo de ligando 91 de indol-LEEK2 (segundo aspecto de la invención), para la determinación de la cantidad de complejo ligando 91 de indol-LRRK2 (tercer aspecto de la invención).

La detección del complejo de ligando 91 de indol-LRRK2 de acuerdo con el segundo aspecto de la invención se puede llevar a cabo por medio de la utilización de anticuerpos marcados dirigidos contra LRRK2 y los métodos para su uso son conocidos en el arte, al igual que los métodos para marcación de anticuerpos (por ejemplo con colorantes fluorescentes). Los anticuerpos anti-LRRK2 se encuentran comercialmente disponibles (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Además, los anticuerpos dirigidos a formas mutadas de LRRK2 (por ejemplo las sustituciones de los aminoácidos G2019S e I2020T observados en formas familiares de la PD) se encuentran comercialmente disponibles (Abgent, San Diego, CA, EUA).

Sin embargo, en el transcurso del segundo y tercer aspectos de la invención, se prefiere que LRRK2 se separe del ligando 91 indol inmovilizado.

De acuerdo con la invención, separación significa cada acción que destruya las interacciones entre el ligando 91 de indol y LRRK2. Esto incluye, en una modalidad preferida, la elución de LRRK2 del ligando 91 de indol inmovilizado.

La elución se puede lograr por medio del uso de reactivos no específicos como se describe en forma detallada más adelante (fuerza iónica, valor de pH, detergentes). Además, se puede analizar si un compuesto de interés puede eluir específicamente LRRK2. Se describen tales compuestos que interactúan con LRRK2 adicionalmente en las siguientes secciones.

Tales métodos no específicos para destruir la interacción son bien conocidos en el arte y dependen de la naturaleza de la interacción enzima ligando. Principalmente, el cambio de fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura o la incubación con detergentes son métodos adecuados para disociar las enzimas objetivo del ligando inmovilizado. La aplicación de un amortiguador de elución puede disociar parejas de enlazamiento por medio de valores extremos de pH (pH alto o bajo; por ejemplo, disminuyendo el pH por medio del uso de citrato 0,1 M, pH 2-3), el cambio de fuerza iónica (por ejemplo, alta concentración de sal utilizando NaI, KI, MgCl₂, o KCl), agentes de reducción de la polaridad que rompen las interacciones hidrófobas (por ejemplo, dioxano o etilén glicol), o agentes desnaturizantes (sales caotrópicas o detergentes tales como dodecil sulfato de sodio, SDS; revisar: Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography).

En algunos casos, el soporte sólido tiene que ser preferiblemente separado del material liberado. Los métodos individuales para esto dependen de la naturaleza del soporte sólido y son conocidos en el arte. Si el material de soporte está contenido dentro de una columna, se puede recolectar el material liberado como flujo directo a través de la columna. En el caso en que se mezcle el material de soporte con los componentes del lisado (llamado procedimiento por tandas) puede ser necesaria una etapa adicional de separación tal como una centrifugación suave y se recolecta el material liberado como sobrenadante. Alternativamente, se pueden utilizar bolitas magnéticas como soporte sólido de tal manera que se puedan eliminar las bolitas de la muestra por medio del uso de un dispositivo magnético.

En la etapa d) del método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, se determina si LRRK2 ha sido separada de la LRRK2 inmovilizada. Esto puede incluir la detección de LRRK2 o la determinación de la cantidad de LRRK2.

Consecuentemente, en modalidades preferidas de todos los métodos de identificación de la invención, se utilizan métodos para la detección de LRRK2 o para la determinación de su cantidad. Tales métodos son conocidos en el arte e incluyen métodos fisicoquímicos tales como secuenciación de proteína (por ejemplo, degradación de Edman), análisis por medio de métodos de espectrometría de masas o métodos de inmunodetección que emplean anticuerpos dirigidos contra LRRK2.

Preferiblemente, se detecta LRRK2 o se determina la cantidad de LRRK2 por medio de métodos de espectrometría de masas o de inmunodetección.

La identificación de proteínas con análisis espectrométrico de masas (espectrometría de masas) es conocida en el arte (Shevchenko y colaboradores, 1996, Analytical Chemistry 68: 850-858; Mann y colaboradores, 2001, Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, Annual Review of Biochemistry 70, 437-473) y se ilustra adicionalmente en la sección de ejemplos.

Preferiblemente, el análisis por espectrometría de masas se lleva a cabo en una forma cuantitativa, por ejemplo por medio del uso de tecnología iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta) o cICAT (etiquetas escindibles de afinidad codificadas por isótopos) (Wu y colaboradores, 2006, J. Proteome Res. 5, 651-658).

De acuerdo con una modalidad preferida adicional de la presente invención, la caracterización por medio de espectrometría de masas (MS) se lleva a cabo por medio de la identificación de péptidos proteotípicos de LRRK2. El concepto de péptidos proteotípicos se describe en detalle en la sección de los ejemplos. La idea es que LRRK2 se digiere con proteasas y se determinan los péptidos resultantes por medio de MS. Como resultado, las frecuencias de

péptidos para péptidos de la misma proteína fuente difieren en alto grado, siendo los péptidos más frecuentemente observados que “típicamente” contribuyen a la identificación de esta proteína, “péptidos proteotípicos”. Por lo tanto, un péptido proteotípico como el utilizado en la presente invención es un péptido experimentalmente perfectamente observable que únicamente identifica una proteína específica o isoforma de proteína.

De acuerdo con una modalidad preferida, se lleva cabo la caracterización comparando los péptidos proteotípicos obtenidos en el transcurso de la práctica de los métodos de la invención con péptidos proteotípicos conocidos. Ya que cuando se utilizan fragmentos preparados por medio de digestión con proteasa para la identificación de una proteína en MS, usualmente se observan los mismos péptidos proteolíticos para una enzima dada, es posible comparar los péptidos proteotípicos obtenidos para una muestra dada con los péptidos proteotípicos ya conocidos para enzimas de una clase dada de enzimas y por lo tanto identificar la enzima que está presente en la muestra.

Como una alternativa al análisis por medio de espectrometría de masas, se puede detectar la LRRK2 eluida (incluidos los compañeros de enlazamiento eluidos conjuntamente o las proteínas a partir de supercántigos) por medio del uso de anticuerpos específicos dirigidos contra LRRK2.

Además, en otra modalidad preferida, una vez se ha establecido la identidad de los compañeros de enlazamiento eluidos conjuntamente por medio de análisis de espectrometría de masas, cada compañero de enlazamiento se puede detectar con anticuerpos específicos dirigidos contra esta proteína.

Los ensayos adecuados con base en anticuerpos incluyen pero no se limitan a transferencia tipo Western, ensayos de ELISA, ensayos de ELISA tipo sándwich y arreglos de anticuerpos o una combinación de los mismos. El establecimiento de tales ensayos es conocido en el arte (Capítulo 11, Immunology, páginas 11-1 a 11-30 en: Short Protocols in Molecular Biology, Fourth Edition, Edited by F.M. Ausubel y colaboradores, Wiley, New York, 1999).

Estos ensayos no se pueden configurar únicamente en una forma para detectar y cuantificar una enzima de interés, sino también para analizar patrones de modificación postraduccionales tales como fosforilación. Por ejemplo, el estado de activación de una quinasa se puede determinar explorando su estado de fosforilación con anticuerpos antifosforosina, antifosfoserina o antifosfotreonina. Se sabe del estado del arte como seleccionar y utilizar tales anticuerpos antifosfo (Zhang y colaboradores, 2002. Journal of Biological Chemistry 277, 43648-43658).

Además, los métodos de identificación de la invención involucran el uso de compuestos que son analizados por su habilidad para ser un compuesto que interactúa con LRRK2.

Principalmente, de acuerdo con la presente invención, tal compuesto puede ser cualquier molécula que sea capaz de interactuar con LRRK2. Preferiblemente, el compuesto tiene un efecto sobre LRRK2, por ejemplo un efecto estimulador, activador o inhibidor.

Preferiblemente, se selecciona dicho compuesto del grupo que consiste de compuestos químicos de ocurrencia natural o sintética o fármacos orgánicos sintéticos, más preferiblemente moléculas pequeñas, fármacos orgánicos o compuestos naturales de moléculas pequeñas. Preferiblemente, se identifica dicho compuesto partiendo de una biblioteca que contiene a dichos compuestos. Luego, en el transcurso de la presente invención, se selecciona tal biblioteca.

Tales moléculas pequeñas preferiblemente no son proteínas ni ácidos nucleicos. Preferiblemente, las moléculas pequeñas exhiben un peso molecular de no menos de 1000 Da, más preferiblemente de no menos de 750 Da, lo más preferible de no menos de 500 Da.

Una “biblioteca” de acuerdo con la presente invención se relaciona con una colección (principalmente grande) de (numerosas) diferentes entidades químicas que son proveídas en una forma clasificada que permite tanto un análisis funcional rápido (selección) de las diferentes entidades individuales como al mismo tiempo suministrar una identificación rápida de las entidades individuales que forman la biblioteca. Los ejemplos son colecciones de tubos o de pozos o de manchas sobre superficies que contienen compuestos químicos que pueden ser añadidos en reacciones con uno o más compañeros definidos que interactúan en forma potencial en una forma de alto rendimiento. Después de la identificación de una interacción “positiva” deseada de ambos compañeros, se puede identificar rápidamente el respectivo compuesto debido a la construcción de una biblioteca. Las bibliotecas de origen natural o sintético pueden ser adquiridas o diseñadas por la persona capacitada en el arte.

Se proporcionan ejemplos de la construcción de bibliotecas, por ejemplo en Breinbauer R, Manger M, Scheck M, Waldmann H. Natural product guided compound library development. Curr Med Chem. 2002 Dec; 9 (23): 2129-45, en donde se describen productos naturales que son puntos de partida biológicamente validados para el diseño de bibliotecas de combinación, ya que tienen un historial probado de relevancia biológica. Este papel especial de productos naturales en la química de los medicamentos y en biología química se puede interpretar a la luz de las nuevas ideas acerca del dominio de la arquitectura de las proteínas adquirida por la biología estructural y la bioinformática. Con el propósito de cumplir con los requerimientos específicos del bolsillo individual de enlazamiento dentro de una familia de dominios, puede ser necesario optimizar la estructura del producto natural por medio de variación química. Se dice que la química en fase sólida se ha convertido en una eficiente herramienta para este proceso de optimización, y se han destacado los avances recientes en este campo en este artículo de revisión. Otras referencias relacionadas incluyen Edwards PJ, Morrell AI. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. Curr Opin Drug

Discov Devel. 2002 Jul; 5(4): 594-605; Merlot C, Domine D, Church DJ. Fragment analysis in small molecule discovery. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 May; 5(3): 391-9. Review; Goodnow RA Jr. Current practices in generation of small molecule new leads. J Cell Biochem Suppl. 2001; Suppl 37: 13-21; que describe que los procesos actuales de descubrimiento de fármacos en muchas compañías farmacéuticas requieren de grandes y crecientes colecciones de estructuras más sobresalientes de alta calidad para uso en ensayos de selección de alto rendimiento. Las colecciones de moléculas pequeñas con estructuras diversas y propiedades "como las de los fármacos" han sido adquiridas, en el pasado, a través de diferentes medios: por medio del archivo de los mejores esfuerzos internos previos de optimización, por medio de la adquisición a partir de vendedores de compuestos, y por medio de la unión de colecciones separadas después de la fusión de compañías. Aunque se describe la química combinatoria/de alto rendimiento como un componente importante en el proceso de nueva generación sobresaliente, la selección de diseños de bibliotecas para síntesis y el diseño posterior de miembros para la biblioteca ha evolucionado hasta un nuevo nivel de reto y de importancia. Los beneficios potenciales de selección de múltiples diseños de bibliotecas de compuestos de moléculas pequeñas contra múltiples objetivos biológicos ofrecen una oportunidad sustancial para descubrir nuevas estructuras sobresalientes.

