

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 541**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48

(2006.01)

G01N 33/573

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09709335 .5**

96 Fecha de presentación: **03.02.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2245181**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **OBTENCIÓN DEL PERFIL DE SELECTIVIDAD DE MOLÉCULAS DE INTERACCIÓN CON PI3K
CONTRA DIANAS MÚLTIPLES.**

30 Prioridad:
04.02.2008 EP 08002053

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2012

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

72 Inventor/es:
**CANSFIELD, Andrew David;
BERGAMINI MOORE, Giovanna y
NEUBAUER, Gitte**

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

ES 2 375 541 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Obtención del perfil de selectividad de moléculas de interacción con PI3K contra dianas múltiples

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para la identificación y caracterización de moléculas de interacción con PI3K y para la purificación de PI3K usando 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]propionamida como ligando para PI3K. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de interacción por ejemplo para el tratamiento de cáncer, enfermedades metabólicas o trastornos autoinmunitarios/inflamatorios.

10 Las cinasas catalizan la fosforilación de proteínas, lípidos, azúcares, nucleósidos y otros metabolitos celulares y desempeñan papeles clave en todos los aspectos de la fisiología de células eucariotas. Especialmente, las proteína cinasas y lípido cinasas participan en los acontecimientos de señalización que controlan la activación, el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células en respuesta a estímulos o mediadores extracelulares tales como factores de crecimiento, citocinas o quimiocinas. En general, las proteína cinasas se clasifican en dos grupos, las que fosforilan preferentemente residuos de tirosina y las que fosforilan preferentemente residuos de serina y/o treonina.

15 La actividad proteína cinasa inapropiadamente alta está implicada en muchas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades metabólicas y trastornos autoinmunitarios/inflamatorios. Esto puede estar provocado o bien directamente o bien indirectamente por el fallo de los mecanismos de control debido a mutación, sobreexpresión o activación inapropiada de la enzima. En todos estos casos, se espera que la inhibición selectiva de la cinasa tenga un efecto beneficioso.

20 Un grupo de lípido cinasas que se ha convertido en un punto de atención reciente del descubrimiento de fármacos es la familia de fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K). Miembros de la familia de PI3K son lípido cinasas que catalizan la transferencia del fosfato gamma del ATP al grupo hidroxilo 3' del fosfatidilinositol y sus derivados, denominados conjuntamente fosfoinosítidos. Se han aislado ocho miembros (isoformas) de la familia de PI3K a partir de células de mamífero hasta la fecha y se han agrupado en las tres clases según su estructura primaria y especificidad de sustrato (clase IA: PI3K alfa, beta y delta; clase IB: PI3K gamma; clase II: PI3KC2 alfa, beta y gamma; clase III: homólogo de levadura Vps34) (Fruman *et al.*, 1998. Fosfoinosítide cinasas. Annual Review Biochemistry 67, 481-507; Cantley, L.C., 2002, Science 296, 1655-1657).

25 Se sabe que las células de mamífero expresan tres isoformas de la subunidad catalítica de la clase IA de PI3K (p110 alfa, p110 beta y p110 delta, sinónimo "PI3K delta"). La clase IB contiene sólo un miembro (subunidad catalítica) que se ha denominado p110gamma o PI3K gamma. Además de su actividad lípido cinasa, PI3K gamma también presenta una actividad serina / treonina proteína cinasa tal como se demuestra mediante autofosforilación.

30 El estudio de ratones manipulados genéticamente en los que se delecionaron los genes que codifican para PI3K gamma o delta proporciona información importante sobre la función fisiológica de estas cinasas y su posible utilidad como dianas farmacológicas. Ratones que carecen de PI3K gamma o delta son viables y presentan fenotipos característicos que sugieren varias posibles indicaciones terapéuticas. PI3K gamma parece ser un mediador principal del sistema inmunitario innato. Por ejemplo, macrófagos y granulocitos neutrófilos deficientes en PI3K gamma muestran una capacidad deteriorada para infiltrarse en el peritoneo inflamado. Los mastocitos representan otro tipo de célula afectada en ratones deficientes en PI3K gamma. El fenotipo de ratones que carecen de PI3K delta se caracteriza por un deterioro de las funciones del linfocito y apuntan hacia una función dominante en el control de la respuesta inmunitaria adaptativa (Wetzker y Rommel, Current Pharmaceutical Design, 2004, 10,1915-1922).

35 En contraposición a las isoformas PI3K alfa y beta ampliamente expresadas, las isoformas PI3K gamma y delta específicas hematopoyéticas sugieren importantes indicaciones terapéuticas. Ambas isoformas aparecen como dianas ideales para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias mediadas por fagocitos hiperactivos, mastocitos, linfocitos B y T (por ejemplo artritis reumatoide, asma o reacciones alérgicas). Con el fin de evitar efectos secundarios no deseados, son necesarios inhibidores altamente selectivos de isoforma (Ohashi y Woodgett 2005, Nature Medicine 11, 924-925).

40 Los miembros de la familia de cinasas relacionadas con fosfatidilinositol cinasa (PIKK) son cinasas de alta masa molecular implicadas en la progresión del ciclo celular, la recombinación del ADN y la detección de daño en el ADN. El gen ATM humano, que es defectuoso en células de pacientes con ataxia-telangiectasia y está implicado en la detección y respuesta de células a ADN dañado, es un miembro de esta familia. Otro es mTOR (sinónimo FRAP), que está implicado en una ruta sensible a rapamicina que conduce a la progresión del ciclo celular a G1 (Shilo, 2003. Nature Reviews Cancer 3, 155-168).

Un requisito previo para la identificación y caracterización de inhibidores de PI3K es la provisión de ensayos adecuados, preferiblemente formas fisiológicas de la proteína diana. En la técnica, se han propuesto varias estrategias para abordar este tema.

5 De manera convencional, la actividad lípido cinasa de PI3K puede medirse usando enzima recombinante o purificada en un ensayo basado en disolución con vesículas de fosfolípidos. La reacción se finaliza mediante la adición de disolventes orgánicos acidificados y posterior separación de fases mediante extracción o análisis de cromatografía en capa fina (Carpenter *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265, 19704-19711).

10 Otro ensayo descrito en la técnica se basa en la transferencia de fosfato de ATP radiomarcado a fosfatidilinositol inmovilizado sobre placas. Este tipo de ensayo también usa enzima PI3K gamma recombinante pero puede realizarse en un modo de alto rendimiento (Fuchikami *et al.*, 2002, J. Biomol. Screening 7, 441-450).

Aún otro ensayo de selección bioquímico se basa en un formato de polarización de fluorescencia (FP) competitiva usando fosfoinosítido marcado con fluoróforo (Drees *et al.*, 2003, Comb. Chem. High Throughput Screening 6, 321-330).

15 Finalmente, se notificó un ensayo de redistribución de Akt-EGFP basado en células que se basa en la obtención de imágenes microscópicas de fluorescencia y análisis de imágenes automatizado. Con este fin, se transfectaron de manera estable células de ovario de hámster chino (CHO) con el receptor de insulina humano y un constructo de fusión de proteína fluorescente verde potenciada con Akt1 (EGFP). Tras la estimulación con factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), se activó la PI3K y se reclutó la proteína Akt1-EGFP a la membrana celular. La validación del ensayo de redistribución con inhibidores selectivos de la isoforma de PI3K demostró que PI3K alfa es la isoforma principal activada en células huésped CHO tras la estimulación con IGF-1 (Wolff *et al.*, Comb. Chem. High Throughput Screen. 9, 339-350).

25 Otro requisito previo, aunque no en todos los casos necesario para la identificación de inhibidores de cinasa selectivos, es un método que permite determinar la selectividad de diana de estas moléculas. Por ejemplo, puede preverse proporcionar moléculas que se unen a e inhiben una diana farmacológica particular pero no interaccionan con una diana estrechamente relacionada, cuya inhibición podría conducir a efectos secundarios. De manera convencional, se usan grandes paneles de ensayos enzimáticos individuales para evaluar el efecto inhibitor de un compuesto para cinasas (Knight *et al.*, 2004, Bioorganic and Medicinal Chemistry 12, 4749-4759; Knight *et al.*, 2006, Cell 125, 733-747). Más recientemente, se han empleado cinasas o dominios cinasas presentados en bacteriófagos para evaluar la capacidad de un compuesto dado para interaccionar con un gran conjunto de cinasas (Karaman *et al.*, 2008, Nature Biotechnology 26, 127-132). Además, se han descrito métodos de proteómica química que permiten la obtención del perfil de inhibidores de cinasas frente al proteoma (documento WO 2006/134056; Bantscheff *et al.*, 2007, Nature Biotechnology 25, 1035-1044; Patarrozly *et al.*, 2007, Biochemistry 46, 350-358; Gharbi *et al.*, 2007, Biochem. J. 404, 15-21; documento WO2008/015013).

35 En vista de lo anterior, existe una necesidad de proporcionar métodos eficaces para la identificación y la obtención del perfil de selectividad de compuestos de interacción con PI3K así como de métodos para la purificación de PI3K.

Para cumplir con esta necesidad, la invención proporciona en un primer aspecto un método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de

a) proporcionar una preparación de proteínas que contiene PI3K,

40 b) poner en contacto la preparación de proteínas con 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,

c) incubar el complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K con un compuesto dado,

45 d) determinar si el compuesto puede separar PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada, y

e) determinar si el compuesto puede separar también ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR de la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada.

50 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de

- a) proporcionar una preparación de proteínas que contiene PI3K,
- b) poner en contacto la preparación de proteínas con 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[3-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,
- 5 c) detectar el complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[S-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en la etapa b), y
- d) detectar si también se ha formado un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR en la etapa b).
- 10 En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar dos alícuotas de una preparación de proteínas que contiene PI3K,
- b) poner en contacto una alícuota con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,
- 15 c) poner en contacto la otra alícuota con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,
- 20 d) determinar la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en las etapas b) y c), y
- e) determinar si también se ha formado un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR en las etapas b) y c).
- 25 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene PI3K,
- b) incubar una alícuota con un compuesto dado,
- c) recoger las células de cada alícuota,
- 30 d) lisar las células con el fin de obtener preparaciones de proteínas,
- e) poner en contacto las preparaciones de proteínas con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K, y
- 35 f) determinar la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en cada alícuota en la etapa e), y
- g) determinar si también se ha formado un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR en la etapa e).
- 40 En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que el ligando 1 de feniltiazol (3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma) es un ligando de PI3K y un ligando de otros miembros de la familia PIKK, concretamente ATM, ATR, DNAPK y mTOR (FRAP). Esto permite el uso del ligando 1 de feniltiazol en ensayos de selección, por ejemplo en ensayos de selección competitiva así como en métodos para la purificación de PI3K.
- La estructura de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-

propionamida también se facilita en la figura 1. Este compuesto es un tiazol sustituido (3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida) que según la figura 1 tiene clorhidrato como anión en disolución líquida. Sin embargo, se prevén también contraiones adicionales en el contexto de la presente invención. La 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida puede estar covalentemente acoplada a un material de soporte sólido adecuado mediante el grupo amino primario y usarse para el aislamiento de proteínas de unión. La síntesis de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida se describe en el ejemplo 1. Según la invención, la expresión “3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma” también incluye compuestos que comprenden el núcleo idéntico pero que tienen otro conector, preferiblemente acoplado al nitrógeno que no es parte de las estructuras cíclicas, para la unión al soporte sólido. Normalmente, los conectores tienen estructuras principales de 8, 9 ó 10 átomos. Los conectores pueden contener un grupo activo o bien amino, hidroxilo o bien carboxilo.