En una modalidad preferida del segundo aspecto de la invención, LRRK2 es incubada primero con el compuesto y luego con el ligando 91 de indol inmovilizado. Sin embargo, se prefiere igualmente la incubación simultánea del compuesto y del ligando 91 de indol inmovilizado (incubación conjunta) con la proteína que contiene LRRK2 (ensayo de enlazamiento competitivo).

Preferiblemente la LRRK2 es incubada primero con el compuesto durante 10 a 60 minutos, más preferiblemente de 30 a 45 minutos a una temperatura de 4°C a 37°C, más preferiblemente de 4°C a 25°C, lo más preferible a 4°C. Los compuestos se usan preferiblemente en concentraciones en el rango entre 1 μ M y 1 mM, preferiblemente entre 10 y 100 μ M. La segunda etapa, poner en contacto con el ligando inmovilizado, se lleva cabo preferiblemente durante 10 a 60 minutos a 4°C.

En el caso de incubación simultánea, se incuba preferiblemente simultáneamente la LRRK2 con el compuesto y se inmoviliza al ligando 91 de indol durante 10 a 20 minutos, más preferiblemente de 20 a 60 minutos a una temperatura de 4°C a 37°C, más preferiblemente de 4°C a 25°C, lo más preferible de 4°C a 8°C. Se utilizan los compuestos preferiblemente en concentraciones en el rango entre 1 nM y 100 μ M, preferiblemente entre 10 nM y 10 μ M.

Además, se pueden llevar a cabo las etapas a) a c) del segundo aspecto de la invención con diferentes preparaciones de proteína con el propósito de analizar diferentes compuestos. Esta modalidad es especialmente interesante en el contexto de selecciones de medio y alto rendimiento (ver más adelante).

En una modalidad preferida del método de la invención de acuerdo con el tercer aspecto, una cantidad reducida de ligando 91 de indol-LRRK2 formada en la etapa c) en comparación con la etapa b) indica que LRRK2 es un objetivo del compuesto. Esto resulta del hecho de que en la etapa c) de este método de la invención, el compuesto compite con el ligando por el enlazamiento de LRRK2. Si está presente menos LRRK2 en la alícuota incubada con el compuesto, esto significa preferiblemente que el compuesto ha competido con el inhibidor por la interacción con la enzima y es, por lo tanto, un objetivo directo de la enzima y viceversa.

Preferiblemente, los métodos de identificación de la invención se llevan a cabo como una selección de medio o alto rendimiento. Tales ensayos los conoce una persona capacitada en el arte (Mallari y colaboradores, 2003, A generic high-throughput screening assay for kinases: protein kinase A as an example, Journal of Biomolecular Screening 8, 198-204; Rodems y colaboradores, 2002, A FRET-based assay platform for ultra-high density screening of protein kinases and phosphatases, Assay and Drug Development Technologies 1 (1PT1), 9-19).

El compuesto de interacción identificado de acuerdo con la presente invención se puede caracterizar además por medio de la determinación de si tiene un efecto sobre la actividad de LRRK2, por ejemplo sobre su actividad de quinasa (West y colaboradores, 2005. PNAS 102, 16842-16847). Tales ensayos son conocidos en el arte, también en un formato que permite una selección de medio o alto rendimiento.

En resumen, se puede incubar un sustrato de péptido marcado con fluoresceína con la tirosina quinasa (por ejemplo, LRRK2), ATP y un anticuerpo antifosfotirosina. En la medida que procede la reacción, el péptido fosforilado se enlaza al anticuerpo antifosfotirosina, resultando en un incremento en la señal de polarización. Los compuestos que inhiben a la quinasa resultan en una baja señal de polarización.

Alternativamente, se puede configurar el ensayo en un formato indirecto modificado. Se utiliza un fosfopéptido fluorescente como trazador para la formación del complejo con el anticuerpo antifosfotirosina produciendo una alta señal de polarización. Cuando un sustrato no marcado es fosforilado por la quinasa, el producto compite con el péptido fosforilado fluorescente por el anticuerpo. El péptido fluorescente es luego liberado del anticuerpo en solución lo cual resulta en una pérdida de señal de polarización. Tanto los ensayos directo como indirecto se pueden utilizar para identificar inhibidores de la actividad de la proteína tirosina quinasa (Seethala, 2000, Methods 22, 61-70; Seethala y Menzel, 1997, Anal. Biochem. 253, 210-218; Seethala y Menzel, 1998, Anal. Biochem. 255, 257-262).

Este ensayo de polarización de fluorescencia se puede adaptar para el uso con las proteínas serina/treonina quinasas por medio del reemplazo del anticuerpo antifosfotirosina con un anticuerpo antifosfoserina o antifosfotreonina (Turek

y colaboradores, 2001, Anal. Biochem. 299, 45-53, PMID 11726183; Wu y colaboradores, 2000, J. Biomol. Screen. 5, 23-30, PMID 10841597).

Los compuestos identificados de acuerdo con la presente invención pueden ser optimizados adicionalmente (optimización más sobresaliente). Esta optimización posterior de tales compuestos se acelera a menudo debido a la información de la relación actividad-estructura (SAR) codificada en estas bibliotecas de generación más sobresaliente. La optimización más sobresaliente es a menudo facilitada debido a la fácil aplicabilidad de métodos de química de alto rendimiento (HTC) para examinar con más detalle la síntesis.

Un ejemplo de tal biblioteca y optimización más sobresaliente es descrita en Wakeling A. E., Barker A. J., Davies D. H., Brown D. S., Green L. R., Carlidge S. A., Woodburn J. R. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. Breast Cancer Res Treat. 1996; 38(1): 67-73.

La invención describe además un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende las etapas de

- a) identificar un compuesto que interactúe con LRRK2 como se describió anteriormente, y
- b) formular el compuesto que interactúa con una composición farmacéutica.

Por lo tanto, la invención describe un método para la preparación de composiciones farmacéuticas, que pueden ser administradas a un individuo en una cantidad efectiva. La sustancia terapéutica puede ser sustancialmente pura. El individuo a ser tratado puede ser un animal, incluyendo, pero sin limitarse a animales tales como vacas, cerdos, caballos, gallinas, gatos, perros, etc., y puede ser un mamífero, por ejemplo un mamífero humano o no humano.

En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una sustancia terapéutica, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno estatal o Federal o estar enlistado en la Farmacopea Estadounidense o en otras farmacopeas generalmente reconocidas para uso en animales, y más particularmente, en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra la sustancia terapéutica. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, incluyendo pero sin limitarse a aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra en forma oral. La dextrosa acuosa y la solución salina son portadores preferidos cuando la composición farmacéutica se administra en forma intravenosa. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol se emplean preferiblemente como portadores líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada deshidratada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes emulsificantes y de humectación, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglomerantes tradicionales y portadores tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva de la sustancia terapéutica, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proveer la forma para una administración adecuada para el paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En una modalidad preferida, se formula la composición, de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa para seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Si fuera necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea en forma separada o mezclados juntos en una forma unitaria de dosificación, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando se administra la composición por medio de infusión, puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril grado farmacéutico. Cuando se administra la composición por medio de inyección, se puede suministrar una ampolla de agua o solución salina estéril para inyección para que los ingredientes puedan ser mezclados antes de su administración.

Las sustancias terapéuticas de la invención se pueden formular en forma neutra o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen a aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como aquellas derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., aquellas formadas con grupos amino libres tal como aquellas derivadas de isopropilamina, trietilamina, 2-atilamino etanol, histidina, procaína, etc., y aquellas derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férricos, etc.

La cantidad de la sustancia terapéutica de la invención que será efectiva en el tratamiento de un trastorno particular o condición dependerá de la naturaleza del trastorno o la condición, y se puede determinar por medio de técnicas clínicas estándar. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los rangos óptimos de las dosis. La dosis precisa que va a ser empleada en la formulación dependerá también de la ruta de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe ser decidida de acuerdo con el juicio de la persona tratante y de las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los rangos adecuados de las dosis para administración intravenosa están generalmente alrededor de 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los rangos adecuados de las dosis para administración intranasal están generalmente alrededor de 0,01 pg/kg de peso corporal hasta 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de las curvas de respuesta a las dosis derivadas de sistemas de análisis *in vitro* con modelos animales. En general, los supositorios pueden contener ingrediente activo en el rango de 0,5% hasta 10% en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente 10% a 95% de ingrediente activo.

Se conocen diferentes sistemas de suministro y se los puede utilizar para administrar una sustancia terapéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, y microcápsulas: el uso de células recombinantes capaces de expresar la sustancia terapéutica, el uso de endocitosis mediada por el receptor (por ejemplo, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432); la construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por medio de cualquier ruta convencional, por ejemplo por infusión, por inyección de bolos, por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, etc.), y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por medio de cualquier ruta adecuada, incluida inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar por medio de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como depósito de Ommaya. También se puede emplear administración pulmonar, por ejemplo, por medio del uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosol.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención en forma local en el área que requiere del tratamiento. Esto se puede lograr, a manera de ejemplo y no de una forma limitante, por medio de infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito después de una cirugía, por medio de una inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas silásticas, o fibras. En una modalidad, puede hacerse la administración por medio de inyección directa en el sitio (o en el sitio antiguo) de un tumor maligno o neoplásico o tejido preneoplásico.

En otra modalidad, la sustancia terapéutica se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249: 1527-1533).

En aún otra modalidad, la sustancia terapéutica se puede suministrar a través de un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede utilizar una bomba (Langer, ver más arriba). En aún otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico, esto es, el cerebro, requiriéndose por lo tanto únicamente una fracción de la dosis sistémica.

La invención se relaciona además con un método para la purificación de LRRK2, que comprende las etapas de:

- a) proveer una preparación de proteína que contiene LRRK2,
- b) poner en contacto la preparación de proteína con el ligando 91 de indol inmovilizado sobre un soporte sólido bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de ligando 91 de indol-LRRK2, y
- c) separar LRRK2 del ligando 91 de indol-LRRK2.

Como se mencionó anteriormente, sorprendentemente se ha encontrado que el ligando 91 de indol es un ligando de LRRK2. Esto permite métodos eficientes de purificación de LRRK2.

Con respecto a LRRK2, la preparación de proteína que contiene LRRK2, las condiciones para poner en contacto al ligando 91 de indol, el ligando 91 de indol inmovilizado, el complejo del ligando 91 de indol-LRRK2, la separación de LRRK2 del ligando 91 de indol inmovilizado, y la detección de LRRK2 o la determinación de su cantidad, las modalidades como se definió anteriormente para los métodos de identificación de la invención también aplican para el método de purificación de la invención.

En una modalidad preferida, el método de purificación de la invención comprende además después de la etapa c), la identificación de las proteínas que son capaces de enlazar se a LRRK2. Esto es especialmente interesante cuando la formación del complejo se lleva a cabo bajo condiciones esencialmente fisiológicas, ya que luego es posible preservar la condición natural de la enzima que incluye la existencia de compañeros de enlazamiento, subunidades de enzima o modificaciones postraduccionales, que luego pueden ser identificados con la ayuda de espectrometría de masas (MS).

En consecuencia, en una modalidad preferida, el método de purificación de la invención comprende además después de la etapa c), la determinación de si LRRK2 es modificada postraduccionalmente.

La invención se relaciona además con el uso del ligando 91 de indol para la identificación de los compuestos que interactúan con LRRK2 y para la purificación de LRRK2. Las modalidades tal como se las definió anteriormente también aplican a los usos de la invención.