Por tanto, en una realización preferida, la expresión “3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma” también incluye compuestos que tienen el mismo núcleo de N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida pero que comprenden otro conector en el átomo de N, por ejemplo un alquilcarbonilo C1-C8 o un alquilaminocarbonilo C1-C8, estando opcionalmente cualquiera de los cuales opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, amino, alquilamino C1-C8, alcoxicarbonilo C1-C8, alcoxilo C1-C8 opcionalmente sustituido con hidroxilo o alquilo C1-C8 opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno. Además, esta expresión también incluye compuestos tal como se describieron anteriormente que tienen en lugar del residuo de 4-cloro otro halógeno, por ejemplo bromuro o que están sustituidos adicionalmente en el anillo de fenilo, por ejemplo con halógeno. Además, en lugar del grupo metanosulfonyl, también puede estar presente otro grupo como un grupo alquilo C1-C8, carboxilo o hidroxilo, opcionalmente sustituido con halógeno.

En una realización especialmente preferida, los compuestos que se encuentran bajo la expresión “3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma” se seleccionan del grupo que consiste en clorhidrato de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida, 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y compuestos con el mismo núcleo de N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonyl-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida que están sólo sustituidos adicionalmente en el átomo de N con alquilcarbonilo C1-C8 o alquilaminocarbonilo C1-C8, estando opcionalmente cualquiera de los cuales opcionalmente sustituido con halógeno, hidroxilo, amino, alquilamino C1-C8, alcoxicarbonilo C1-C8, alcoxilo C1-C8 opcionalmente sustituido con hidroxilo o alquilo C1-C8 opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno.

Según la presente invención, “PI3K” comprende todos los miembros de la familia de PI3K que comprende la clase IA (por ejemplo PI3K alfa, beta y delta), la clase IB (por ejemplo PI3K gamma), la clase II (por ejemplo PI3KC2 alfa, beta y gamma) y la clase III (por ejemplo homólogo de levadura Vps34).

La secuencia de PI3K gamma humana (el único miembro conocido hasta la fecha de la clase IB) se facilita en la figura 4.

La secuencia de PI3K delta humana (un miembro de la clase IA) se facilita en la figura 5.

Según la presente invención, la expresión “PI3K” se refiere a proteínas tanto humanas como otras de esta familia. La expresión incluye especialmente derivados funcionalmente activos de las mismas, o fragmentos funcionalmente activos de las mismas, u homólogos de las mismas, o variantes codificadas por un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico que codifica para dicha proteína en condiciones de baja rigurosidad. Preferiblemente, estas condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación en un tampón que comprende formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, BSA al 0,02%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 ug/ml y sulfato de dextrano al 10% (peso/vol.) durante 18-20 horas a 40°C, lavando en un tampón que consiste en 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 tampón que consiste en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) EDTA 5 mM y SDS al 0,1% durante 1,5 horas a 60°C.

Según la presente invención, “ATM” significa proteína de ataxia telangiectasia mutada. La proteína de ATM es un miembro de la familia de fosfatidilinositol-3 cinasa de proteínas que responden al daño en el ADN fosforilando sustratos clave implicados en la reparación del ADN y/o el control del ciclo celular (Shilo, 2003. Nature Reviews Cancer 3, 155-168).

Según la presente invención, “ATR” significa proteína relacionada con RAD3 y ataxia telangiectasia (sinónimo proteína 1 relacionada con FRAP, FRP1).

Según la presente invención, “DNAPK” significa proteína cinasa dependiente de ADN. El gen PRKDC codifica para la subunidad catalítica de una serina/reonina proteína cinasa dependiente de ADN nuclear (DNA-PK). El segundo

componente es el antígeno autoinmunitario Ku (152690), que está codificado por el gen G22P1 en el cromosoma 22q. Por sí misma, la subunidad catalítica de DNA-PK es inactiva y depende del componente G22P1 para dirigirla al ADN y desencadenar su actividad cinasa; PRKDC debe estar unido al ADN para expresar sus propiedades catalíticas.

- 5 Según la presente invención, "mTOR" significa diana de mamífero de rapamicina (mTOR, también conocida como FRAP o RAFT1) (Tsang *et al.*, 2007, Drug Discovery Today 12, 112-124). La proteína mTOR es una cinasa grande de 289 kDA que se produce en todos los organismos eucariotas secuenciados hasta la fecha. La secuencia del dominio "cinasa relacionada con fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)" (PIKK) carboxilo terminal está altamente conservada entre especies y presenta actividad serina y treonina cinasa pero no actividad lípido cinasa detectable.
- 10 Según la presente invención, las expresiones "ATM", "ATR", "DNAPK" o "mTOR" se refieren a proteínas tanto humanas como otras de esta familia (Shilo, 2003. Nature Reviews Cancer 3, 155-168). La expresión incluye especialmente derivados funcionalmente activos de las mismas, o fragmentos funcionalmente activos de las mismas, u homólogos de las mismas, o variantes codificadas por un ácido nucleico que hibrida con el ácido nucleico que codifica para dicha proteína en condiciones de baja rigurosidad. Preferiblemente, estas condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación en un tampón que comprende formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, BSA al 0,02%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 ug/ml y sulfato de dextrano al 10% (peso/vol) durante 18-20 horas a 40°C, lavando en un tampón que consiste en 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 tampón que consiste en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4) EDTA 5 mM y SDS al 0,1 % durante 1,5 horas a 60°C.

- 20 3-(2-{2-[2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma es un ligando para todas las isoformas de PI3K (véase anteriormente). Sin embargo, en toda la invención, se prefiere que PI3K sea PI3K gamma o PI3K delta, especialmente las isoformas humanas de las mismas.

- 25 En algunos aspectos de la invención, en primer lugar se proporciona una preparación de proteínas que contiene PI3K. Los métodos de la presente invención pueden realizarse con cualquier preparación de proteínas como material de partida, siempre que la PI3K se solubilice en la preparación. Los ejemplos incluyen una mezcla líquida de varias proteínas, un lisado celular, un lisado celular parcial que contiene no todas las proteínas presentes en la célula original o una combinación de varios lisados celulares, en particular en casos en los que no toda proteína diana de interés está presente en cada lisado celular. La expresión "preparación de proteínas" también incluye proteína purificada disuelta.

- 30 La presencia de especies de proteína PI3K en una preparación de proteínas de interés puede detectarse en análisis de inmunotransferencia de tipo Western estudiados con sondas con anticuerpos que están dirigidos específicamente contra PI3K. En el caso de que PI3K sea una isoforma específica (por ejemplo PIK3 gamma y/o PI3K delta), la presencia de dicha isoforma puede determinarse mediante un anticuerpo específico de isoforma. Tales anticuerpos se conocen en la técnica (Sasaki *et al.*, 2000, Nature 406, 897-902; Deora *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273, 29923-29928). Alternativamente, también podría usarse espectrometría de masas (EM) (véase a continuación).

La presencia de la proteína de ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR en una preparación de proteínas de interés puede detectarse en análisis de inmunotransferencia de tipo Western estudiados con sondas con anticuerpos que son específicos para dicha proteína.

- 40 Pueden obtenerse lisados celulares o lisados celulares parciales aislando orgánulos celulares (por ejemplo núcleo, mitocondrias, ribosomas, aparato de golgi etc.) en primer lugar y luego preparando preparaciones de proteínas derivadas de estos orgánulos. Se conocen en la técnica métodos para el aislamiento de orgánulos celulares (Capítulo 4.2 Purification of Organelles from Mammalian Cells en "Current Protocols in Protein Science", Editores: John.E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8).

- 45 Además, pueden prepararse preparaciones de proteínas mediante fraccionamiento de extractos celulares enriqueciendo de ese modo tipos específicos de proteínas tales como proteínas de membrana o citoplásmicas (Capítulo 4.3 Subcellular Fractionation of Tissue Culture Cells en "Current Protocols in Protein Science", Editores: John.E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, ISBN: 0-471-14098-8).

- 50 Además, pueden usarse preparaciones de proteínas a partir de fluidos corporales (por ejemplo sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y orina).

Por ejemplo, pueden usarse lisados de embriones completos derivados de estadios de desarrollo definidos o estadios adultos de organismos modelo tales como *C. elegans*. Además, órganos completos tales como corazón disecado de ratones pueden ser la fuente de preparaciones de proteínas. Estos órganos también pueden perfundirse *in vitro* con el fin de obtener una preparación de proteínas.

Además, la preparación de proteínas puede ser una preparación que contiene PI3K que se ha producido de manera recombinante. Están ampliamente establecidos métodos para la producción de proteínas recombinantes en células procariotas y eucariotas (Capítulo 5 Production of Recombinant Proteins en "Current Protocols in Protein Science", Editores: John. E. Coligan, Ben M. Dunn, Hidde L. Ploegh, David W. Speicher, Paul T. Wingfield; Wiley, 1995, ISBN: 0-471-14098-8).

En una realización preferida de los métodos de la invención, la provisión de una preparación de proteínas incluye las etapas de recoger al menos una célula que contiene PI3K y lisar la célula.

Células adecuadas para este fin son por ejemplo las células o tejidos en los que se expresan miembros de la familia de PI3K. Se expresan miembros de la familia de PI3K en la mayoría de células y tejidos. PI3K gamma se expresa preferentemente en células del sistema hematopoyético (por ejemplo granulocitos, macrófagos, mastocitos y plaquetas) pero también en cardiomiocitos, músculo liso vascular y células del epitelio vascular. PI3K delta se expresa de manera ubicua con expresión pronunciada en linfocitos, granulocitos y mastocitos.

Por tanto, en una realización preferida, células aisladas de sangre periférica representan un material biológico adecuado. Se conocen ampliamente procedimientos para la preparación y el cultivo de subpoblaciones de linfocitos y linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica (PBL) (W.E Biddison, Capítulo 2.2 "Preparation and culture of human lymphocytes" en Current Protocols in Cell Biology, 1998, John Wiley & Sons, Inc.). Por ejemplo, la centrifugación en gradiente de densidad es un método para la separación de linfocitos de otras poblaciones de células sanguíneas (por ejemplo eritrocitos y granulocitos). Pueden aislarse subpoblaciones de linfocitos humanos mediante sus receptores de superficie celular específicos que pueden reconocerse por anticuerpos monoclonales. El método de separación física implica el acoplamiento de estos reactivos de anticuerpo a perlas magnéticas, lo que permite el enriquecimiento de células a las que se unen estos anticuerpos (selección positiva). Las células de linfocitos aisladas pueden cultivarse y estimularse adicionalmente añadiendo anticuerpos dirigidos contra el receptor de células T o co-receptores tales como CD-3 para iniciar la señalización del receptor de células T y posteriormente la fosforilación de PI3K (Houtman *et al.*, 2005, The Journal of Immunology 175(4), 2449-2458).

Como alternativa a células humanas primarias, pueden usarse líneas celulares cultivadas (por ejemplo células MOLT-4 o células de leucemia basofílica de rata (RBL-2H3)). Las células RBL-2H3 pueden estimularse mediante la reticulación del receptor de alta afinidad para IgE (FcepsilonRI) mediante antígenos multivalentes para inducir la activación de PI3K (Kato *et al.*, 2006, J. Immunol. 177(1): 147-154).

En una realización preferida, la célula es parte de un sistema de cultivo celular y se conocen en la técnica métodos para la recogida de una célula de un sistema de cultivo celular (bibliografía citada anteriormente).