La invención se ilustra adicionalmente por medio de las siguientes figuras y ejemplos, que no son considerados como limitantes para el alcance de la protección conferida por las reivindicaciones de la presente solicitud.

Corta descripción de las figuras

Figura 1

Estructura del ligando 91 de indol enlazable

La figura muestra la estructura del ligando 91 de indol enlazable. Se puede utilizar el grupo amino primario libre para el acoplamiento covalente con un material sólido de soporte.

Figura 2

Experimento pulldown de un fármaco con ligando 91 de indol inmovilizado

La figura muestra la ilustración de un gel de proteína después de coloración con azul de Coomassie. Se eluyeron las proteínas enlazadas al ligando 91 de indol inmovilizado con amortiguador para muestras SDS y se analizó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Se cortaron las áreas indicadas del gel como rebanadas de gel y se sometieron las proteínas a análisis por medio de espectrometría de masas. La posición de la banda que contenía LRRK2 es una muestra 01 en la parte superior del gel entre 00b y 01a.

Figura 3

Péptidos identificados de LRRK2

Los péptidos que fueron identificados por medio de análisis de espectrometría de masas de la secuencia LRRK2 de ratón (IPI00227565.2, 2527 aminoácidos) están subrayados.

Ejemplo 1

Síntesis del ligando 91 de indol enlazable

Síntesis del ligando 91 de indol: Ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida

Etapa 1

5-Fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona

Se calentó una solución de 5-fluoroisatina (1 g) en hidrato de hidrazina (55%, 10 ml) a 110°C durante 30 minutos. Una vez que la suspensión ha entrado en solución, se calentó la reacción a 110°C durante 4 horas, luego se enfrió a 0°C. Se filtró el precipitado y se lavó con agua. Se suspendió el sólido en agua (10 ml), se disminuyó el pH hasta 2 por medio de la adición de HCl concentrado, y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 5 horas. Se recogió el precipitado, se lavó el sólido con agua (2x15 ml) y se lo secó en un horno al vacío a 40°C (0,26 g, 30%). RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.2 (s, 1H); 6.8-7.0 (dd, 2H); 6.6 (m, 1H); 3.2 (s, 2H); LCMS: método D, RT = 1,736 min, [MH⁺ = 152].

Etapa 2

Ácido {3-[(5-Formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-propil}-carbámico tert-butil éster

A una solución de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirazol-3-carboxílico (0,300 g, 1,79 mmol), N-(3-Dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida (0,516 g, 2,69 mmol), hidrato de 1-Hidroxibenzotriazol (0,364 g, 2,69 mmol), trietilamina (0,502 ml, 3,56 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le añadió N-Boc-1,3-diaminopropano (0,375 ml, 2,15 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió una mezcla de salmuera (1,5 ml), agua (1,5 ml) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (1,5 ml) y se ajustó el pH de la solución en 12 por medio de la adición de hidróxido de sodio 10 N. Se extrajo la solución 3 veces con una mezcla de diclorometano:Metanol (9:1). Se secó la capa orgánica con sulfato de magnesio anhidro. Se removió el solvente y se purificó el residuo por medio de cromatografía flash (Hexano: Acetato de etilo (50 a 100%)) para producir el compuesto deseado como un sólido de color

ES 2 325 797 T3

amarillo (0,30 g, 52%). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.90 (s, 1H); 9.50 (s, 1H); 7.50 (m, 1H); 6.90 (m, 1H); 3.20 (q, 2H); 3.00 (q, 2H); 2.30 (s, 3H); 2.20 (s, 3H); 1.60 (m, 2H); 1.40 (s, 9H). LCMS: método D, RT = 2,103 min, $[\text{M}+\text{Na}^+ = 346]$, y $[\text{M}-\text{Boc}+\text{Na}^+ = 246]$.

Etapa 3

Éster tert-butílico del ácido [3-({5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-propil]-carbámico

Se calentó una solución del éster tert-butílico del ácido {3-[(5-Formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-propil}-carbámico (0,200 g, 0,62 mmol) y 5-Fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona (0,011 g, 0,62 mmol), pirrolidina (0,003 ml) en etanol (2 ml) a 78°C durante 3 horas. Se enfrió la reacción a 0°C, se filtró el precipitado resultante y se lavó con etanol frío. Se suspendió el producto en etanol (4 ml) y se agitó a 72°C durante 30 minutos. Se filtró la reacción, se secó el precipitado en un horno al vacío a 40°C para producir el compuesto deseado como un sólido (0,265 g, 94%). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.8 (s, 1H); 11.00 (s, 1H); 7.80 (m, 2H); 7.70 (m, 1H); 7.0 (m, 1H); 6.9 (m, 2H); 3.30 (q, 2H); 3.10 (q, 2H); 2.50 (dd, 6H) 1.60 (m, 2H); 1.40 (s, 9H). LCMS: método D, RT = 2,86 min, $[\text{M}+\text{Na}^+ = 479]$, y $[\text{M}-\text{Boc}+\text{Na}^+ = 379]$.

Etapa 4

Ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida

Se suspendió el éster tert-butílico del ácido [3-({5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenemetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil}-amino)-propil]-carbámico en metanol. Se añadieron 2 ml de HCl (4 N) en dioxano y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se removió el solvente para producir el compuesto deseado (0,098 g, 91 %). RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.8 (s, 1H); 11.00 (s, 1H); 7.90-7.70 (m, 5H); 6.9 (m, 2H); 3.30 (q, 2H); 2.80 (q, 2H); 2.50 (dd, 6H) 1.80 (m, 2H). LCMS: no concluyente debido a la fluorescencia.

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo bajo una atmósfera inerte. Se obtuvieron los espectros de RMN sobre un Bruker dpx400. Se llevó a cabo la LCMS sobre un Agilent 1100 utilizando una columna 5P de 4,6 mm x 150 mm, zorbax SBC-18 o una columna Small: ZORBAX® SB-C 18, 4,6 x 75 mm, de 3,5 micrones ("columna corta"). El flujo de columna fue de 1 ml/min y los solventes utilizados fueron agua y acetonitrilo (TFA al 0,1%) con un volumen de inyección de 10 μl . Las longitudes de onda fueron 254 y 210 nm. A continuación se describen los métodos.

TABLA 1

Métodos analíticos

Método	Nombre del Método de Fácil Acceso	Nombre del Método de ChemStation	Velocidad de Flujo	Solvente	Tiempo de Ejecución
A	Analítico positivo 7 mn	ANL_POS7.M	1 ml/min	0 - 2,5 min 5 -95% MeCN 2,5 - 6 min 95% MeCN	7 min
B	Analítico positivo Ión	ANAL_POS.M	1 ml/min	0 - 11 min 5 -95% MeCN 11 - 13 min 95% MeCN	15 min
C	Inyección de bucle, Positivo		1 ml/min	95% MeCN	1 min
D	Analítico positivo Ión	ANL Positivo Columna corta	1 ml/min	0 - 4,5 min 30-95% MeCN	5 min
E	Analítico pH Alto	Analítico pH Alto	3 ml/min	0 a 8 min 5 -95% MeCN 8 a 9 min 95% MeCN	10 min

TABLA 2

Abreviaturas utilizadas en protocolos de química

ac.	acuoso
D	doblete
DMSO	dimetil sulfóxido
G	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
LCMS	cromatografía líquida - espectrometría de masas
M	multiplete
min	minuto
mmol	milimol
N	Normal
RMN	resonancia magnética nuclear
Q	cuarteto
RT	tiempo de retención
S	singlete
sat	saturado
T	triplete

Ejemplo 2

Pulldown de un fármaco con ligando 91 de indol inmovilizado e identificación de LRRK2

Este ejemplo demuestra el uso del ligando 91 de indol inmovilizado para la identificación de LRRK2 a partir de lisado de cerebro de ratón. Las proteínas que se enlazan al ligando 91 de indol inmovilizado fueron identificadas utilizando un procedimiento químico de proteómica. Se purificaron las proteínas de enlazamiento sobre una resina a la cual se había unido covalentemente ligando 91 de indol. Se eluyeron las proteínas enlazadas y posteriormente se las separó por medio de electroforesis sobre gel de poliacrilamida con SDS (ver la Figura 2), se cortaron bandas adecuadas de gel y se analizaron las proteínas por medio de espectrometría de masas LC-MS/MS.

Los resultados muestran que se puede utilizar ligandos 91 de indol inmovilizado para enriquecer y caracterizar LRRK2 a partir de lisados de cerebro de ratón. Los doce péptidos de LRRK2 identificados por medio de espectrometría de masas están enlistados en la Tabla 4.

1. Inmovilización de compuestos gámine de molécula pequeña

Se equilibró Sefarosa 4 de Flujo Rápido activada con NHS (Amersham Biosciences, 17-0906-01) DMSO anhidro (Dimetilsulfóxido, Fluka, 41648, H₂O ≤ 0,005%). Se colocó 1 ml de bolitas sedimentadas en un tubo Falcon de 15 ml, se añadió una solución patrón del compuesto (usualmente 100 mM en DMF o DMSO) (concentración final 0,2-2 μmol/ml de gránulos) así como 15 μl de TEA. Se incubaron las bolitas a temperatura ambiente en la oscuridad sobre un agitador tipo end-over-end (agitador de Wagner) (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 16-20 horas. Se determinó la eficiencia del acoplamiento por medio de HPLC. Se bloquearon los grupos que no reaccionaron con NHS por medio de incubación con aminoetanol a temperatura ambiente sobre el agitador tipo end-over-end durante la noche. Se lavaron las bolitas con 10 ml de DMSO. Se almacenaron las bolitas lavadas en isopropanol a 4°C.

2. Preparación de lisados celulares

Se homogenizó tejido de cerebro de ratón en un homogenizador Potter S (5 ml por cerebro): Tris-HCl 50 mM, 1% CHAPSO, glicerol al 5%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaF 25 mM, vanadato de sodio 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,5. Se añadió una tableta completa libre de EDTA (coctel inhibidor de proteasa, Roche Diagnostics, 1 873 580) por 25 ml de amortiguador. El material fue homogenizado 10x utilizando un homogenizador mecanizado POTTER S, transferido a tubos Falcon de 50 ml, incubado durante 30 minutos sobre hielo y centrifugado durante 10 min a 20.000 g a 4°C (10.000 rpm en Sorvall SLA600, preenfriada). Se transfirió el sobrenadante a un tubo de policarbonato de una ultracentrífuga (UZ) (Beckmann, 355654) y se lo centrifugó durante 1 hora a 100.000 g a 4°C (33.500 rpm en Ti50.2,

preenfriada). Se transfirió nuevamente el sobrenadante a un tubo Falcon fresco de 50 ml, se determinó la concentración de proteína por medio de un ensayo de Bradford (BioRad) y se prepararon muestras que contienen 50 mg de proteína por alícuota. Se utilizaron inmediatamente las muestras para los experimentos o se las congeló en nitrógeno líquido y almacenó congeladas a -80°C.

3. Experimento pull-down del compuesto

Se equilibraron las bolitas de Sefarosa con compuesto inmovilizado (100 μ l de bolitas por experimento de pull-down) en amortiguador de lisis y se incubó con una muestra de lisado celular que contenía 50 mg de proteína sobre un agitador end-over-end (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 2 horas a 4°C. Se recolectaron las bolitas, se las transfirió a columnas Mobicol (MoBiTech 10055) y se lavó con 10 ml de amortiguador de lisis que contenía detergente al 0,5% (NP40), seguido por 5 ml de amortiguador de lisis con detergente al 0,25%. Para eluir la proteína enlazada, se añadieron 60 μ l 2 x SDS de amortiguador para muestra, se calentó la columna durante 30 minutos a 50°C y se transfirió el eluato a un tubo de microfuga para centrifugación. Se separaron luego las proteínas por medio de electroforesis en poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE).

4. Identificación de Proteína por medio de Espectrometría de Masas

4.1 Digestión de la proteína antes del análisis espectrométrico de masas

Se redujeron las proteínas separadas del gel, se las alquiló y digirió en gel siguiendo esencialmente el procedimiento descrito por Shevchenko y colaboradores, 1996, Anal. Chem. 68: 850-858. En resumen, se cortaron del gel las proteínas separadas del mismo utilizando un escalpelo limpio, se las redujo utilizando DTT 10 mM (en bicarbonato de amonio 5 mM, 54°C, 45 min) y posteriormente se las alquiló con yodoacetamida 55 mM (en bicarbonato de amonio) a temperatura ambiente en la oscuridad (30 minutos). Se digirieron las proteínas alquiladas y reducidas en gel con tripsina de porcino (Promega) con una concentración de proteasa de 12,5 ng/ μ l en bicarbonato de amonio 5 mM. Se permitió que continuara la digestión durante 4 horas a 37°C y se detuvo posteriormente la reacción utilizando 5 μ l de ácido fórmico 5%.

4.2 Preparación de la muestra antes del análisis por espectrometría de masas

Se extrajeron trozos de gel dos veces con 20 μ l de TFA al 1% y se los reunió con sobrenadantes digeridos acidificados. Se secaron las muestras en una centrífuga de vacío y se las resuspendió en 13 μ l de TFA al 1%.

4.3. Adquisición de datos de espectrometría de masas

Se inyectaron muestras de péptido en un sistema LC nano (CapLC, Waters o Ultimate, Dionex) que fue acoplado directamente ya sea a un cuadrupolo TOF (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, Micromass) o a un espectrómetro con trampa de iones (LCQ Deca XP). Se separaron los péptidos sobre el sistema de LC utilizando un gradiente de solventes orgánicos y acuosos (ver más adelante). El solvente A era 5% de acetonitrilo en ácido fórmico al 0,5% y el solvente B era 70% de acetonitrilo en ácido fórmico al 0,5%.

TABLA 3

Los péptidos que eluyen fuera del sistema de LC fueron parcialmente secuenciados dentro del espectrómetro de masas

Tiempo (min)	% de solvente A	% de solvente B
0	95	5
5,33	92	8
35	50	50
36	20	80
40	20	80
41	95	5
50	95	5

4.4. Identificación de proteína

La masa del péptido y los datos de la fragmentación generados en los experimentos con LC-MS/MS fueron utilizados para consulta FASTA de proteína formateada y bases de datos de secuencia de nucleótidos mantenidas y actualizadas regularmente en el NCBI (para los genomas NCBIInr, dbEST y humano y de ratón) y en el European Bioinformatics Institute (EBI, para las bases de datos del proteoma de humano, ratón, D. melanogaster y C. elegans).

ES 2 325 797 T3

Se identificaron las proteínas por medio de la correlación de la masa medida del péptido y los datos de fragmentación con los mismos datos computados a partir de las entradas en la base de datos utilizando la herramienta de software Mascot (Matrix Science; Perkins y colaboradores, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20, 3551-3567). Los criterios de búsqueda variaron dependiendo del espectrómetro de masas se utilizara para los análisis.

TABLA 4

Identificación del péptido por medio de espectrometría de masas de LRRK2 de cerebro de ratón (Experimento P11927B)

Número del péptido	Posición del péptido	Secuencia del péptido
1	172 - 180	YSANDEVQK
2	454 - 466	HAHAPEVAESGCK
3	553 - 561	FIGNPGIQK
4	630 - 637	ILASTLQR
5	740 - 751	GATSLIQVCEK
6	782 - 792	GDSQVISLLLR
7	832 - 841	QTNTGSVLAR
8	1016 - 1035	LELHQNSLTSFPQQLCETLK
9	1712 - 1723	LLEISPFMLSGR
10	1765 - 1771	ITVPSC
11	2031 - 2039	TSEGTPGFR
12	2046 - 2413	HQLSYSGR

Ejemplo 3

Ensayo de selección para la identificación de compuestos que interactúan con LRRK2

Este ejemplo describe un ensayo de enlazamiento competitivo en el cual se añaden directamente los compuestos de prueba en un lisado celular. Se añaden los compuestos de prueba y la matriz de afinidad con el ligando 91 de indol inmovilizado a las alícuotas de lisado y se permite que se enlacen con las proteínas contenidas en la muestra de lisado. Después del período de incubación se separan las bolitas con las proteínas capturadas del lisado. Se eluyen luego las proteínas enlazadas y se detecta la presencia de LRRK2 en el eluato y se cuantifica utilizando un anticuerpo específico en un procedimiento de transferencia puntual y el sistema de detección infrarroja de Odyssey. Por medio del uso de diferentes concentraciones del compuesto de prueba se genera una curva de respuesta a la dosis. Información experimental adicional está descrita en WO 2006/134056.

Lavado de la matriz de afinidad

Se lava dos veces la matriz de afinidad como se describe en el ejemplo 1 con amortiguador 1x DP que contiene NP40 al 0,4% y luego se resuspende en amortiguador 1x DP que contiene NP40 al 0,4% (suspensión de bolitas al 20%).

TABLA 5

Preparación de amortiguador 5x DP

Sustancia:	Solución patrón	Concentración final en amortiguador de lisis 1x	Añadir para amortiguador de lisis 115x
Tris/HCl pH 7,5	1 M	50 mM	250 ml
Glicerol	87%	5%	288 ml
MgCl ₂	1 M	1,5 mM	7,5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na ₃ VO ₄	100 mM	1 mM	50 ml

ES 2 325 797 T3

Se filtra el amortiguador DP (5x) concentrado cinco veces a través de un filtro de 0,22 μm y se almacena a -80°C . Con el propósito de obtener amortiguador 1x DP, se diluye el amortiguador 5x DP 1:5 con agua destilada. Se obtienen soluciones patrón de los siguientes proveedores: Tris/HCl 1,0 M pH 7,5 (Sigma, T-2663), Glicerol al 87% (Merck, catálogo número 04091.2500); MgCl_2 1,0 M (Sigma, M-1028); NaCl 5,0 M (Sigma, S-5150).

Preparación de los compuestos de prueba

Se preparan soluciones patrón de los compuestos de prueba en DMSO correspondiente a una concentración 100 veces mayor comparada con la concentración final deseada de prueba (por ejemplo se prepara una solución patrón de 400 μM para una concentración de prueba final de 4 μM). Este esquema de dilución resulta en una concentración final en DMSO del 1% en el ensayo. Para los experimentos de control (sin compuesto de prueba) se utiliza un amortiguador que contiene DMSO al 1% de tal manera que todas las muestras contengan DMSO al 1%.

Preparación y dilución de lisado celular

Se prepara el lisado celular como se describe en el ejemplo 2. Para un experimento típico se descongela una alícuota de lisado que contiene 50 mg de proteína en un baño de agua a 37°C y luego se lo mantiene a 4°C . Al lisado se le añade un volumen de amortiguador 1x DP de tal manera que se logre una concentración final de NP40 del 0,4%. Luego, se añade 1/50 del volumen final de una solución de inhibidor de proteasa concentrado 50 veces (1 tableta de inhibidor de proteasa disuelta en 0,5 ml de amortiguador 1x DP que contiene NP40 al 0,4%; coctel del inhibidor de proteasa en una tableta libre de EDTA de Roche Diagnostics, catálogo número 41647). Se diluye adicionalmente el lisado añadiendo amortiguador 1x DP que contiene NP40 al 0,4% para lograr una concentración final de proteína de 5 mg/ml.

Incubación de lisado con compuesto de prueba y matriz de afinidad

Se dispensa un volumen de 100 μl de lisado diluido en cada pozo de una placa filtrante de 96 pozos. Luego se añaden 1,5 μl del compuesto de prueba diluido en DMSO. Para reacciones de control se utiliza un compuesto de prueba sin DMSO. Luego, se añaden 50 μl de matriz de afinidad (suspensión al 20%) por pozo. Se incuba la placa durante dos horas a 4°C sobre un agitador. Se lava la placa utilizando un instrumento colector de vacío (Millipore, MAVM 096 0R). Se lava cada pozo cuatro veces con 400 μl de amortiguador 1x DP que contiene NP-40 al 0,4% y dos veces con 400 μl de amortiguador 1x DP que contiene NP-40 al 0,2%.

Para elución, se coloca la placa filtrante sobre una placa de recolección y se añaden 40 μl de amortiguador para muestra 2x (Tris HCl 100 mM, pH 6,8; SDS al 4%; glicerol al 20%; azul de Bromofenol al 0,02%) con DTT (concentración final 50 mM) a cada pozo. Se incuban las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador (750 rpm sobre un Termomezclador, Eppendorf). Posteriormente se centrifugan las placas durante 2 minutos a 1100 rpm (centrifuga Heraeus) y se recoge el eluato en los pozos de la placa de recolección.

Detección y cuantificación de LRRK2 eluida

Se detecta la proteína LRRK2 en los eluatos y se cuantifica por medio de un procedimiento de transferencia puntual utilizando un primer anticuerpo dirigido contra LRRK2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) y un anticuerpo secundario marcado en forma fluorescente (IRDyeTM 800 antirratón, de Rockland, 610-732-124). Se opera el sistema Infrarrojo de Formación de Imágenes de Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EUA) de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante (Schutz-Geschwendener y colaboradores, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en Mayo 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).

Se utiliza el aparato de transferencias puntuales de acuerdo con las instrucciones del proveedor (aparato de microfiltración Bio-Dot, BioRad 170-65). Se tratan membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT Nitrocellulose, PALL BTNT30R) con etanol al 20% y posteriormente se las lava con amortiguador 1x PBS. Se aplican 30 μl por punto de muestra de eluato.

Para la detección de LRRK2 se bloquean primero las membranas por medio de incubación con amortiguador de bloqueo de Odyssey (LICOR, 927-40000) durante una hora a temperatura ambiente. Se incuban luego las membranas bloqueadas durante 16 horas a 4°C con el anticuerpo anti-LRRK2 que se diluye en amortiguador de bloqueo de Odyssey que contiene Tween-20 al 0,2%. Después de lavar la membrana cuatro veces con amortiguador 1x PBS que contiene Tween 20 al 0,1% se incuba la membrana durante 40 minutos con el anticuerpo de detección (IRDyeTM 800 antirratón de Rockland, 610-732-124) diluido en amortiguador de bloqueo de Odyssey que contiene Tween-20 al 0,2%. Después de eso se lava la membrana cuatro veces durante cinco minutos cada vez con amortiguador 1x PBS/Tween 20 al 0,1% y una vez durante 5 minutos con amortiguador 1x PBS. Se mantiene la membrana en amortiguador PBS a 4°C y luego se hace un barrido con el instrumento de Odyssey y se registran las señales y se analizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4

Ensayo de la quinasa de LRRK2

- 5 Este ejemplo describe un ensayo que se puede utilizar para determinar si un compuesto que interactúa con LRRK2 es un inhibidor de la quinasa de LRRK2. El ensayo se lleva a cabo como se describió previamente (West y colaboradores, 2005. PNAS 102, 16842-16847).