La elección de la célula dependerá principalmente de la expresión de PI3K, puesto que tiene que garantizarse que la proteína está presente principalmente en la célula de elección. Con el fin de determinar si una célula dada es un sistema de partida adecuado para los métodos de la invención, podrían ser adecuados métodos como inmunotransferencia de tipo Western, métodos de detección de ácidos nucleicos basados en PCR, transferencias de tipo Northern y métodos de microalineamientos de ADN ("chips de ADN") con el fin de determinar si una proteína de interés dada está presente en la célula.

La elección de la célula también puede verse influida por el fin del estudio. Si es necesario analizar la eficacia *in vivo* de un fármaco dado, entonces pueden seleccionarse células o tejidos en los que se produce el efecto terapéutico deseado (por ejemplo granulocitos o mastocitos). Por el contrario, para la dilucidación de dianas de proteína que median efectos secundarios no deseados, puede analizarse la célula o el tejido en el que se observa el efecto secundario (por ejemplo cardiomiocitos, células del epitelio o del músculo liso vascular).

Además, se prevé dentro de la presente invención que la célula que contiene PI3K pueda obtenerse de un organismo, por ejemplo mediante biopsia. Se conocen en la técnica métodos correspondientes. Por ejemplo, una biopsia es un procedimiento de diagnóstico usado para obtener una pequeña cantidad de tejido, que entonces puede examinarse microscópicamente o con métodos bioquímicos. Las biopsias son importantes para diagnosticar, clasificar y determinar el estadio de una enfermedad, pero también para evaluar y monitorizar el tratamiento farmacológico.

Se abarca dentro de la presente invención que al recogerse la al menos una célula, la lisis se realiza simultáneamente. Sin embargo, se prefiere igualmente que en primer lugar se coseche la célula y luego se lise por separado.

Se conocen en la técnica métodos para la lisis de células (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 impreso: 0471328456; ISBN en línea: 0471457817). La lisis de diferentes tipo de células y tejidos puede lograrse mediante homogeneizadores (por ejemplo homogeneizador 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.

Según los métodos de la invención, la preparación de proteínas que contiene PI3K se pone en contacto con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K.

En la presente invención, la expresión “complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K” indica un complejo en el que una 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida interacciona con PI3K, por ejemplo mediante unión covalente o, lo más preferido, mediante unión no covalente. Se aplica la misma definición también para complejos entre una 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK o mTOR.

El experto sabrá qué condiciones pueden aplicarse con el fin de permitir la formación del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K.

En el contexto de la presente invención, la expresión “en condiciones que permiten la formación del complejo” incluye todas las condiciones en las que tal formación, preferiblemente tal unión, es posible. Esto incluye la posibilidad de tener el soporte sólido sobre una fase inmovilizada y verter el lisado sobre el mismo. En otra realización preferida, también se incluye que el soporte sólido esté en una forma particulada y se mezcle con el lisado celular.

En el contexto de unión no covalente, la unión entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y PI3K es, por ejemplo, mediante puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, las etapas de la formación del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K se realizan en condiciones esencialmente fisiológicas. El estado físico de las proteínas dentro de las células se describe en Petty, 1998 (Howard R. Petty, capítulo 1, unidad 1.5 en: Juan S. Bonifacino, Mary Dasso, Joe B. Harford, Jennifer Lippincott-Schwartz, y 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 remisión en línea: mayo de 2001. Fecha de publicación impresa : octubre de 1998).

La puesta en contacto en condiciones esencialmente fisiológicas tiene la ventaja de que las interacciones entre el ligando, la preparación celular (es decir, la cinasa que va a caracterizarse) y opcionalmente el compuesto reflejan tanto como sea posible las condiciones naturales. “Condiciones esencialmente fisiológicas” son, entre otras, las condiciones que están presentes en el material de muestra no procesado, original. Incluyen la concentración de proteínas fisiológica, el pH, la concentración de sal, la capacidad de tamponamiento y las modificaciones postraduccionales de las proteínas implicadas. La expresión “condiciones esencialmente fisiológicas” no requiere condiciones idénticas a aquéllas en el organismo vivo original, del cual se deriva la muestra, sino condiciones esencialmente de tipo celular o condiciones cercanas a las condiciones celulares. El experto en la técnica se dará cuenta, por supuesto, de que ciertas restricciones pueden surgir debido al sistema experimental que conducirá finalmente a condiciones de tipo menos celular. Por ejemplo, la rotura finalmente necesaria de las paredes celulares o las membranas celulares cuando se toma y se procesa una muestra de un organismo vivo puede requerir condiciones que no son idénticas a las condiciones fisiológicas encontradas en el organismo. Variaciones adecuadas de condiciones fisiológicas para poner en práctica los métodos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica y están abarcadas por la expresión “condiciones esencialmente fisiológicas” tal como se usa en el presente documento. En resumen, debe entenderse que la expresión “condiciones esencialmente fisiológicas” se refiere a condiciones cercanas a las condiciones fisiológicas, como por ejemplo las encontradas en células naturales, pero no necesariamente requiere que estas condiciones sean idénticas.

Por ejemplo, “condiciones esencialmente fisiológicas” pueden comprender NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-37°C y catión divalente 0,001-10 mM (por ejemplo Mg⁺⁺, Ca⁺⁺); más preferiblemente de manera aproximada NaCl o KCl 150 mM, pH 7,2 a 7,6, catión divalente 5 mM y a menudo incluyen proteína no específica al 0,01-1,0 por ciento (por ejemplo BSA). A menudo puede estar presente un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton-X100), habitualmente a aproximadamente del 0,001 al 2%, normalmente el 0,05-0,2% (volumen/volumen). Para directrices generales, pueden ser aplicables las siguientes condiciones acuosas tamponadas: NaCl 10-250 mM, Tris HCl 5-50 mM, pH 5-8, con adición opcional de catión/cationes divalente(s) y/o quelantes de metales y/o detergentes no iónicos.

Preferiblemente, “condiciones esencialmente fisiológicas” significan un pH de desde 6,5 hasta 7,5, preferiblemente

desde 7,0 hasta 7,5, y/o una concentración de tampón de desde 10 hasta 50 mM, preferiblemente desde 25 hasta 50 mM, y/o una concentración de sales monovalentes (por ejemplo Na o K) de desde 120 hasta 170 mM, preferiblemente 150 mM. Las sales divalentes (por ejemplo Mg o Ca) pueden estar presentes además a una concentración de desde 1 hasta 5 mM, preferiblemente de 1 a 2 mM, en las que más preferiblemente el tampón se selecciona del grupo que consiste en Tris-HCl o HEPES.

En el contexto de la presente invención, 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma está inmovilizada sobre un soporte sólido. A lo largo de toda la invención, la expresión "soporte sólido" se refiere a todo soporte no disuelto que pueda inmovilizar un ligando de molécula pequeña sobre su superficie.

Según una realización preferida adicional, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de sefrosa (por ejemplo sefrosa activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas.

La 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma puede estar acoplada al soporte sólido de manera o bien covalente o bien no covalente. La unión no covalente incluye unión mediante ligandos de afinidad de biotina que se unen a matrices de esteptavidina.

Preferiblemente, la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o sal de la misma está covalentemente acoplada al soporte sólido.

Antes del acoplamiento, las matrices pueden obtener grupos activos tales como NHS, carbodimida etc. para permitir la reacción de acoplamiento con el ligando 1 de feniltiazol. La 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma puede acoplarse al soporte sólido mediante acoplamiento directo (por ejemplo usando grupos funcionales tales como grupos amino, sulfhidrilo, carboxilo, hidroxilo, aldehído y cetona) y mediante acoplamiento indirecto (por ejemplo mediante biotina, estando la biotina covalentemente unida a 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma y unión no covalente de la biotina a estreptavidina que está unida al soporte sólido directamente).

La unión al material de soporte sólido puede implicar conectores escindibles o no escindibles. La escisión puede lograrse mediante tratamiento o escisión enzimática con métodos químicos adecuados.

Las superficies de contacto de unión preferidas para la unión de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma al material de soporte sólido son conectores con una estructura principal de átomos de C. Normalmente los conectores tienen una estructura principal de 8, 9 ó 10 átomos. Los conectores contienen o bien un grupo carboxilo o bien amino activo.

El experto apreciará que entre las etapas individuales de los métodos de la invención, pueden ser necesarias etapas de lavado. Tal lavado es parte del conocimiento del experto en la técnica. El lavado sirve para eliminar componentes no unidos del lisado celular del soporte sólido. Pueden minimizarse las interacciones de unión no específicas (por ejemplo iónicas sencillas) añadiendo niveles bajos de detergente o mediante ajustes moderados a las concentraciones de sal en el tampón de lavado.

Según los métodos de identificación de la invención, el sistema de lectura es o bien la detección o bien la determinación de PI3K (primer aspecto de la invención), la detección del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K (segundo aspecto de la invención) o la determinación de la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K (segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención).

A lo largo de toda la invención, pueden usarse los mismos sistemas de lectura usados para la determinación o detección de PI3K, la detección del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida-PI3K o la determinación de la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K para la detección de ATM, ATR, DNAPK o mTOR o la detección o la determinación de la cantidad de un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y dichas proteínas. Esto implica que en casos en los que se usa un agente específico para PI3K (por ejemplo un anticuerpo), tiene que usarse un agente específico para ATM, ATR, DNAPK o mTOR en su lugar. Por consiguiente, las realizaciones y explicaciones facilitadas a continuación también se aplican a la detección de ATM, ATR, DNAPK o mTOR o a la detección del complejo o a la determinación de la cantidad de un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y dichas proteínas.

En el método según el primer aspecto de la invención, la detección o determinación de PI3K separada es preferiblemente indicativa del hecho de que el compuesto puede separar PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada o una sal de la misma. Esta capacidad indica que el compuesto respectivo interacciona, preferiblemente se une a PI3K, lo que es indicativo de su potencial terapéutico.

En una realización del método según el segundo aspecto, se detecta el complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado durante el método de la invención. El hecho de que tal complejo se forme indica preferiblemente que el compuesto no inhibe completamente la formación del complejo. Por otro lado, si no se forma complejo, el compuesto es presumiblemente un interactor fuerte con PI3K, lo que es indicativo de su potencial terapéutico.

Según los métodos del segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención, se determina la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado durante el método. En general, cuanto menos complejo se forme en presencia del compuesto respectivo, más fuerte interacciona el compuesto respectivo con PI3K, lo que es indicativo de su potencial terapéutico.

La detección del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K según el segundo aspecto de la invención puede realizarse usando anticuerpos marcados dirigidos contra PI3K y un sistema de lectura adecuado.

Según una realización preferida del segundo aspecto de la invención, se detecta el complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K determinando su cantidad.

En el transcurso del segundo, tercero y cuarto aspecto de la invención, se prefiere que PI3K se separe de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada con el fin de determinar la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K.

Según la invención, separar significa toda acción que destruya las interacciones entre 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y PI3K. Esto incluye en una realización preferida la elución de PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada.

La elución puede lograrse usando reactivos no específicos tal como se describe en detalle a continuación (fuerza iónica, valor de pH, detergentes). Además, puede someterse a prueba si un compuesto de interés puede eluir específicamente la PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida. Tales compuestos de interacción con PI3K se describen adicionalmente en las siguientes secciones.

Tales métodos no específicos para destruir la interacción se conocen principalmente en la técnica y dependen de la naturaleza de la interacción ligando-enzima. Principalmente, el cambio de fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura o la incubación con detergentes son métodos adecuados para disociar las enzimas diana del ligando inmovilizado. La aplicación de un tampón de elución puede disociar parejas de unión por los extremos del valor de pH (pH alto o bajo; por ejemplo disminuyendo el pH usando citrato 0,1 M, pH 2-3), cambio de fuerza iónica (por ejemplo alta concentración de sal usando NaI, KI, MgCl₂ o KCl), agentes reductores de polaridad que rompen las interacciones hidrófobas (por ejemplo dioxano o etilenglicol), o agentes desnaturizantes (sales caotrópicas o detergentes tales como dodecilsulfato de sodio, SDS; revisión: Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography).