10 Se clona ADNc de LRRK2 de longitud completa con una etiqueta del epítipo Myc dentro de un vector de expresión de mamífero. Se transfecta transitoriamente el plásmido de expresión dentro de células HEK-293T por medio del uso del reactivo FuGENE 6.0 (Roche Applied Science) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cultivan células HEK-293T en medio Opti-MEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10%, penicilina (100 unidades/ml), y estreptomycin (100 µg/ml). Para preparar proteína recombinante LRRK2 para los ensayos de la quinasa, se recogen las células HEK-293T en amortiguador de inmunoprecipitación (Triton-X-100 al 0,5%, coctel inhibidor completo de mini proteasa 1 x (Roche) en PBS) y se incuban los lisados a 4°C durante una hora seguido por centrifugación a 17.500 x g durante 15 minutos. Se combina la fracción de sobrenadante con Sefarosa 4 de Flujo Rápido con Proteína G (Amersham Pharmacia Biotech) previamente acomplejada con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-myc (clon 9E10; Roche) seguido por incubación durante la noche con rotación del tubo. Se precipita el complejo de Sefarosa con proteína G por medio de centrifugación y se lava cinco veces con amortiguador suplementado con NaCl 500 mM y una vez con amortiguador 1x PBS.

25 La proteína LRRK2 etiquetada con Myc enlazada a sefarosa G se suspende nuevamente en amortiguador de quinasa (Hepes 20 mM, pH 7,4; MgCl₂ 15 mM; EGTA 5 mM; fosfato de glicerol beta 20 mM) sobre hielo junto con proteína básica de mielina biotinilada 25 µM (MBP; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). La reacción de la quinasa se inicia por medio de la adición de 0,5 µCi de [³²P gama]ATP (Perkin Elmer) y ATP 15 µM. Se incuba la mezcla a 30°C durante 15 minutos. Se coloca la reacción sobre hielo y se la termina por medio de la adición de guanidina-HCl 2,5 M. Se utiliza el kit universal de ensayo de la quinasa (Calbiochem) para cuantificar el radioisótopo incorporado en MBP biotinilado por medio de la adición de solución de avidina (Calbiochem) a la reacción y se incuba a 25°C durante 10 minutos. Se centrifuga la reacción a 800 x g durante dos minutos y se coloca el sobrenadante sobre una columna que contiene una membrana que enlaza avidina y se lava de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se mide la cantidad incorporada de radioisótopo por medio de recuento de centelleo líquido.

35 Se determina la actividad de autofosforilación de LRRK2 en una reacción de quinasa como se describió anteriormente excepto porque no se añade MBP. Se incuba la reacción durante 15 minutos a 30°C y se la termina por medio de la adición de amortiguador para muestra de Laemmli que contiene 5% de 2-mercaptoetanol. Se calientan las reacciones durante 10 minutos a 75°C y luego se las coloca sobre hielo. Después de una breve centrifugación, se separan las muestras (sobrenadantes) en un gel de Poliacrilamida-SDS al 6%, se transfiere a una membrana de poli-vinilidina-difluoruro (PVDF) y se las expone a una película BioMax (Kodak). Se prueba la membrana con un anticuerpo anti-c-myc (9E10; Roche) para determinar la cantidad de LRRK2 en cada reacción. Se cuantifican las bandas de autorradiografía y las transferencias tipo Western por medio del uso de IMAGEQUANT 5.0 normalizando así la cantidad de MBP fosforilado con la cantidad de LRRK2 en cada experimento.

Referencias citadas en la descripción

- 45 Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 02081466 A [0011]
- WO 2006134056 A [0125]
- WO 2004006838 A [0012]
- US 60782119 B [0139]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- COOKSON. *Annual Reviews in Biochemistry*, 2005, vol. 74, 29-52 [0004]
- ABOU-SLEIMAN y colaboradores, *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, vol. 7, 207-219 [0005]
- PAISAN-RUIZ y colaboradores, *Neuron*, 2004, vol. 44, 595-600 [0006]
- ZIMPRICH y colaboradores, *Neuron*, 2004, vol. 44, 601-607 [0006]
- WEST y colaboradores, *PNAS*, 2005, vol. 102, 16842-16847 [0007] [0020] [0085] [0135]
- GLOECKNER y colaboradores, *Hum. Mol. Genet.*, 2005, vol. 15, 223-232 [0007]

ES 2 325 797 T3

- **SMITH** y colaboradores, *PNAS*, 2005, vol. 102, 18676-18681 [0008]
- **GREGGIO** y colaboradores, *Neurobiol. Dis.*, 2006, vol. 23 (2), 329-341 [0009]
- 5 • **TAYLOR** y colaboradores, *Trends in Molecular Medicine*, 2006, vol. 12, 76-82 [0010] [0021] [0023]
- **SUN** y colaboradores, *J. Med. Chem.*, 2003, vol. 46, 1116-1119 [0018]
- Purification of Organelles from Mammalian Cells. *Current Protocols in Protein Science*. Wiley [0026]
- 10 • Subcellular Fractionation of Tissue Culture Cells. *Current Protocols in Protein Science*. Wiley [0027]
- Production of Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*. Wiley, 1995 [0030]
- 15 • Sample preparation for the extraction, isolation, and purification of Nuclei Acids. **KARWA**; **MITRA**. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley, 2003 [0037]
- **HOWARD R. PETTY**. *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc, October 1998 [0043]
- 20 • **SHEVCHENKO** y colaboradores, *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, 850-858 [0065]
- **MANN** y colaboradores, Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, *Annual Review of Biochemistry*, 2001, vol. 70, 437-473 [0065]
- 25 • **WU** y colaboradores, *J. Proteome Res.*, 2006, vol. 5, 651-658 [0066]
- Immunology. *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley, 1999 [0071]
- **ZHANG** y colaboradores, *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, 43648-43658 [0072]
- 30 • **BREINBAUER R**; **MANGER M**; **SCHECK M**; **WALDMANN H**. Natural product guided compound library development. *Curr Med Chem.*, December 2002, vol. 9 (23), 2129-45 [0078]
- **EDWARDS PJ**; **MORRELL AI**. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. *Curr Opin Drug Discov Devel*, July 2002, vol. 5 (4), 594-605 [0078]
- 35 • **MERLOT C**; **DOMINE D**; **CHURCH DJ**. Fragment analysis in small molecule discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*, May 2002, vol. 5 (3), 391-9 [0078]
- 40 • **GOODNOW RA JR**. Current practices in generation of small molecule new leads. *J Cell Biochem*, 2001, vol. 37, 13-21 [0078]
- **MALLARI** y colaboradores, A generic high-throughput screening assay for kinases: protein kinase A as an example. *Journal of Biomolecular Screening*, 2003, vol. 8, 198-204 [0084]
- 45 • **SEETHALA**. *Methods*, 2000, vol. 22, 61-70 [0087]
- **SEETHALA**; **MENZEL**. *Anal. Biochem.*, 1997, vol. 253, 210-218 [0087]
- 50 • **SEETHALA**; **MENZEL**. *Anal. Biochem.*, 1998, vol. 255, 257-262 [0087]
- **TUREK** y colaboradores, *Anal. Biochem.*, 2001, vol. 299, 45-53 [0088]
- **WU** y colaboradores, *J. Biomol. Screen.*, 2000, vol. 5, 23-30 [0088]
- 55 • **WAKELING AE**; **BARKER AJ**; **DAVIES DH**; **BROWN DS**; **GREEN LR**; **CARTLIDGE SA**; **WOODBURN JR**. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. *Breast Cancer Res Treat.*, 1996, vol. 38 (1), 67-73 [0090]
- 60 • **WU**; **WU**. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0097]
- **LANGER**. *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0099]
- **SHEVCHENKO** y colaboradores, *Anal. Chem.*, 1996, vol. 68, 850-858 [0121]
- 65 • **PERKINS** y colaboradores, *Matrix Science*, 1999 [0124]
- *Electrophoresis*, vol. 20, 3551-3567 [0124]

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de un compuesto que interactúa con LRRK2, que comprende las etapas de:

- a) proveer una preparación de proteína que contenga LRRK2,
- b) poner en contacto la preparación de proteína con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizada sobre un soporte sólido bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2,
- c) incubar al complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 con un compuesto dado, y
- d) determinar si el compuesto es capaz de separar LRRK2 del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida).

2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa d) incluye la detección de LRRK2 o la determinación de la cantidad de LRRK2.

3. El método de la reivindicación 2, en donde se detecta LRRK2 o se determina la cantidad de LRRK2 por medio de espectrometría de masas o de métodos de inmunodetección.

4. Un método para la identificación de un compuesto que interactúa con LRRK2, que comprende las etapas de:

- a) proveer una preparación de proteína que contenga LRRK2,
- b) poner en contacto la preparación de proteína con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizada sobre un soporte sólido y con un compuesto dado que bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2, y
- c) detectar al complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 formado en la etapa b).

5. El método de la reivindicación 4, en donde en la etapa c) dicha detección se lleva a cabo por medio de la determinación de la cantidad del complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en donde las etapas a) a c) se llevan a cabo con diferentes preparaciones de proteína con el propósito de analizar diferentes compuestos.

7. Un método para la identificación de un compuesto que interactúa con LRRK2, que comprende las etapas de:

- a) proveer dos alícuotas de una preparación de proteína que contenga LRRK2,
- b) poner en contacto una alícuota con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizado sobre un soporte sólido bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2,
- c) poner en contacto la otra alícuota con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizado sobre un soporte sólido y con un compuesto dado bajo condiciones que permitan la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2, y
- d) determinar la cantidad de complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 formado en las etapas b) y c).

8. El método de la reivindicación 7, en donde una cantidad reducida del complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 formado en la etapa c) en comparación con la etapa b) indica que LRRK2 es un objetivo del compuesto.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la cantidad del complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 se

ES 2 325 797 T3

determina por medio de la separación de LRRK2 del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) y posterior determinación de la cantidad de LRRK2.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la cantidad de LRRK2 se determina por medio de espectrometría de masas o métodos de inmunodetección.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, llevado a cabo como una selección de medio o de alto rendimiento.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de compuestos sintéticos, o de fármacos orgánicos sintéticos, más preferiblemente fármacos orgánicos de molécula pequeña, y compuestos naturales de molécula pequeña.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el compuesto que interactúa con LRRK2 es un inhibidor de LRRK2.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde se selecciona el soporte sólido del grupo que consiste de agarosa, agarosa modificada, gránulos de sefarosa (por ejemplo, sefarosa activada con NHS), látex, celulosa, y partículas ferrosas o ferromagnéticas.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) está covalentemente acoplado al soporte sólido.

16. Un método para la purificación de LRRK2, que comprende las etapas de:

a) proveer una preparación de proteína que contenga LRRK2,

b) poner en contacto la preparación de proteína con (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) inmovilizada sobre un soporte sólido bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2, y

c) separar LRRK2 del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida).

17. El método de la reivindicación 16, que comprende además después de la etapa c) la identificación de proteínas que sean capaces de enlazarse a LRRK2.

18. El método de la reivindicación 16, que comprende además después de la etapa c) la determinación de modificaciones postraduccionales de LRRK2.

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde después de la etapa c) ya sea la LRRK2 y/o las proteínas que son capaces enlazarse a LRRK2 se **caracterizan** por medio de espectrometría de masas o de métodos de inmunodetección.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el suministro de una preparación de proteína incluye las etapas de recolectar al menos una célula que contenga LRRK2 y lisar la célula.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las etapas de la formación del complejo de (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida)-LRRK2 se llevan a cabo condiciones esencialmente fisiológicas.

22. El uso del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) para la identificación de los compuestos que interactúan con LRRK2.

23. El uso del (ácido 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenmetil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico (3-amino-propil)-amida) para la purificación de LRRK2.