En algunos casos, el soporte sólido tiene que separarse preferiblemente del material liberado. Los métodos individuales para esto dependen de la naturaleza del soporte sólido y se conocen en la técnica. Si el material de soporte está contenido dentro de una columna el material liberado puede recogerse como parte no retenida de la columna. En caso de que el material de soporte se mezcle con los componentes del lisado (denominado procedimiento discontinuo) una etapa de separación adicional tal como centrifugación suave puede ser necesaria y el material liberado se recoge como sobrenadante. Alternativamente, pueden usarse perlas magnéticas como soporte sólido de modo que las perlas pueden eliminarse de la muestra usando un dispositivo magnético.

En la etapa d) del método según el primer aspecto de la invención, se determina si se ha separado la PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada. Esto puede incluir la detección de PI3K o la determinación de la cantidad de PI3K.

Por consiguiente, al menos en realizaciones preferidas de todos los métodos de identificación de la invención, se

usan métodos para la detección de PI3K separada o para la determinación de su cantidad. Tales métodos se conocen en la técnica e incluyen métodos físicoquímicos tales como secuenciación de proteínas (por ejemplo degradación de Edmann), análisis mediante métodos de espectrometría de masas o métodos de inmunodetección empleando anticuerpos dirigidos contra PI3K.

5 A lo largo de toda la invención, si un anticuerpo se usa con el fin de detectar PI3K o con el fin de determinar su cantidad (por ejemplo mediante ELISA), el experto entenderá que, si una isoforma específica de PI3K va a detectarse o si la cantidad de una isoforma específica de PI3K va a determinarse, puede usarse un anticuerpo específico de isoforma. Tal como se indicó anteriormente, tales anticuerpos se conocen en la técnica. Además, el experto es consciente de los métodos para la producción de los mismos.

10 Preferiblemente, se detectan PI3K, ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR o se determina la cantidad de dichas proteínas mediante métodos de inmunodetección o espectrometría de masas. En lo siguiente, esto se explicará en más detalle en referencia a PI3K, pero las realizaciones y la explicación descritas a continuación también se aplican a ATM, ATR, DNAPK o mTOR.

15 La identificación de proteínas con análisis espectrométrico de masas (espectrometría de masas) se conoce en la técnica (Shevchenko *et al.*, 1996, *Analytical Chemistry* 68: 850-858; Mann *et al.*, 2001, *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*, *Annual Review of Biochemistry* 70, 437-473) y se ilustra además en la sección de ejemplos.

20 Preferiblemente, el análisis de espectrometría de masas se realiza de una manera cuantitativa, por ejemplo usando tecnología iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación absoluta y relativa) o cICAT (etiquetas de afinidad codificadas con isótopos escindibles) (Wu *et al.*, 2006. *J. Proteome Res.* 5, 651-658).

25 Según una realización preferida adicional de la presente invención, la caracterización mediante espectrometría de masas (EM) se realiza mediante la identificación de péptidos proteotípicos de PI3K. La idea es que PI3K se digiere con proteasas y los péptidos resultantes se determinan mediante EM. Como resultado, las frecuencias de péptidos para péptidos de la misma fuente de proteína difieren en gran medida, denominándose los péptidos observados lo más frecuentemente que “normalmente” contribuyen a la identificación de esta proteína “péptido proteotípico”. Por tanto, un péptido proteotípico tal como se usa en la presente invención es un péptido que puede observarse bien experimentalmente que identifica de manera única a una isoforma de proteína o proteína específica.

30 Según una realización preferida, la caracterización se realiza comparando los péptidos proteotípicos obtenidos en el transcurso de la puesta en práctica de los métodos de la invención con péptidos proteotípicos conocidos. Puesto que, cuando se usan fragmentos preparados mediante digestión con proteasas para la identificación de una proteína en EM, habitualmente se observan los mismos péptidos proteotípicos 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 de ese modo identificar la enzima que está presente en la muestra.

35 Como alternativa al análisis de espectrometría de masas, puede detectarse PI3K eluída (incluyendo proteínas de armazón o parejas de unión conjuntamente eluídas) o puede determinarse su cantidad usando un anticuerpo específico dirigido contra PI3K (o contra una isoforma de PI3K, véase anteriormente).

Además, en otra realización preferida, una vez que se ha establecido la identidad de la pareja de unión conjuntamente eluída mediante análisis de espectrometría de masas, cada pareja de unión puede detectarse con anticuerpos específicos dirigidos contra esta proteína.

40 Los ensayos basados en anticuerpos adecuados incluyen pero sin limitarse a inmunotransferencias de tipo Western, ensayos de ELISA, ensayos de ELISA de tipo “sándwich” y alineamientos de anticuerpos o una combinación de los mismos. El establecimiento de tales ensayos se conoce en la técnica (capítulo 11, *Immunology*, páginas 11-1 a 11-30 en: *Short Protocols in Molecular Biology*. Cuarta edición, editado por F.M. Ausubel *et al.*, Wiley, Nueva York, 1999).

45 Estos ensayos no sólo pueden configurarse de una manera para detectar y cuantificar una proteína de interés de interacción con PI3K (por ejemplo una subunidad reguladora o catalítica de un complejo de PI3K), sino también para analizar patrones de modificación postraduccional tales como modificación por ubiquitina o fosforilación.

Además, los métodos de identificación de la invención implican el uso de compuestos que se someten a prueba para determinar su capacidad para ser un compuesto de interacción con PI3K.

50 Principalmente, según la presente invención, un compuesto de este tipo puede ser toda molécula que pueda interaccionar con PI3K, por ejemplo, inhibiendo su unión a 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma. Preferiblemente, el compuesto tiene un

efecto sobre PI3K, por ejemplo un efecto inhibitor o estimulador.

Preferiblemente, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en compuestos químicos que se producen de manera natural o sintéticos o fármacos sintéticos orgánicos, más preferiblemente moléculas pequeñas, fármacos orgánicos o compuestos de molécula pequeña naturales. Preferiblemente, dicho compuesto se identifica partiendo de una biblioteca que contiene tales compuestos. Luego, en el transcurso de la presente invención, se examina una biblioteca de este tipo.

Tales moléculas pequeñas no son preferiblemente proteínas o ácidos nucleicos. Preferiblemente, las moléculas pequeñas presentan un peso molecular de menos de 1.000 Da, más preferido de menos de 750 Da, lo más preferido de menos de 500 Da.

Una "biblioteca" según la presente invención se refiere a una colección (en su mayoría grande) de (numerosas) entidades químicas diferentes que se proporcionan de una manera clasificada que permite tanto un análisis funcional rápido (examen) de las entidades individuales diferentes, como al mismo tiempo proporciona una rápida identificación de las entidades individuales que forman la biblioteca. Ejemplos son colecciones de tubos o pocillos o puntos sobre superficies que contienen compuestos químicos que pueden añadirse en reacciones con una o más parejas de interacción potencial definidas de una manera de alto rendimiento. Tras la identificación de una interacción "positiva" deseada de ambas parejas, el compuesto respectivo puede identificarse rápidamente debido a la construcción de la biblioteca. Las bibliotecas de orígenes natural y sintético o bien pueden adquirirse o bien diseñarse por el experto en la técnica.

Se proporcionan ejemplos de la construcción de bibliotecas en, por ejemplo, Breinbauer R, Manger M, Scheck M, Waldmann H. Natural product guided compound library development. *Curr Med Chem*. Diciembre de 2002; 9(23):2129-45, en el que se describen productos naturales que son puntos de partida biológicamente validados para el diseño de bibliotecas combinatorias, puesto que tienen un registro comprobado de relevancia biológica. Este papel especial de productos naturales en la biología química y química médica puede interpretarse a la luz de nuevos hallazgos sobre la arquitectura de dominios de las proteínas obtenidos mediante la biología estructural y la bioinformática. Con el fin de cumplir los requisitos específicos del bolsillo de unión individual dentro de una familia de dominios, puede ser necesario optimizar la estructura de los productos naturales mediante variación química. Se dice que la química de fase sólida se convertirá en una herramienta eficaz para este proceso de optimización, y se destacan los últimos avances 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*. Mayo de 2002;5(3):391-9. Review; Goodnow RA Jr. Current practices in generation of small molecule new leads. *J Cell Biochem Suppl*. 2001; supl. 37:13-21; que describen que los procesos de descubrimiento de fármacos actuales en muchas compañías farmacéuticas requieren colecciones grandes y crecientes de estructuras líder de alta calidad para su uso en ensayos de selección de alto rendimiento. En el pasado, se han adquirido colecciones de moléculas pequeñas con estructuras diversas y propiedades "similares a fármaco" por varios medios: mediante el archivo de esfuerzos de optimización de líderes internos previos, mediante la adquisición de proveedores de compuestos y mediante la unión de colecciones separadas tras fusiones de compañías. Aunque se describe a la química de alto rendimiento/combinatoria como un componente importante en el proceso de generación de nuevos líderes, la selección de diseños de bibliotecas para la síntesis y el posterior diseño de los miembros de biblioteca ha evolucionado a un nuevo nivel de desafío e importancia. Los posibles beneficios de la selección de diseños de bibliotecas de compuestos de molécula pequeña múltiples contra dianas biológicas múltiples ofrece una oportunidad sustancial para descubrir nuevas estructuras líder.

En una realización preferida del segundo y tercer aspecto, la preparación de proteínas que contiene PI3K se incuba en primer lugar con el compuesto y luego con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada. Sin embargo, se prefiere de igual manera la incubación simultánea del compuesto y la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada (incubación conjunta) con la preparación de proteínas que contiene PI3K (ensayo de unión competitiva).

En el caso de que la incubación con el compuesto sea primero, se incuba en primer lugar preferiblemente la PI3K con el compuesto durante de 10 a 60 minutos, más preferido de 30 a 45 minutos a una temperatura de 4°C a 37°C, más preferido de 4°C a 25°C, lo más preferido 4°C. Preferiblemente se usan compuestos a concentraciones que oscilan entre 1 µM y 1 mM, preferiblemente entre 10 y 100 µM. La segunda etapa, la puesta en contacto con el ligando inmovilizado, se realiza preferiblemente durante de 10 a 60 minutos a 4°C.

En el caso de la incubación simultánea, se incuba preferiblemente la PI3K de manera simultánea con el compuesto y 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida durante de 30 a 120 minutos, más preferido de 60 a 120 minutos a una temperatura de 4°C a 37°C, más preferido de 4°C a 25°C, lo más preferido 4°C. Preferiblemente se usan compuestos a concentraciones que oscilan entre 1 µM y

1 mM, preferiblemente entre 10 y 100 μ M.

Además, las etapas a) a c) del segundo aspecto de la invención pueden realizarse con varias preparaciones de proteínas con el fin de someter a prueba diferentes compuestos. Esta realización es especialmente interesante en el contexto de selecciones de medio y alto rendimiento (véase a continuación).

- 5 En una realización preferida del método de la invención según el tercer o cuarto aspecto, la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en la etapa c) se compara con la cantidad formada en la etapa b).

10 En una realización preferida del método de la invención según el tercer o cuarto aspecto, una cantidad reducida del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[3-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en la etapa c) en comparación con la etapa b) indica que PI3K es una diana 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 la unión de PI3K. Si está presente menos PI3K 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 tanto, una diana directa de la proteína y viceversa.

- 15 Preferiblemente, los métodos de identificación de la invención se realizan como una selección de medio o alto rendimiento.

20 El compuesto de interacción identificado según la presente invención puede caracterizarse adicionalmente determinando si tiene un efecto sobre PI3K, por ejemplo sobre su actividad cinasa (Carpenter *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265, 19704-19711). Tales ensayos se conocen en la técnica, también en un formato que permite la selección de medio a alto rendimiento (Fuchikami *et al.*, 2002, J. Biomol. Screening 7, 441-450).

Además, el compuesto de interacción identificado según la presente invención puede caracterizarse adicionalmente determinando si tiene un efecto sobre ATM, ATR, DNAPK o mTOR, por ejemplo sobre sus actividades cinasas (Knight *et al.*, 2004, Bioorganic and Medicinal Chemistry 12, 4749-4759; Knight *et al.*, 2006, Cell 125, 733-747).

- 25 En resumen, la actividad lípido cinasa de PI3K puede medirse usando ensayos basados en disoluciones con vesículas de fosfolípidos. La reacción se finaliza mediante la adición de disolventes orgánicos acidificados y la posterior separación de fases mediante extracción o análisis de cromatografía en capa fina (Carpenter *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265, 19704-19711).

30 Alternativamente, puede usarse un formato de ensayo de polarización de fluorescencia. En resumen, se incuba PI3K con un sustrato de fosfoinositol adecuado. Tras completarse la reacción, se mezclan los productos de reacción con una proteína detectora de fosfoinositol específica y una sonda de fosfoinositol fluorescente. Los valores de polarización (mP) disminuyen a medida que se desplaza la unión de la sonda a la proteína detectora de fosfoinositol por el producto de reacción. El grado de polarización de la sonda fluorescente es inversamente proporcional a la cantidad del producto de la reacción de PI3K (Drees *et al.*, 2003, Comb. Chem. High Throughput Screening 6, 321-330).

- 35 Para la determinación de la actividad proteína cinasa de PI3K, puede usarse un ensayo de polarización de fluorescencia con un sustrato peptídico adecuado. En resumen, puede incubarse un sustrato peptídico marcado con fluoresceína con PI3K (por ejemplo PI3K delta), ATP y un anticuerpo anti-fosfoserina. A medida que la reacción avanza, el péptido fosforilado se une al anticuerpo anti-fosfoserina, dando como resultado un aumento en la señal de polarización. Compuestos que inhiben la cinasa dan como resultado una señal de polarización baja.

40 Los compuestos identificados según la presente invención pueden optimizarse adicionalmente (optimización líder). Esta optimización posterior de tales compuestos a menudo se acelera debido a la información de relación estructura-actividad (SAR) codificada en estas bibliotecas de generación de líderes. La optimización líder a menudo se facilita debido a la fácil aplicabilidad de los métodos de química de alto rendimiento (HTC) para la síntesis de seguimiento.

- 45 Un ejemplo de una biblioteca de este tipo y optimización líder se describe para PI3K gamma (Pomel *et al.*, 2006, J. Med. Chem. 49, 3857-3871).

50 Los métodos de la invención comprenden una etapa del método en la que se determina si el compuesto puede separar también ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR de la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada (primer aspecto) o si se ha formado también un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR. Tal como se indicó anteriormente, estas etapas pueden realizarse esencialmente tal como se describió anteriormente para PI3K, en las que se usan agentes, por ejemplo anticuerpos específicos para la cinasa dada cuando se requiere.

La lógica detrás de estas etapas del método es que es posible determinar la especificidad del compuesto de interacción con PI3K identificado. Se prefiere, en el contexto de la presente invención, identificar compuestos de interacción con PI3K que son específicos para PI3K, es decir, que se unen en un menor grado a ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR, o, incluso más preferido, no se unen a una o todas estas proteínas.

5 La invención da a conocer además un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende las etapas de

a) identificar un compuesto de interacción con PI3K tal como se describió anteriormente, y

b) formular el compuesto de interacción para una composición farmacéutica.

10 Por tanto, la invención proporciona un método para la preparación de composiciones farmacéuticas, que pueden administrarse a un sujeto en una cantidad eficaz. En un aspecto preferido, el producto terapéutico se purifica sustancialmente. El sujeto que va a tratarse es preferiblemente un animal incluyendo, pero sin limitarse a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente un ser humano. En una realización específica, un mamífero no humano es el sujeto.

15 Los compuestos identificados según la invención son útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades en las que PI3K desempeña un papel tales como cáncer (por ejemplo cáncer de mama, de colon o de ovarios), trastornos metabólicos (por ejemplo diabetes u obesidad) o trastornos autoinmunitarios/inflamatorios (por ejemplo artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, asma o reacciones alérgicas).

20 Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de un compuesto identificado mediante los métodos de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente. Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto.

25 En general, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto terapéutico, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, incluyendo pero sin limitarse a aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El
30 agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. Solución salina y dextrosa acuosa son portadores preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se emplean preferiblemente soluciones salinas y dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol como portadores líquidos para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se
35 desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes emulsionantes o humectantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del producto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para administración apropiada al paciente.
45 La formulación debe adecuarse al modo de administración.

En una realización preferida, se formula la composición, según procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la
50 composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un concentrado libre de agua o polvo liofilizado seco en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene solución salina o agua de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra
55 mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de solución salina o agua estéril para inyección de modo que los componentes pueden mezclarse antes de la administración.

Los productos terapéuticos de la invención pueden formularse como formas de sal o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc., y las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férrico, etc.

La cantidad del producto terapéutico de la invención que será eficaz en el tratamiento de un estado o trastorno particular dependerá de la naturaleza del estado o trastorno, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse también ensayos *in vitro* opcionalmente para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y debe decidirse según el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba en modelos animales o *in vitro*. En general, los supositorios pueden contener el principio activo en el intervalo del 0,5% al 10% en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente del 10% al 95% de principio activo.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un producto terapéutico de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas; uso de células recombinantes que pueden expresar el producto terapéutico, uso de endocitosis mediada por receptor (por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432); construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de introducción incluyen pero sin limitarse a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión, mediante inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos mucocutáneo o epitelial (por ejemplo, mucosa intestinal, rectal y oral, etc.), y pueden administrarse 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 mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intratecal e intraventricular; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención de manera local a la zona que necesita tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, conjuntamente con un apósito para heridas tras la cirugía, mediante 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, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o antiguo sitio) de un tumor maligno o tejido neoplásico o preneoplásico.

En otra realización, el producto terapéutico puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249:1527-1533).

Aún en otra realización, el producto terapéutico puede administrarse mediante un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (Langer, citado anteriormente). Aún en otra realización, puede colocarse un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que el ligando 1 de feniltiazol es un ligando para ATM, ATR, DNAPK y mTOR. Por tanto, la presente invención también se refiere a métodos para la identificación de compuestos de interacción con ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR. Estos métodos se realizan tal como se describió anteriormente en el contexto de la identificación de compuestos de interacción con PI3K. Además, se prevé dentro de la presente invención que estos métodos para la identificación de compuestos de interacción con ATM, ATR, DNAPK o mTOR puedan contener o no la etapa de determinar si un compuesto dado puede interaccionar también con otras PIKK cinasas tal como se define en la presente invención.

La invención se refiere además a un método para la purificación de ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR, que comprende las etapas de

a) proporcionar una preparación de proteínas que contiene una o más de dichas proteínas,

b) poner en contacto la preparación de proteínas con 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-

metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - proteína, y

- 5 c) separar la proteína de la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada.

Tal como se mencionó anteriormente, se ha encontrado sorprendentemente que el ligando 1 de feniltiazol es un ligando que reconoce estas proteínas. Esto permite métodos de purificación eficaces para estas proteínas.

Las realizaciones tal como se definieron anteriormente para la métodos de identificación de la invención también se aplican al método de purificación de la invención.

- 10 Preferiblemente, dicha purificación se realiza usando un anticuerpo específico de isoforma tal como se explicó anteriormente.

- 15 En una realización preferida, el método de purificación de la invención comprende además tras la etapa c) la identificación de proteínas que pueden unirse a ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR. Esto es especialmente interesante cuando se realiza la formación del complejo en condiciones esencialmente fisiológicas, debido a que entonces es posible conservar el estado natural de la enzima que incluye la existencia de parejas de unión, subunidades enzimáticas o modificaciones postraduccionales, que entonces pueden identificarse con la ayuda de espectrometría de masas (EM).

- 20 Por consiguiente, en una realización preferida, el método de purificación de la invención comprende además tras la etapa c) la determinación de si la proteína dada está modificada además postraduccionamente, por ejemplo mediante modificación por ubiquitina.

La invención se refiere además al uso de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma para la identificación de compuestos de interacción con ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR y para la purificación de PI3K. Las realizaciones tal como se definieron anteriormente también se aplican a los usos de la invención.

- 25 También se da a conocer que no sólo 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o una sal de la misma, sino que además también otro ligando, concretamente el ligando de fenilmorfolin-cromeno (8-(4-aminometil-fenil)-2-morfolin-4-il-cromen-4-ona) tal como se muestra en la figura 16, o derivados del mismo, por ejemplo compuestos que comprenden el núcleo idéntico pero que tienen otro conector, preferiblemente acoplado al nitrógeno que no es parte de las estructuras cíclicas, para su unión al soporte sólido, puede usarse para la identificación de los compuestos de interacción. Por consiguiente, ambos ligandos se inmovilizan. En este contexto, se incluye que, en el caso de que se usen perlas, ambos ligandos se inmovilizan sobre la misma perla o que un ligando se inmoviliza sobre una perla y el otro ligando se inmoviliza sobre la otra perla. En este contexto, normalmente los conectores tienen una estructura principal de 8, 9 o 10 átomos. Los conectores pueden contener un grupo activo o bien amino, hidroxilo o bien carboxilo.

- 35 La invención se ilustra además mediante las siguientes figuras y ejemplos, que no se consideran limitativos para el alcance de protección conferido por las reivindicaciones de la presente solicitud.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Síntesis y estructura del ligando 1 de feniltiazol.

El ligando 1 de feniltiazol se sintetizó tal como se describe en el ejemplo 1.

- 40 Figura 2: Experimento de precipitación ("pull-down") de fármacos con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado y detección por inmunotransferencia de tipo Western de proteínas de PI3K.

- 45 Como material biológico, se usó un lisado celular preparado a partir de células MOLT-4. El experimento de precipitación de fármacos se realizó tal como se describe en el ejemplo 2 con muestras de lisados que contienen 50 mg de proteína. Se eluyeron las proteínas capturadas con tampón que contiene DMSO (carril 1), 100 µM de ligando 1 de feniltiazol libre o tampón de muestra de SDS (carril 3). Las muestras eluidas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membranas. Las inmunotransferencias se incubaron en primer lugar con anticuerpos específicos dirigidos contra PI3K gamma (figura 2A) y PI3K delta (figura 2B). Para la detección secundaria, se usaron anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes para la detección con el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey. Carril 1: control elución de DMSO; carril 2: elución con ligando 1 de

feniltiazol libre 100 μM ; carril 3: elución de SDS.

Figura 3: Experimento de precipitación de fármacos con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado para análisis de espectrometría de masas de proteínas.

5 Se muestra un gel de proteína tras la tinción con azul de Coomassie. Las zonas del gel indicadas se cortaron como rodajas de gel y se sometieron las proteínas a análisis mediante espectrometría de masas.