Figura 1

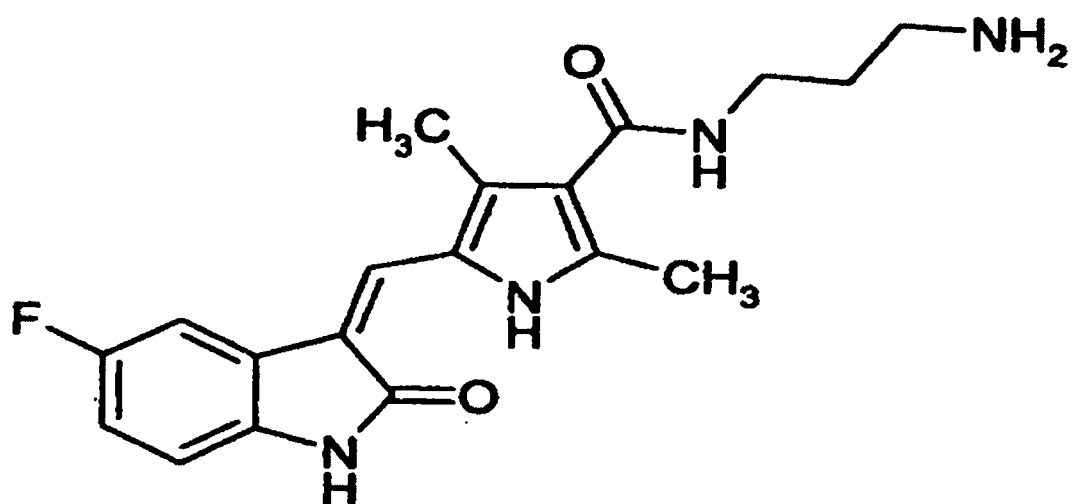


Figura 2

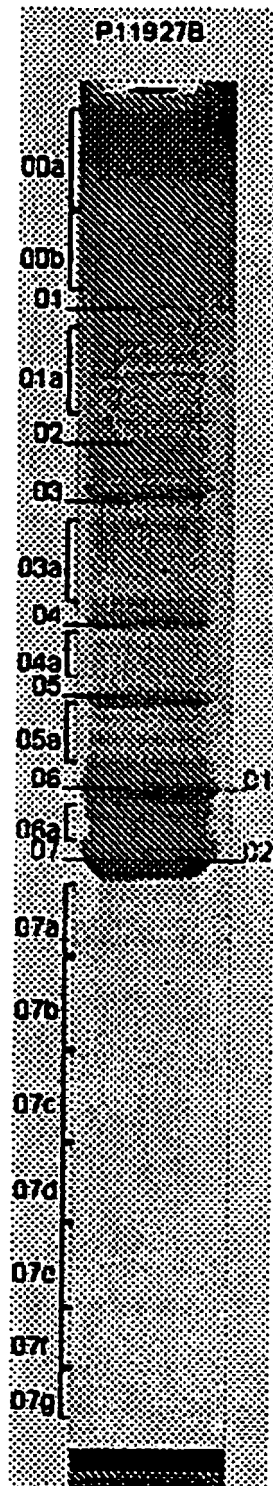


Figura 3

```

1  MASGACQGCE EEEEEEEALKK LIVRLNNVQE GKQIETLLQL LEDMLVFTYS
51  DRASKLFEDK NFHVPLLIVL DSYMVRVASVQ QAGWSLLCKL IEVCPGTLQS
101 LIGPQDIGND WEVLGIHRLI LKMLTVHHAN VNLSIVGLKA LDLLLD SGKL
151 TLLILDEECD IFLIFDAMH RYSANDEVQK LGCKALHVLV ERVSEEQLTE
201 FVENKDYTIL LSTFGSFRRD KEIVYHVLCC LHSLAVTCSN VEVLM SGNVR
251 CYNLVVEAMK AFPTNENIQE VSCSLFQKLT LGNFFNIVL NEVHV FVKA
301 VRQYPENAAL QISALSCLAL LTETIFLNQD LEERSETQEQ SEEDSEKLF
351 WLEPCYKALV RHRKDKHVQE AACWALNNLL MYQNSLHEKI GDEDGQFPAH
401 REVMLSMLMH SSSKDVQAA AHALSTLLEQ NVNFRKILLA KGVYLVLEL
451 MQKHAHAPEV AESGCKMLSH LFEGSNPSLD TMAAVVPKIL TVMKAHGTSL
501 SVQLEALRAI LHFVVPGLLE ESREDSQCRP NVLRKQCFRT DIHKLVLVAL
551 NRFIGNPGIQ KCGLKVISSL AHLDPATETL SLQGA VDSVL HTLQMPDDQ
601 EIQCLGLHLM GCLMTKKNFC IGTGHLLAKI LASTLQRFKD VAEVQTTGLQ
651 TTLSILELSV SFSKLLVHYS FDVVIFHQMS SSVVEQKDEQ FLNLCCCKFA
701 KVAVDDELKN TMLERACDQN NSIMVECLLL LGADANQVKG ATSLIYQVCE
751 KESSPKLVEL LLNGGCREQD VRKALTISIQ KGDSQVISLL LRKLALDLAN
801 NSICLGGFGI GKIDPSWLG PFDKSSNLR KQNTGSLA RKVLRYQMRN
851 TLQEGVASGS DGNFSEDALA KFGEWTFIPD SSMDSVFGQS DDL DSEGSES
901 SFLVKRKSNS ISVGEVYRDL ALQRYSPNAQ RHSNSLGPVF DHEDLLRRKR
951 KILSSDESLR SSRLPSHMRQ SDSSSSSLASE REHITSLDLS ANELKDIDAL
1001 SQKCCLSHL EHLTKLELHQ NSLTSFPQOL CETLKCLIHL DLHSNKFTSF
1051 PSFVLKMPRI TNLDASRNDI GPTVVLD PAM KCPSLKQLNL SYNQLSS IPE
1101 NLAQVVEKLE QLLLEGNKIS GICSPSLKE LKILNLSKNH IPSLPGDFLE
1151 ACSVESFSA RMNFLAAMPA LPSSITSLKL SQNSFTCIPE AIFSLPHLRS
1201 LDMSHNNIEC LPGAHWKSL NLRELIFS KN QISTLDFSEN PHVWSRVEKL
1251 HLSHNKLKEI PPEIGCLENL TSLDVSYNLE LRSFPNEMGK LSKIWDPLD
1301 GLHLNDFDKH VGCKAKDIIR FLOQRLKAV PYNRMKLMIV GNTGSGK TTL
1351 LQQLMKMKKP ELGMQGATVG IDVRDWSIQI RGKRRKDLVL NVWDFAGREE
1401 FYSTHPHFM TQRALYLAVYD LSKGQAEVDA MKPWL FNKA RASSSPVILV
1451 GTHLDVSEK QRKACISKIT KELLNKRGF TIRDYHFVNA TEEDALAKL
1501 RKTINESLN FKIRDQPVVG QLIPDCYVEL EKIILSERKA VPTEFPVINR
1551 KHLQLVNEH QLQDENELP HAVHFLNESG VLLHFQDPAL QLSDL YFVEP
1601 KWLCKVMAQI LTVKVDGCLK HPKGIISRRD VEKFLSKKKR FPKNYM QYF
1651 KLEKFQIAL PIGEYLLVP SLSDDHRPVI ELPHCENSEI IIRLYEMPYF
1701 PMGFWSRLIN RLLEISPFML SGRERALRPN RMYWRQGIYL NWSPEAYCLV
1751 GSEVL DNRPE SFLKITVPSC RKGCILLGRV VDHIDSLMEE WFPGLLEIDI
1801 CGEGETLLKK WALYSFNDGE EHQKILLDEL MKKAEEGDLL INPDQPR LTI
1851 PISQIAPDLI LADLPRNIML NNDELEFEEA PEFL LGDGSF GSVYRAAYEG
1901 EEVAVKIFNK HTSLRLLRQE LVVLCHLHHP SLISLLAAGI RPRMLVMELA
1951 SKGSLDRLLQ QDKASLRTL QHRIALHVA GLRYLHSAMI IYRDLKPHNV
2001 LLFTLYPNAA IIAKIADYGI AQYCCRMGIK TSEGT PGFRA PEVARGNVIY
2051 NQQADVYSFG LLLHDIWTTG SRIMEGLRFP NEFDELA IQG KLPDPVKEYG
2101 CAPWPMVEKL ITKCLKENPQ ERPTSAQVFD ILNSAELICL MRHILIPKNI
2151 IVECMVATNL NSKSATLWLG CGNTEKGQLS LFDLNTERYS YEEVADSRIL
2201 CLALVHLAAE KESWVCGTQ SGALLVINVE EETKRHTLEK MTDSVTCLHC
2251 NSLAKQSKQS NFLLVGTADG NLMIFEDKAV KCKGAAPLKT LHIGDVSTPL
2301 MCLSESLNSS ERHITWGGCG TKVFSFSNDF TIQKLIETKT NQLFSYAAFS
2351 DSNIIALAVD TALYIAKKN PVVEVWDKKT EKLCELIDCV HFLKEVMVKL
2401 NKE SKHQLSY SGRVKALCLQ KNTALWIGTG GGHILLDL S TRRVIRTIHN
2451 FCD SVRAMAT AQLGSLKNVM LVLGYK RKST EGIQE QKEIQ SCLSIWDLNL
2501 PHEVQNLEKH IEVRTELADK MRKTSVE

```

ES 2 325 797 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CellZome AG

<120> Métodos para la identificación de moléculas que interactúan con LRRK2 y para la purificación de LRRK2

<130> CEL64132PC

<150> US 60/782,119

<151> 2006-03-14

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2527

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

```

Met Ala Ser Gly Ala Cys Gln Gly Cys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1      5      10      15
Ala Leu Lys Lys Leu Ile Val Arg Leu Asn Asn Val Gln Glu Gly Lys
20     25     30
Gln Ile Glu Thr Leu Leu Gln Leu Leu Glu Asp Met Leu Val Phe Thr
35     40     45
Tyr Ser Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Glu Asp Lys Asn Phe His Val
50     55     60
Pro Leu Leu Ile Val Leu Asp Ser Tyr Met Arg Val Ala Ser Val Gln
65     70     75     80
Gln Ala Gly Trp Ser Leu Leu Cys Lys Leu Ile Glu Val Cys Pro Gly
85     90     95
Thr Leu Gln Ser Leu Ile Gly Pro Gln Asp Ile Gly Asn Asp Trp Glu
100    105    110
Val Leu Gly Ile His Arg Leu Ile Leu Lys Met Leu Thr Val His His
115    120    125
Ala Asn Val Asn Leu Ser Ile Val Gly Leu Lys Ala Leu Asp Leu Leu
130    135    140
Leu Asp Ser Gly Lys Leu Thr Leu Leu Ile Leu Asp Glu Glu Cys Asp
145    150    155    160
Ile Phe Leu Leu Ile Phe Asp Ala Met His Arg Tyr Ser Ala Asn Asp
165    170    175
Glu Val Gln Lys Leu Gly Cys Lys Ala Leu His Val Leu Phe Glu Arg
180    185    190

```

ES 2 325 797 T3

5 Val Ser Glu Glu Gln Leu Thr Glu Phe Val Glu Asn Lys Asp Tyr Thr
 195 200 205
 Ile Leu Leu Ser Thr Phe Gly Ser Phe Arg Arg Asp Lys Glu Ile Val
 210 215 220
 10 Tyr His Val Leu Cys Cys Leu His Ser Leu Ala Val Thr Cys Ser Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Val Leu Met Ser Gly Asn Val Arg Cys Tyr Asn Leu Val Val
 245 250 255
 15 Glu Ala Met Lys Ala Phe Pro Thr Asn Glu Asn Ile Gln Glu Val Ser
 260 265 270
 20 Cys Ser Leu Phe Gln Lys Leu Thr Leu Gly Asn Phe Phe Asn Ile Leu
 275 280 285
 Val Leu Asn Glu Val His Val Phe Val Val Lys Ala Val Arg Gln Tyr
 290 295 300
 25 Pro Glu Asn Ala Ala Leu Gln Ile Ser Ala Leu Ser Cys Leu Ala Leu
 305 310 315 320
 30 Leu Thr Glu Thr Ile Phe Leu Asn Gln Asp Leu Glu Glu Arg Ser Glu
 325 330 335
 35 Thr Gln Glu Gln Ser Glu Glu Glu Asp Ser Glu Lys Leu Phe Trp Leu
 340 345 350
 40 Glu Pro Cys Tyr Lys Ala Leu Val Arg His Arg Lys Asp Lys His Val
 355 360 365
 Gln Glu Ala Ala Cys Trp Ala Leu Asn Asn Leu Leu Met Tyr Gln Asn
 370 375 380
 45 Ser Leu His Glu Lys Ile Gly Asp Glu Asp Gly Gln Phe Pro Ala His
 385 390 395 400
 50 Arg Glu Val Met Leu Ser Met Leu Met His Ser Ser Ser Lys Asp Val
 405 410 415
 55 Phe Gln Ala Ala Ala His Ala Leu Ser Thr Leu Leu Glu Gln Asn Val
 420 425 430
 Asn Phe Arg Lys Ile Leu Leu Ala Lys Gly Val Tyr Leu Asn Val Leu
 435 440 445
 60 Glu Leu Met Gln Lys His Ala His Ala Pro Glu Val Ala Glu Ser Gly
 450 455 460

ES 2 325 797 T3

Cys Lys Met Leu Ser His Leu Phe Glu Gly Ser Asn Pro Ser Leu Asp
 465 470 475 480
 5 Thr Met Ala Ala Val Val Pro Lys Ile Leu Thr Val Met Lys Ala His
 485 490 495
 10 Gly Thr Ser Leu Ser Val Gln Leu Glu Ala Leu Arg Ala Ile Leu His
 500 505 510
 15 Phe Val Val Pro Gly Leu Leu Glu Glu Ser Arg Glu Asp Ser Gln Cys
 515 520 525
 Arg Pro Asn Val Leu Arg Lys Gln Cys Phe Arg Thr Asp Ile His Lys
 530 535 540
 20 Leu Val Leu Val Ala Leu Asn Arg Phe Ile Gly Asn Pro Gly Ile Gln
 545 550 555 560
 25 Lys Cys Gly Leu Lys Val Ile Ser Ser Leu Ala His Leu Pro Asp Ala
 565 570 575
 30 Thr Glu Thr Leu Ser Leu Gln Gly Ala Val Asp Ser Val Leu His Thr
 580 585 590
 Leu Gln Met Tyr Pro Asp Asp Gln Glu Ile Gln Cys Leu Gly Leu His
 595 600 605
 35 Leu Met Gly Cys Leu Met Thr Lys Lys Asn Phe Cys Ile Gly Thr Gly
 610 615 620
 40 His Leu Leu Ala Lys Ile Leu Ala Ser Thr Leu Gln Arg Phe Lys Asp
 625 630 635 640
 Val Ala Glu Val Gln Thr Thr Gly Leu Gln Thr Thr Leu Ser Ile Leu
 645 650 655
 45 Glu Leu Ser Val Ser Phe Ser Lys Leu Leu Val His Tyr Ser Phe Asp
 660 665 670
 50 Val Val Ile Phe His Gln Met Ser Ser Ser Val Val Glu Gln Lys Asp
 675 680 685
 55 Glu Gln Phe Leu Asn Leu Cys Cys Lys Cys Phe Ala Lys Val Ala Val
 690 695 700
 60 Asp Asp Glu Leu Lys Asn Thr Met Leu Glu Arg Ala Cys Asp Gln Asn
 705 710 715 720
 Asn Ser Ile Met Val Glu Cys Leu Leu Leu Leu Gly Ala Asp Ala Asn
 725 730 735

ES 2 325 797 T3

Gln Val Lys Gly Ala Thr Ser Leu Ile Tyr Gln Val Cys Glu Lys Glu
 740 745 750
 5 Ser Ser Pro Lys Leu Val Glu Leu Leu Leu Asn Gly Gly Cys Arg Glu
 755 760 765
 10 Gln Asp Val Arg Lys Ala Leu Thr Ile Ser Ile Gln Lys Gly Asp Ser
 770 775 780
 Gln Val Ile Ser Leu Leu Leu Arg Lys Leu Ala Leu Asp Leu Ala Asn
 785 790 795 800
 15 Asn Ser Ile Cys Leu Gly Gly Phe Gly Ile Gly Lys Ile Asp Pro Ser
 805 810 815
 20 Trp Leu Gly Pro Leu Phe Pro Asp Lys Ser Ser Asn Leu Arg Lys Gln
 820 825 830
 Thr Asn Thr Gly Ser Val Leu Ala Arg Lys Val Leu Arg Tyr Gln Met
 835 840 845
 25 Arg Asn Thr Leu Gln Glu Gly Val Ala Ser Gly Ser Asp Gly Asn Phe
 850 855 860
 30 Ser Glu Asp Ala Leu Ala Lys Phe Gly Glu Trp Thr Phe Ile Pro Asp
 865 870 875 880
 35 Ser Ser Met Asp Ser Val Phe Gly Gln Ser Asp Asp Leu Asp Ser Glu
 885 890 895
 Gly Ser Glu Ser Ser Phe Leu Val Lys Arg Lys Ser Asn Ser Ile Ser
 900 905 910
 40 Val Gly Glu Val Tyr Arg Asp Leu Ala Leu Gln Arg Tyr Ser Pro Asn
 915 920 925
 45 Ala Gln Arg His Ser Asn Ser Leu Gly Pro Val Phe Asp His Glu Asp
 930 935 940
 50 Leu Leu Arg Arg Lys Arg Lys Ile Leu Ser Ser Asp Glu Ser Leu Arg
 945 950 955 960
 Ser Ser Arg Leu Pro Ser His Met Arg Gln Ser Asp Ser Ser Ser Ser
 965 970 975
 55 Leu Ala Ser Glu Arg Glu His Ile Thr Ser Leu Asp Leu Ser Ala Asn
 980 985 990
 60 Glu Leu Lys Asp Ile Asp Ala Leu Ser Gln Lys Cys Cys Leu Ser Ser
 995 1000 1005
 His Leu Glu His Leu Thr Lys Leu Glu Leu His Gln Asn Ser Leu

ES 2 325 797 T3

	1010						1015						1020					
5	Thr	Ser 1025	Phe	Pro	Gln	Gln	Leu 1030	Cys	Glu	Thr	Leu	Lys 1035	Cys	Leu	Ile			
10	His	Leu 1040	Asp	Leu	His	Ser	Asn 1045	Lys	Phe	Thr	Ser	Phe 1050	Pro	Ser	Phe			
15	Val	Leu 1055	Lys	Met	Pro	Arg	Ile 1060	Thr	Asn	Leu	Asp	Ala 1065	Ser	Arg	Asn			
20	Asp	Ile 1070	Gly	Pro	Thr	Val	Val 1075	Leu	Asp	Pro	Ala	Met 1080	Lys	Cys	Pro			
25	Ser	Leu 1085	Lys	Gln	Leu	Asn	Leu 1090	Ser	Tyr	Asn	Gln	Leu 1095	Ser	Ser	Ile			
30	Pro	Glu 1100	Asn	Leu	Ala	Gln	Val 1105	Val	Glu	Lys	Leu	Glu 1110	Gln	Leu	Leu			
35	Leu	Glu 1115	Gly	Asn	Lys	Ile	Ser 1120	Gly	Ile	Cys	Ser	Pro 1125	Leu	Ser	Leu			
40	Lys	Glu 1130	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn 1135	Leu	Ser	Lys	Asn	His 1140	Ile	Pro	Ser			
45	Leu	Pro 1145	Gly	Asp	Phe	Leu	Glu 1150	Ala	Cys	Ser	Lys	Val 1155	Glu	Ser	Phe			
50	Ser	Ala 1160	Arg	Met	Asn	Phe	Leu 1165	Ala	Ala	Met	Pro	Ala 1170	Leu	Pro	Ser			
55	Ser	Ile 1175	Thr	Ser	Leu	Lys	Leu 1180	Ser	Gln	Asn	Ser	Phe 1185	Thr	Cys	Ile			
60	Pro	Glu 1190	Ala	Ile	Phe	Ser	Leu 1195	Pro	His	Leu	Arg	Ser 1200	Leu	Asp	Met			
	Ser	His 1205	Asn	Asn	Ile	Glu	Cys 1210	Leu	Pro	Gly	Pro	Ala 1215	His	Trp	Lys			
	Ser	Leu 1220	Asn	Leu	Arg	Glu	Leu 1225	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn 1230	Gln	Ile	Ser			
	Thr	Leu 1235	Asp	Phe	Ser	Glu	Asn 1240	Pro	His	Val	Trp	Ser 1245	Arg	Val	Glu			
	Lys	Leu 1250	His	Leu	Ser	His	Asn 1255	Lys	Leu	Lys	Glu	Ile 1260	Pro	Pro	Glu			
	Ile	Gly 1265	Cys	Leu	Glu	Asn	Leu 1270	Thr	Ser	Leu	Asp	Val 1275	Ser	Tyr	Asn			

ES 2 325 797 T3

5	Leu 1280	Glu	Leu	Arg	Ser	Phe	Pro 1285	Asn	Glu	Met	Gly	Lys 1290	Leu	Ser	Lys
	Ile	Trp 1295	Asp	Leu	Pro	Leu	Asp 1300	Gly	Leu	His	Leu	Asn 1305	Phe	Asp	Phe
10	Lys	His 1310	Val	Gly	Cys	Lys	Ala 1315	Lys	Asp	Ile	Ile	Arg 1320	Phe	Leu	Gln
	Gln	Arg 1325	Leu	Lys	Lys	Ala	Val 1330	Pro	Tyr	Asn	Arg	Met 1335	Lys	Leu	Met
15	Ile	Val 1340	Gly	Asn	Thr	Gly	Ser 1345	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu 1350	Leu	Gln	Gln
20	Leu	Met 1355	Lys	Met	Lys	Lys	Pro 1360	Glu	Leu	Gly	Met	Gln 1365	Gly	Ala	Thr
	Val	Gly 1370	Ile	Asp	Val	Arg	Asp 1375	Trp	Ser	Ile	Gln	Ile 1380	Arg	Gly	Lys
25	Arg	Arg 1385	Lys	Asp	Leu	Val	Leu 1390	Asn	Val	Trp	Asp	Phe 1395	Ala	Gly	Arg
30	Glu	Glu 1400	Phe	Tyr	Ser	Thr	His 1405	Pro	His	Phe	Met	Thr 1410	Gln	Arg	Ala
35	Leu	Tyr 1415	Leu	Ala	Val	Tyr	Asp 1420	Leu	Ser	Lys	Gly	Gln 1425	Ala	Glu	Val
	Asp	Ala 1430	Met	Lys	Pro	Trp	Leu 1435	Phe	Asn	Ile	Lys	Ala 1440	Arg	Ala	Ser
40	Ser	Ser 1445	Pro	Val	Ile	Leu	Val 1450	Gly	Thr	His	Leu	Asp 1455	Val	Ser	Asp
45	Glu	Lys 1460	Gln	Arg	Lys	Ala	Cys 1465	Ile	Ser	Lys	Ile	Thr 1470	Lys	Glu	Leu
50	Leu	Asn 1475	Lys	Arg	Gly	Phe	Pro 1480	Thr	Ile	Arg	Asp	Tyr 1485	His	Phe	Val
	Asn	Ala 1490	Thr	Glu	Glu	Ser	Asp 1495	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu 1500	Arg	Lys	Thr
55	Ile	Ile 1505	Asn	Glu	Ser	Leu	Asn 1510	Phe	Lys	Ile	Arg	Asp 1515	Gln	Pro	Val
60	Val	Gly 1520	Gln	Leu	Ile	Pro	Asp 1525	Cys	Tyr	Val	Glu	Leu 1530	Glu	Lys	Ile