El experimento de precipitación de fármacos se realizó tal como se describe en el ejemplo 2 con una muestra de lisado de células MOLT-4 que contiene 50 mg de proteína. Se eluyeron las proteínas unidas al ligando 1 de feniltiazol inmovilizado con tampón de muestra de SDS y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

10 Figura 4: Péptidos identificados de PI3K gamma.

Los péptidos que se identificaron mediante análisis de espectrometría de masas de la secuencia PI3K delta humana se muestran en negrita y subrayado.

Figura 5: Péptidos identificados de PI3K delta.

15 Los péptidos que se identificaron mediante análisis de espectrometría de masas de la secuencia de PI3K gamma humana se muestran en negrita y subrayado.

Figura 6: Ensayo de elución para la identificación de compuestos de interacción con PI3K gamma.

20 Se realizó el experimento tal como se describe en el ejemplo 3. Se capturó la proteína PI3K gamma mediante el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado a partir de lisado de células MOLT-4 y se eluyó mediante los compuestos tal como se indicó. Los eluatos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se detectó la PI3K gamma con el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey. Primer anticuerpo: anti-PI3K gamma (Jena Bioscience ABD-026S; anticuerpo de ratón). Segundo anticuerpo: anti-ratón IRDye800 (Rockland, 610-732-124). Se muestra la intensidad integrada (kilopíxel integrado/ mm^2).

Compuestos usados para la elución:

25 Compuesto 1 (LY294002); $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$; compuesto 2 (AS-605240): $\text{CI}_{50}=26 \text{ nM}$; compuesto 3 (AS-604850); $\text{CI}_{50}=1,7 \mu\text{M}$,

Figura 7: Ensayo de unión competitiva para la identificación de compuestos de interacción con PI3K gamma.

30 El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 4. Se añadieron compuestos de prueba a las concentraciones indicadas y la matriz de afinidad a lisado de células MOLT-4 y se capturó la proteína PI3K gamma que no interaccionaba con los compuestos de prueba mediante el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado sobre la matriz de afinidad. Se separó la matriz de afinidad del lisado, se eluyeron las proteínas unidas con tampón de muestra de SDS y se transfirieron los eluatos a una membrana de nitrocelulosa. Se determinó la cantidad de PI3K gamma con el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey.

35 7A: Transferencias puntuales estudiadas con sonda con anticuerpos y señales detectadas con el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey. Primer anticuerpo: anti-PI3K gamma (Jena Bioscience ABD-026S; anticuerpo de ratón). Segundo anticuerpo: anti-ratón IRDye800 (Rockland, 610-732-124).

7B: Curvas de unión de competición. Se representan gráficamente las unidades Odyssey relativas (intensidad integrada; kilopíxel integrado/ mm^2) frente a las concentraciones de compuesto y se calculan los valores de competición a la mitad de la unión máxima (CI). Compuesto 1 (LY294002): $\text{CI}_{50} > 30 \mu\text{M}$; compuesto 2 (AS-605240): $\text{CI}_{50} = 4,6 \mu\text{M}$; compuesto 3 (AS-604850): $\text{CI}_{50} = 176 \text{ nM}$.

40 Figura 8: Obtención del perfil de compuestos añadiendo compuestos a lisados celulares (ensayo de lisado) o incubando el compuesto con células RAW264.7 vivas (ensayo de células).

El experimento se realizó tal como se describe en el ejemplo 5. Se usaron compuestos a una concentración de 10 μM en ambos ensayos y se cuantificó la cantidad de PI3Kdelta con el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey.

45 Figura 9: Obtención del perfil de selectividad de inhibidores de PI3K usando cuantificación por espectrometría de

masas. Se realizó el experimento como un ensayo de unión de competición de Kinobeads en lisados de células Ramos tal como se describe en el ejemplo 6. Basándose en la obtención de perfil por espectrometría de masas cuantitativa, se muestran los valores de CI_{50} (μM) para dianas individuales.

A: Compuesto CZC00015097

5 B: Compuesto CZC00018052

C: Compuesto CZC00019091

Figura 10: Curvas de dosis-respuesta del compuesto CZC18052.

10 El compuesto se sometió a prueba en el ensayo de unión de competición con inmunodetección multiplexada de cinasas tal como se describe en el ejemplo 7. En un único ensayo, se midió la afinidad de unión del compuesto para PI3K alfa, PI3K beta, PI3K gamma, PI3K delta y DNAPK. En resumen, se incubó una mezcla 1:1 de lisados de células Molt-4 y Jurkat con la matriz de afinidad (mezcla 1:1 de perlas con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado y perlas con el ligando de fenilmorfolin-cromeno) y el compuesto CZC18052. Se lavaron las perlas y se eluyeron las cinasas unidas. Se colocaron en forma de puntos alícuotas del eluato sobre cinco membranas de nitrocelulosa diferentes, cada una de las cuales se incubó con el anticuerpo diana respectivo y posteriormente un anticuerpo secundario fluorescente. Se cuantificó la señal fluorescente usando un escáner infrarrojo. El compuesto mostró unión potente para una gama de cinasas: PI3K alfa ($CI_{50} = 0,027 \mu M$), PI3K beta ($CI_{50} = 0,034 \mu M$), PI3K gamma ($CI_{50} = 0,43 \mu M$), PI3K delta ($CI_{50} = 0,14 \mu M$) y DNAPK ($CI_{50} = 0,038 \mu M$).

Figura 11: Curvas de dosis-respuesta para el compuesto CZC19950.

20 El experimento se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo 7. El compuesto mostró unión a las siguientes cinasas: PI3K alfa ($CI_{50} > 7 \mu M$), PI3K beta ($CI_{50} = 1,7 \mu M$), PI3K gamma ($CI_{50} = 0,17 \mu M$), PI3Kdelta ($CI_{50} > 3 \mu M$) y DNAPK ($CI_{50} > 6 \mu M$). El compuesto CZC19950 mostró unión potente sólo a PI3K gamma ($CI_{50} = 0,17 \mu M$).

25 Figura 12: Experimento de precipitación de fármacos con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado para análisis de espectrometría de masas de proteínas. Se muestra un gel de proteína tras la tinción con azul de Coomassie. Las zonas del gel indicadas se cortaron como rodajas de gel y las proteínas se sometieron a análisis mediante espectrometría de masas. El experimento de precipitación de fármacos se realizó tal como se describe en el ejemplo 2 con una mezcla 1:1 de muestra de lisado de células Jurkat y Ramos que contiene 50 mg de proteína. Se eluyeron las proteínas unidas al ligando 1 de feniltiazol inmovilizado con tampón de muestra de SDS y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se identificaron las siguientes proteínas en este experimento: DNA-PK, ATM, y mTOR.

30 Figura 13: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de DNA-PK tras una precipitación de fármacos con ligando 1 de feniltiazol inmovilizado. Los péptidos identificados están subrayados.

Figura 14: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de ATM tras una precipitación de fármacos con ligando 1 de feniltiazol inmovilizado.

35 Figura 15: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de mTOR tras una precipitación de fármacos con ligando 1 de feniltiazol inmovilizado.

Figura 16: Síntesis y estructura del ligando de fenilmorfolin-cromeno (8-(4-aminometil-fenil)-2-morfolin-4-il-cromen-4-ona). El ligando se sintetizó tal como se describe en el ejemplo 8. La estructura de el ligando se muestra en [G].

Figura 17: Experimento de precipitación de fármacos con el ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado para análisis de espectrometría de masas de proteínas.

40 Se muestra un gel de proteínas tras la tinción con azul de Coomassie. Las zonas del gel indicadas se cortaron como rodajas de gel y se sometieron las proteínas a análisis mediante espectrometría de masas. El experimento de precipitación de fármacos se realizó tal como se describe en el ejemplo 2 con una mezcla 1:1 de lisado de células HeLa y K-562 que contiene 50 mg de proteína. Se eluyeron las proteínas unidas al ligando de fenilmorfolin-cromeno con tampón de muestra de SDS y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

45 Figura 18: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de AT humana tras una precipitación de fármacos con el ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado a partir de una mezcla de lisado de HeLa - K562.

Figura 19: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de ATM humana tras una precipitación de

fármacos con el ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado a partir de una mezcla de HeLa - K562.

Figura 20: Péptidos identificados mediante espectrometría de masas de mTOR humana tras una precipitación de fármacos con el ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado a partir de una mezcla de HeLa - K562.

Ejemplo 1: Preparación de la matriz de afinidad

5 Este ejemplo ilustra la preparación de la matriz de afinidad para la captura por afinidad de PI3K cinasas a partir de lisados celulares. Se inmovilizó el ligante de captura covalentemente sobre un soporte sólido a través de enlace covalente usando un grupo funcional amino. Se usó esta matriz de afinidad en el ejemplo 2, el ejemplo 3 y el ejemplo 4.

10 Síntesis de un ligando 1 de feniltiazol (sal de clorhidrato de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida)

Etapas 1-3: Se preparó 1-bromo-1-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-propan-2-ona siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 2003/072557.

Etapas 4: 5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilamina

15 Se combinaron 1-bromo-1-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-propan-2-ona (480 mg 1,5 mmol) y tiourea (114 mg 1,5 mmol) en etanol (12 ml) y se calentaron hasta 70°C durante 2 horas. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se recogió el producto sólido mediante filtración y se secó a vacío produciendo 5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilamina como un sólido de color hueso (375 mg). ¹H RMN (400MHz DMSO-d₆) δ 9,4 (s a, 2H), 8,0 (d, 1H), 7,9 (d, 1H), 7,8 (dd, 1M), 3,4 (s, 3H), 2,3 (s, 3H).

20 Etapa 5: Se combinaron ácido 3-(2-{2-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propiónico del éster terc-butílico del ácido (2-{2-[2-(2-{5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-carbámico (690 mg 1,9 mmol), EDAC (403 mg 2,1 mmol), HOBt (284 mg 2,1 mmol), NMM (420 µl 3,8 mmol) y 5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilamina (520 mg 1,7 mmol) en dimetilformamida (16 ml) y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se disolvió el residuo en diclorometano (150 ml), se lavó con disolución acuosa de HCl 1 M (50 ml) e hidrogenocarbonato de sodio acuoso saturado (50 ml), se secó (sulfato de magnesio), se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida usando un cartucho ultrarrápido de sílice IST de 50 g eluyendo con diclorometano/metanol al 0-2% produciendo éster terc-butílico del ácido (2-{2-[2-(2-{5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-carbámico como un aceite (1,1 g de disolvente residual presente) ¹H RMN (400MHz CDCl₃) 10,3 (s a, 1H), 8,2 (s, 1H), 7,6 (m, 2H), 7,2 (s a, 1H), 3,9 (t, 2H) 3,8-3,5 (m a, 14H), 3,3 (m a, 5H), 2,8 (t, 2H), 2,4 (s, 3H), 1,4 (s, 9H).

30 Etapa 6: Clorhidrato de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida

35 Se disolvió éster terc-butílico del ácido (2-{2-[2-(2-{5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2-ilcarbamoil]-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etil)-carbámico (1,0 g 1,5 mmol) en diclorometano (10 ml) y se trató con HCl (4 ml de disolución 4 M en dioxano). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se evaporó el disolvente y se secó el residuo a vacío produciendo clorhidrato de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida como un aceite viscoso de color amarillo (830 mg de disolvente residual presente) ¹H RMN (400MHz CDCl₃) 8,4 (s a, 3H), 8,2 (s, 1H), 7,7 (d a, 1H), 7,6 (d a, 1H) 3,9 (m a, 4H), 3,8-3,6 (m a, 12H), 3,3 (s, 3H), 3,3 (m a, 2H), 3,1 (m a, 2H), 2,6 (s, 3H). Se obtuvieron los espectros de RMN en un aparato dpx400 de Bruker.