65

ES 2 325 797 T3

	Ile	Leu	Ser	Glu	Arg	Lys	Ala	Val	Pro	Thr	Glu	Phe	Pro	Val	Ile
		1535					1540					1545			
5	Asn	Arg	Lys	His	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Asn	Glu	His	Gln	Leu	Gln
		1550					1555					1560			
10	Leu	Asp	Glu	Asn	Glu	Leu	Pro	His	Ala	Val	His	Phe	Leu	Asn	Glu
		1565					1570					1575			
15	Ser	Gly	Val	Leu	Leu	His	Phe	Gln	Asp	Pro	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser
		1580					1585					1590			
	Asp	Leu	Tyr	Phe	Val	Glu	Pro	Lys	Trp	Leu	Cys	Lys	Val	Met	Ala
		1595					1600					1605			
20	Gln	Ile	Leu	Thr	Val	Lys	Val	Asp	Gly	Cys	Leu	Lys	His	Pro	Lys
		1610					1615					1620			
25	Gly	Ile	Ile	Ser	Arg	Arg	Asp	Val	Glu	Lys	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys
		1625					1630					1635			
	Lys	Arg	Phe	Pro	Lys	Asn	Tyr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Lys	Leu	Leu
		1640					1645					1650			
30	Glu	Lys	Phe	Gln	Ile	Ala	Leu	Pro	Ile	Gly	Glu	Glu	Tyr	Leu	Leu
		1655					1660					1665			
35	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Asp	His	Arg	Pro	Val	Ile	Glu	Leu	Pro
		1670					1675					1680			
40	His	Cys	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile	Ile	Ile	Arg	Leu	Tyr	Glu	Met	Pro
		1685					1690					1695			
	Tyr	Phe	Pro	Met	Gly	Phe	Trp	Ser	Arg	Leu	Ile	Asn	Arg	Leu	Leu
		1700					1705					1710			
45	Glu	Ile	Ser	Pro	Phe	Met	Leu	Ser	Gly	Arg	Glu	Arg	Ala	Leu	Arg
		1715					1720					1725			
50	Pro	Asn	Arg	Met	Tyr	Trp	Arg	Gln	Gly	Ile	Tyr	Leu	Asn	Trp	Ser
		1730					1735					1740			
55	Pro	Glu	Ala	Tyr	Cys	Leu	Val	Gly	Ser	Glu	Val	Leu	Asp	Asn	Arg
		1745					1750					1755			
	Pro	Glu	Ser	Phe	Leu	Lys	Ile	Thr	Val	Pro	Ser	Cys	Arg	Lys	Gly
		1760					1765					1770			
60	Cys	Ile	Leu	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Asp	His	Ile	Asp	Ser	Leu	Met
		1775					1780					1785			

ES 2 325 797 T3

Glu Glu Trp Phe Pro Gly Leu Leu Glu Ile Asp Ile Cys Gly Glu
 1790 1795 1800
 5
 Gly Glu Thr Leu Leu Lys Lys Trp Ala Leu Tyr Ser Phe Asn Asp
 1805 1810 1815
 10
 Gly Glu Glu His Gln Lys Ile Leu Leu Asp Glu Leu Met Lys Lys
 1820 1825 1830
 15
 Ala Glu Glu Gly Asp Leu Leu Ile Asn Pro Asp Gln Pro Arg Leu
 1835 1840 1845
 Thr Ile Pro Ile Ser Gln Ile Ala Pro Asp Leu Ile Leu Ala Asp
 1850 1855 1860
 20
 Leu Pro Arg Asn Ile Met Leu Asn Asn Asp Glu Leu Glu Phe Glu
 1865 1870 1875
 25
 Glu Ala Pro Glu Phe Leu Leu Gly Asp Gly Ser Phe Gly Ser Val
 1880 1885 1890
 Tyr Arg Ala Ala Tyr Glu Gly Glu Glu Val Ala Val Lys Ile Phe
 1895 1900 1905
 30
 Asn Lys His Thr Ser Leu Arg Leu Leu Arg Gln Glu Leu Val Val
 1910 1915 1920
 35
 Leu Cys His Leu His His Pro Ser Leu Ile Ser Leu Leu Ala Ala
 1925 1930 1935
 40
 Gly Ile Arg Pro Arg Met Leu Val Met Glu Leu Ala Ser Lys Gly
 1940 1945 1950
 Ser Leu Asp Arg Leu Leu Gln Gln Asp Lys Ala Ser Leu Thr Arg
 1955 1960 1965
 45
 Thr Leu Gln His Arg Ile Ala Leu His Val Ala Asp Gly Leu Arg
 1970 1975 1980
 50
 Tyr Leu His Ser Ala Met Ile Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro His
 1985 1990 1995
 55
 Asn Val Leu Leu Phe Thr Leu Tyr Pro Asn Ala Ala Ile Ile Ala
 2000 2005 2010
 Lys Ile Ala Asp Tyr Gly Ile Ala Gln Tyr Cys Cys Arg Met Gly
 2015 2020 2025
 60
 Ile Lys Thr Ser Glu Gly Thr Pro Gly Phe Arg Ala Pro Glu Val
 2030 2035 2040
 65
 Ala Arg Gly Asn Val Ile Tyr Asn Gln Gln Ala Asp Val Tyr Ser

ES 2 325 797 T3

	2045	2050	2055
5	Phe Gly Leu Leu Leu His	Asp Ile Trp Thr Thr	Gly Ser Arg Ile
	2060	2065	2070
10	Met Glu Gly Leu Arg Phe	Pro Asn Glu Phe Asp	Glu Leu Ala Ile
	2075	2080	2085
15	Gln Gly Lys Leu Pro Asp	Pro Val Lys Glu Tyr	Gly Cys Ala Pro
	2090	2095	2100
20	Trp Pro Met Val Glu Lys	Leu Ile Thr Lys Cys	Leu Lys Glu Asn
	2105	2110	2115
25	Pro Gln Glu Arg Pro Thr	Ser Ala Gln Val Phe	Asp Ile Leu Asn
	2120	2125	2130
30	Ser Ala Glu Leu Ile Cys	Leu Met Arg His Ile	Leu Ile Pro Lys
	2135	2140	2145
35	Asn Ile Ile Val Glu Cys	Met Val Ala Thr Asn	Leu Asn Ser Lys
	2150	2155	2160
40	Ser Ala Thr Leu Trp Leu	Gly Cys Gly Asn Thr	Glu Lys Gly Gln
	2165	2170	2175
45	Leu Ser Leu Phe Asp Leu	Asn Thr Glu Arg Tyr	Ser Tyr Glu Glu
	2180	2185	2190
50	Val Ala Asp Ser Arg Ile	Leu Cys Leu Ala Leu	Val His Leu Ala
	2195	2200	2205
55	Ala Glu Lys Glu Ser Trp	Val Val Cys Gly Thr	Gln Ser Gly Ala
	2210	2215	2220
60	Leu Leu Val Ile Asn Val	Glu Glu Glu Thr Lys	Arg His Thr Leu
	2225	2230	2235
65	Glu Lys Met Thr Asp Ser	Val Thr Cys Leu His	Cys Asn Ser Leu
	2240	2245	2250
70	Ala Lys Gln Ser Lys Gln	Ser Asn Phe Leu Leu	Val Gly Thr Ala
	2255	2260	2265
75	Asp Gly Asn Leu Met Ile	Phe Glu Asp Lys Ala	Val Lys Cys Lys
	2270	2275	2280
80	Gly Ala Ala Pro Leu Lys	Thr Leu His Ile Gly	Asp Val Ser Thr
	2285	2290	2295
85	Pro Leu Met Cys Leu Ser	Glu Ser Leu Asn Ser	Ser Glu Arg His
	2300	2305	2310

ES 2 325 797 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

Ile Thr Trp Gly Gly Cys Gly Thr Lys Val Phe Ser Phe Ser Asn
 2315 2320 2325
 Asp Phe Thr Ile Gln Lys Leu Ile Glu Thr Lys Thr Asn Gln Leu
 2330 2335 2340
 Phe Ser Tyr Ala Ala Phe Ser Asp Ser Asn Ile Ile Ala Leu Ala
 2345 2350 2355
 Val Asp Thr Ala Leu Tyr Ile Ala Lys Lys Asn Ser Pro Val Val
 2360 2365 2370
 Glu Val Trp Asp Lys Lys Thr Glu Lys Leu Cys Glu Leu Ile Asp
 2375 2380 2385
 Cys Val His Phe Leu Lys Glu Val Met Val Lys Leu Asn Lys Glu
 2390 2395 2400
 Ser Lys His Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Arg Val Lys Ala Leu Cys
 2405 2410 2415
 Leu Gln Lys Asn Thr Ala Leu Trp Ile Gly Thr Gly Gly Gly His
 2420 2425 2430
 Ile Leu Leu Leu Asp Leu Ser Thr Arg Arg Val Ile Arg Thr Ile
 2435 2440 2445
 His Asn Phe Cys Asp Ser Val Arg Ala Met Ala Thr Ala Gln Leu
 2450 2455 2460
 Gly Ser Leu Lys Asn Val Met Leu Val Leu Gly Tyr Lys Arg Lys
 2465 2470 2475
 Ser Thr Glu Gly Ile Gln Glu Gln Lys Glu Ile Gln Ser Cys Leu
 2480 2485 2490
 Ser Ile Trp Asp Leu Asn Leu Pro His Glu Val Gln Asn Leu Glu
 2495 2500 2505
 Lys His Ile Glu Val Arg Thr Glu Leu Ala Asp Lys Met Arg Lys
 2510 2515 2520
 Thr Ser Val Glu
 2525

<210> 2

60 <211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

65 <223> péptido

ES 2 325 797 T3

<400> 2

5 Tyr Ser Ala Asn Asp Glu Val Gln Lys
1 5

 $\langle 210 \rangle$ 3

<211> 13

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> péptido

<400> 3

20 His Ala His Ala Pro Glu Val Ala Glu Ser Gly Cys Lys
1 5 10

<210> 4

25 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <223> péptido

<400> 4

35 Phe Ile Gly Asn Pro Gly Ile Gln Lys.
1 5

<210> 5

40 $\langle 211 \rangle$ 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido

<400> 5

50
Ile Leu Ala Ser Thr Leu Gln Arg
1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido

65

ES 2 325 797 T3

<400> 6

5 Gly Ala Thr Ser Leu Ile Tyr Gln Val Cys Glu Lys
1 5 10

<210> 7

 $\langle 211 \rangle$ 11

10 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> péptido

<400> 7

20 Gly Asp Ser Gln Val Ile Ser Leu Leu Leu Arg
1 5 10

<210> 8

25 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

30 <223> péptido

<400> 8

35
Gln Thr Asn Thr Gly Ser Val Leu Ala Arg
1 5 10

40 <210> 9

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido

<400> 9

Leu Glu Leu His Gln Asn Ser Leu Thr Ser Phe Pro Gln Gln Leu Cys
1 5 10 15

55 Glu Thr Leu Lys.
20

 $\langle 210 \rangle$ 10

60 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido

ES 2 325 797 T3

<400> 10

Leu Leu Glu Ile Ser Pro Phe Met Leu Ser Gly Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 6

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> péptido

<400> 11

Ile Thr Val Pro Ser Cys
1 5

<210> 12

25 $\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido

<400> 12

35
Thr Ser Glu Gly Thr Pro Gly Phe Arg
1 5

40 $\langle 210 \rangle$ 13

<211> 8

<212> PRT

45 <213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido

50 <400> 13

His Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Arg
1 5

55

60

65