Tabla 1: Abreviaturas usadas

a	amplio
CDCl ₃	deuterocloroformo
d	doblete
dd	doblete de dobletes

(continuación)

DMSO	Dimetilsulfóxido
EDAC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodimida
g	gramo
HCl	ácido clorhídrico
HOBT	N-hidroxibenzotriazol
m	multiplete
mg	miligramo
ml	mililitro
mmol	milimol
M	molar
MHz	megahertz
NMM	N-metilmorfolina
RMN	resonancia magnética nuclear
q	cuartete
s	singlete
t	triplete

Inmovilización del ligando 1 de feniltiazol sobre perlas (matriz de afinidad)

- 5 Se equilibró la sefarosa 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences, 17-0906-01) con DMSO anhidro (dimetilsulfóxido, Fluka, 41648, H₂O ≤ 0,005%). Se colocó 1 ml de perlas sedimentadas en un tubo Falcon de 15 ml, se añadió disolución madre de compuesto (habitualmente 100 mM en DMF o DMSO) (concentración final de 0,2-2 μmol/ml de perlas) así como 15 μl de trietilamina (Sigma, T-0886, 99% de pureza). Se incubaron las perlas a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador vertical (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 16 - 20 horas. Se determina la eficacia de acoplamiento mediante HPLC. Se bloquearon los grupos NHS que no reaccionaron mediante incubación con aminoetanol a temperatura ambiente en el agitador vertical durante la noche. Se lavaron las perlas con 10 ml de DMSO y se almacenaron en isopropanol a -20°C. Se usaron estas perlas como matriz de afinidad en el ejemplo 2, 3 y 4. Se generaron perlas control (sin ligando inmovilizado) bloqueando los grupos NHS mediante incubación con aminoetanol tal como se describió anteriormente.

15 **Ejemplo 2: Precipitación de fármacos de PI3K usando el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado**

- Este ejemplo demuestra el uso del ligando 1 de feniltiazol inmovilizado para la identificación de proteínas PI3K a partir de lisados celulares de una línea de células T humana (células MOLT4; número de la ATCC CRL-1582). Para este fin, se puso en contacto un lisado de células MOLT-4 con la matriz de afinidad descrita en el ejemplo 1. Se identificaron las proteínas que se unían al ligando 1 de feniltiazol mediante análisis de espectrometría de masas (EM) e inmunotransferencia de tipo Western. Para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western, se eluyeron las proteínas unidas de la matriz de afinidad y posteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Se detectaron PI3K gamma y PI3K delta con anticuerpos específicos (figura 2). Los resultados del análisis de inmunotransferencia de tipo Western muestran que el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado captura (precipita) PI3K gamma y PI3K delta a partir del lisado celular.

- 25 Para la identificación de proteínas mediante análisis de espectrometría de masas, se eluyeron las proteínas

capturadas por la matriz de afinidad y posteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (figura 3). Se cortaron las bandas de gel adecuadas y se sometieron a digestión proteolítica en el gel con tripsina y se analizaron mediante espectrometría de masas CL-EM/EM.

Se documenta la identificación de miembros de la familia de PI3K en la tabla 3. Se muestra la cobertura de la secuencia peptídica de PI3K gamma en la figura 4 y para PI3K delta en la figura 5.

1. Cultivo celular

Se hicieron crecer células MOLT-4 (número de la ATCC 1582) en matraces Spinner de 1 litro (Integra Biosciences, n.º 182101) en suspensión en medio RPMI 1640 (Invitrogen, n.º 21875-034) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen) a una densidad entre $0,15 \times 10^6$ y $1,2 \times 10^6$ células/ml. Se recogieron las células mediante centrifugación, se lavaron una vez con tampón 1x PBS (Invitrogen, n.º 14190-094) y se congelaron los sedimentos celulares en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C .

2. Preparación de lisados celulares

Se homogenizaron células MOLT-4 en un homogenizador Potter S en tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM, NP40 al 0,8%, glicerol al 5%, NaCl 150 mM, MgCl_2 1,5 mM, NaF 25 mM, vanadato de sodio 1 mM, 1 mM DTT, pH 7,5. Se añadió un comprimido libre de EDTA completo (cóctel inhibidor de proteasas, Roche Diagnostics, 1 873 580) por 25 ml de tampón. Se homogenizó el material 10 veces usando un POTTER S mecanizado, se transfirió a tubos Falcon de 50 ml, se incubaron durante 30 minutos sobre hielo y se centrifugaron durante 10 min. a 20.000 g a 4°C (10.000 rpm en Sorvall SLA600, preenfriado). Se transfirió el sobrenadante a un tubo de (UZ)-polycarbonato de ultracentrífuga (Beckmann, 355654) y se centrifugó durante 1 hora a 100.000 g a 4°C (33.500 rpm en Ti50.2, preenfriado). Se transfirió el sobrenadante de nuevo a un tubo Falcon de 50 ml nuevo, se determinó la concentración de proteína mediante un ensayo de Bradford (BioRad) y se prepararon muestras que contenían 50 mg de proteína por alícuota. Se usaron las muestras inmediatamente para los experimentos o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron congeladas a -80°C .

3. Experimento de precipitación de compuestos

Se equilibraron perlas de Sefarosa con compuesto inmovilizado (100 μl de perlas por experimento de precipitación) en tampón de lisis y se incubaron con una muestra de lisado celular que contenía 50 mg de proteína en un agitador vertical (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 2 horas a 4°C . Se recogieron las perlas, se transfirieron a columnas Mobicol (MoBiTech 10055) y se lavaron con 10 ml de tampón de lisis que contenía detergente NP40 al 0,5%, seguido por 5 ml de tampón de lisis con detergente al 0,25%. Para eluir la proteína unida, se añadieron 60 μl de tampón de muestra de 2x SDS, se calentó la columna durante 30 minutos a 50°C y se transfirió el eluato a un tubo de microfuga mediante centrifugación. Entonces se separaron las proteínas mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

4. Detección de proteínas mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se realizaron las inmunotransferencias de tipo Western según procedimientos convencionales y se detectaron las proteínas PI3K y se cuantificaron usando anticuerpos anti-PI3K específicos (primer anticuerpo), un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EE.UU.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en mayo de 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).

Se usó el anticuerpo de ratón anti-PI3K gamma (Jena Bioscience, número de catálogo ABD-026S) a una dilución de 1:200 y se incubó con la inmunotransferencia durante la noche a 4°C . Se usó el anticuerpo secundario anti-ratón IRDye™ 800 (Rockland, número de catálogo 610-732-124) a una dilución de 1:15.000. Se diluyó el anticuerpo de conejo anti-PI3K delta (Santa Cruz, número de catálogo sc-7176) a 1:600 y se incubó durante la noche a 4°C . Como anticuerpo de detección secundario, se diluyó el anticuerpo anti-conejo IRDye™ 800 1:20.000 (LICOR, número de catálogo 926-32211).

5. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

5.1 Digestión de proteínas previa al análisis espectrométrico de masas

Se redujeron, se alquilaron y se digirieron en el gel las proteínas separadas en gel siguiendo esencialmente el procedimiento descrito por Shevchenko *et al.*, 1996, Anal. Chem. 68:850-858. En resumen, se cortaron las proteínas separadas en gel del gel usando un bisturí limpio, se redujeron usando DTT 10 mM (en bicarbonato de amonio 5 mM, 54°C , 45 min.) y posteriormente se alquilaron con yodoacetamida 55 mM (en bicarbonato de amonio 5 mM) a

temperatura ambiente en la oscuridad (30 minutos). Se digirieron las proteínas reducidas y alquiladas en gel con tripsina porcina (Promega) a una concentración de proteasa de 12,5 ng/μl en bicarbonato de amonio 5 mM. Se dejó que la digestión se realizara durante 4 horas a 37°C y posteriormente se detuvo la reacción usando 5 μl de ácido fórmico al 5%.

5 5.2 Preparación de las muestras previa al análisis mediante espectrometría de masas

Se extrajeron tapones de gel dos veces con 20 μl de TFA al 1% y se reunieron con sobrenadantes de digestión acidificados. Se secaron las muestras en una centrifuga a vacío y se resuspendieron en 10 μl de ácido fórmico al 0,1%.

5.3. Adquisición de datos espectrométricos de masas

- 10 Se inyectaron muestras de péptidos en un sistema nano LC (CapLC, Waters o Ultimate, Dionex) que se acopló directamente a un espectrómetro de masas o bien de TOF de cuadrupolo (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, Micromass) o bien de trampa iónica (LCQ Deca XP). Se separaron los péptidos en el sistema de CL usando un gradiente de disolventes orgánicos y acuosos (véase a continuación). El disolvente A era acetonitrilo al 5% en ácido fórmico al 0,5% y disolvente B era acetonitrilo al 70% en ácido fórmico al 0,5%.

- 15 Tabla 2: Se secuenciaron parcialmente los péptidos que se eluyeron del sistema de CL dentro del espectrómetro de masas.

Tiempo (min.)	% de disolvente A	% de disolvente B
<u>0</u>	<u>95</u>	<u>5</u>
<u>5,33</u>	<u>92</u>	<u>8</u>
<u>35</u>	<u>50</u>	<u>50</u>
<u>36</u>	<u>20</u>	<u>80</u>
<u>40</u>	<u>20</u>	<u>80</u>
<u>41</u>	<u>95</u>	<u>5</u>
<u>50</u>	<u>95</u>	<u>5</u>

5.4. Identificación de proteínas

- 20 Se usaron los datos de fragmentación y masas de péptidos generados en los experimentos de CL-EM/EM para consultar bases de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas en el formato Fasta mantenidas y actualizadas regularmente en el NCBI (para el NCBI nr, dbEST y los genomas de ratón y ser humano) y European Bioinformatics Institute (EBI, para las bases de datos de proteoma del ser humano, ratón, *D. melanogaster* y *C. elegans*). Se identificaron las proteínas correlacionando los datos de fragmentación y masas de péptidos medidos con los mismos datos calculados a partir de las entradas en la base de datos usando la herramienta de software Mascot (Matrix Science; Perkins *et al.*, 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20, 3551-3567). Los criterios de búsqueda variaban dependiendo de qué espectrómetro de masas se usó para el análisis.

Tabla 3: Proteínas PI3K identificadas mediante espectrometría de masas (células MOLT-4; experimento P15234B; muestra de EM se refiere a la rodaja de gel cortada del gel de poliacrilamida (figura 3).

Muestra de EM	Número de registro de la proteína (IPI)	Nombre de la proteína	Número de péptidos identificados
4	IPI00070943.3	PIK4CA; fosfatidilinositol 4-cinasa, catalítica, polipéptido alfa	62

(continuación)

Muestra de EM	Número de registro de la proteína (IPI)	Nombre de la proteína	Número de péptidos identificados
5	PI00024006.1	PIK3R4; fosfoinosítido-3-cinasa, subunidad reguladora 4, p150	11
6	IPI00292690.1	PIK3CG; fosfoinosítido-3-cinasa, catalítica, polipéptido gamma	39
6	IPI00298410.2	PIK3CD; fosfoinosítido-3-cinasa, catalítica, polipéptido delta	26
7	IPI00298410.2	PIK3CD; fosfoinosítido-3-cinasa, catalítica, polipéptido delta	12
8	IP100002591.3	PIK4CB; fosfatidilinositol-4-cinasa, catalítica, polipéptido beta	15
9	IPI00021448.1	PIK3R1; fosfoinosítido-3-cinasa, subunidad reguladora 1 (p85 alfa)	27
9	IPI00011736.3	PIK3R2; fosfoinosítido-3-cinasa, subunidad reguladora 2 (p85 beta)	8
14	IPI00333040.3	PIK3R1; fosfoinosítido-3-cinasa, subunidad reguladora 1 (p85 alfa)	7

Ejemplo 3: Ensayo de elución para la identificación de compuestos de interacción con PI3K gamma

- Se realizó la preparación de la matriz de afinidad del ligando 1 de feniltiazol tal como se describió en el ejemplo 1. Para seleccionar 80 compuestos como máximo en una placa de 96 pocillos, se realiza el experimento de elución tal como se describe a continuación.

Ensayo de elución

- Se lavó la matriz de afinidad (1200 µl de perlas) 2x con 30 ml de tampón 1x-DP. Tras cada etapa de lavado, se recogieron las perlas mediante centrifugación durante 2 minutos a 1.200 rpm a 4°C en una centrífuga Heraeus. Se desecharon los sobrenadantes. Finalmente, se equilibraron las perlas en 15 ml tampón de unión (tampón 1x-DP/NP40 al 0,4%). Tras este tiempo de incubación, se recogieron las perlas y se mezclaron en un tubo Falcon de 50 ml con lisado de células MOLT-4 a una concentración de proteína de 5 mg/ml con una cantidad total de 75 mg de proteína. Se realizó la preparación del lisado tal como se describió en el ejemplo 2. Se incubaron las perlas y el lisado durante 2 horas a 4°C. Tras la incubación con el lisado, se recogieron las perlas mediante centrifugación tal como se describió y se transfirieron a columnas de 2 ml (MoBiTec, n.º S10129) y se lavaron con 10 ml de tampón 1x-DP/NP40 al 0,4% y 5 ml de tampón 1x-DP/NP40 al 0,2%. Una vez que el tampón de lavado había pasado a través de la columna completamente, se calculó el volumen de perlas que permanecieron en la columna (aproximadamente 1.000 µl). Se resuspendieron las perlas en exceso de 4 veces de tampón 1x-DP/NP40 al 0,2% (4 ml) para generar una suspensión al 20%. Para pruebas de elución de compuestos, se añadieron 50 µl de esta suspensión a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Millipore MultiScreenHTS, MSBVN1210, con tapa y una membrana Durapore de baja unión de proteínas hidrófila de 1,2 µm). Para eliminar el tampón residual, se ensambló la placa de 96 pocillos con un filtro Assemble y una placa de recogida y se centrifugó este conjunto intercalado durante 10 segundos a 800 rpm en una centrífuga. Entonces, se añadieron 40 µl de tampón de elución (tampón 1x-

- 5 DP-/NP40 al 0,2%) complementado con el compuesto prueba a las perlas. Se prepararon los compuestos de prueba diluyéndolos en un tampón de dilución partiendo de una disolución madre concentrada 40 veces en DMSO. Se ensambló la placa sobre la placa de recogida, se fijó sobre una incubadora Eppendorf y se incubó durante 30 minutos a 4°C a 650 rpm de agitación. Para recoger el eluato, se centrifugó la placa filtrante de 96 pocillos ensamblada sobre la placa de recogida de 96 pocillos durante 1 minuto a 800 rpm en una centrífuga de mesa a 4°C (Heraeus). Se comprobaron los eluatos para determinar la presencia de PI3K gamma y PI3K delta usando un procedimiento de transferencia puntual.

Detección de PI3K gamma eluída

- 10 Se detectó la proteína PI3K gamma eluída y se cuantificó mediante un procedimiento de transferencia puntual usando un anticuerpo dirigido contra PI3K gamma (Jena Bioscience, n.º ABD-026S), un anticuerpo secundario anti-ratón IRDye™ 800 marcado fluorescentemente (Rockland, n.º 610-732-124) y el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, USA) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en mayo de 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).
- 15 Se trataron las membranas de nitrocelulosa con etanol al 20% y posteriormente se lavaron con tampón 1x PBS. Se combinaron los eluatos (tal como se describió anteriormente) con 12 µl de tampón de carga de 4x SDS (Tris-HCl 200 mM pH 6,8, SDS al 8%, glicerol al 40%, azul de bromofenol al 0,04%) y se aplicaron a la membrana de nitrocelulosa con un aparato de transferencia puntual BioRad (BioRad, n.º170-6545).
- 20 Para la detección de PI3K gamma, se bloquearon en primer lugar las membranas mediante incubación con tampón de bloqueo Odyssey durante 1 hora. Se incubaron las membranas bloqueadas durante 16 horas a 4°C con el primer anticuerpo (anti-PI3K gamma de ratón de Jena Bioscience, ABD-026S) diluido 1:100 en tampón de bloqueo Odyssey complementado con Tween 20 al 0,2%. Tras lavar la membrana cuatro veces durante 5 minutos con tampón 1x PBS que contenía Tween 20 al 0,1%, se incubó la membrana durante 40 minutos con el anticuerpo de detección (anti-ratón IRDye™ 800 de Rockland, 610-732-124), diluido 1:10.000 en tampón de bloqueo Odyssey complementado
- 25 con Tween 20 al 0,2%. Después de eso, se lavó la membrana cuatro veces durante 5 minutos con tampón 1x PBS/Tween 20 al 0,1% y una vez durante 5 minutos con tampón 1x PBS. Después de eso, se exploró la membrana con el lector Odyssey y se analizaron los datos.

Tabla 4: Preparación del tampón 5x-DP

Sustancia	Disolución madre	Conc. final en tampón de lisis 1x	Adición para el tampón 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

- 30 Se filtró el tampón 5x-DP a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó en alícuotas de 40 ml a -80°C. Se obtuvieron estas disoluciones de los siguientes proveedores: Tris/HCl 1,0 M pH 7,5 (Sigma, T-2663), glicerol al 87% (Merck, número de catálogo 04091,2500); MgCl₂ 1,0 M (Sigma, M-1028); NaCl 5,0 M (Sigma, S-5150).

Compuestos de prueba para la elución

- 35 Se usaron los compuestos de prueba enumerados a continuación para los experimentos de elución tras la dilución tal como se describe a continuación. Normalmente, se disolvieron todos los compuestos en DMSO al 100% (Fluka, n.º de cat. 41647) a una concentración de 100 mM o 50 mM. Los compuestos se almacenaron a -20°C. Dilución del compuesto de prueba para los experimentos de elución: Preparar disolución madre 50 mM diluyendo la disolución madre 100 mM 1:1 con DMSO al 100%. Para los experimentos de elución, diluir adicionalmente el compuesto con tampón de elución (tampón 1x-DP/NP40 al 0,2%). Los compuestos usados para la elución:
- 40 Compuesto 1: Inhibidor de PI3K LY294002 (Tocris 1130; Vlahos *et al.*, 1994, J. Biol. Chem. 269, 5241-5248).

Compuesto 2: Inhibidor de PI3K gamma (Calbiochem 528106; AS-605240; Camps *et al.*, 2005, Nature Medicine 11, 936-943).

Compuesto 3: Inhibidor de PI3K gamma II (Calbiochem 528108; AS-604850; Camps *et al.*, 2005, Nature Medicine 11, 936-943).

5 **Ejemplo 4: Ensayo de unión competitiva para la identificación de compuestos de interacción con PI3K gamma**

Este ejemplo demuestra un ensayo de unión competitiva en el que los compuestos de prueba se añaden directamente a un lisado celular. Se añadieron compuestos de prueba (a diversas concentraciones) y la matriz de afinidad con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado a alícuotas de lisado y se dejó que se unieran a las proteínas contenidas en la muestra de lisado. Tras el tiempo de incubación, se separaron las perlas con proteínas capturadas del lisado. Entonces, se eluyeron las proteínas unidas y se detectó la presencia de PI3K gamma y se cuantificó usando un anticuerpo específico en un procedimiento de transferencia puntual y el sistema de detección infrarrojo Odyssey (figura 7A). Se generaron curvas de dosis-respuesta para los tres compuestos (figura 7B).

Lavado de la matriz de afinidad

15 Se lavó la matriz de afinidad tal como se describió en el ejemplo 1 (1,1 ml de volumen seco) dos veces con 15 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% y entonces se resuspendió en 5,5 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% (suspensión de perlas al 20%).

Preparación de los compuestos de prueba

20 Se prepararon disoluciones madre de los compuestos de prueba en DMSO correspondientes a una concentración 100 veces superior en comparación con la concentración de prueba deseada final (por ejemplo, se preparó una disolución madre 4 mM para una concentración de prueba final de 4 μ M). Este esquema de dilución dio como resultado una concentración de DMSO final del 1%. Para experimentos control (sin compuesto de prueba), se usó un tampón que contenía DMSO al 1% de modo que todas las muestras de prueba contenían DMSO al 1%.

Compuesto 1: Inhibidor de PI3K LY294002 (Tocris 1130; Vlahos *et al.*, 1994, J. Biol. Chem. 269,5241-5248).

25 Compuesto 3: Inhibidor de PI3K gamma II (Calbiochem 528108; AS-604850; Camps *et al.*, 2005, Nature Medicine 11, 936-943).

Compuesto 4 (CZC00015387).

Dilución del lisado celular

30 Se prepararon lisados celulares tal como se describió en el ejemplo 2. Para un experimento típico, se descongeló 1 alícuota de lisado que contenía 50 mg de proteína en un baño de agua a 37°C y entonces se mantuvo a 4°C. Al lisado se le añadió un volumen de tampón 1x-DP de modo que se logró una concentración de NP40 final del 0,4%. Entonces, se añadió 1/50 del volumen final de una disolución de inhibidor de proteasas concentrada 50 veces (1 comprimido de inhibidor de proteasas disuelto en 0,5 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4%; cóctel inhibidor de proteasas de comprimido libre de EDTA de Roche Diagnostics, número de catálogo 41647). Se diluyó adicionalmente el lisado añadiendo tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% de modo que se logró una concentración de proteína final de 5 mg/ml.

Incubación del lisado con el compuesto de prueba y la matriz de afinidad

40 Se dispensó un volumen de 100 μ l de lisado diluido en cada pocillo de una placa filtrante de 96 pocillos. Entonces se añadieron 1,5 μ l de compuesto de prueba diluido en DMSO. Para reacciones control, se usaron 1,5 μ l de DMSO sin compuesto de prueba. Entonces, se añadieron 50 μ l de matriz de afinidad (suspensión al 20%) por pocillo. Se incubó la placa durante 2 horas a 4°C en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf).

Se lavó la placa usando un instrumento colector a vacío (Millipore, MAVM 096 0R). Se lavó cada pocillo 4 veces con 400 μ l de tampón 1x-DP que contenía NP-40 al 0,4% y 2 veces con 400 μ l con tampón 1x-DP que contenía NP-40 al 0,2%.

45 Para la elución, se colocó la placa filtrante sobre una placa de recogida y se añadieron 40 μ l de tampón de muestra 2x (TrisHCl 100 mM, pH 6,8; SDS al 4%; glicerol al 20%; azul de bromofenol al 0,02%) con DTT (concentración final de 50 mM) a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador (750

rpm en un Thermomixer, Eppendorf). Posteriormente, se centrifugaron las placas durante 2 minutos a 1100 rpm (centrífuga Heraeus) y se recogió el eluato en los pocillos de la placa de recogida.

Detección y cuantificación de PI3K gamma eluída

Se detectó la proteína PI3K gamma en los eluatos y se cuantificó mediante un procedimiento de transferencia puntual usando un primer anticuerpo dirigido contra PI3K gamma (anti-PI3K gamma de Jena Bioscience, ABD-026S) y un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (anti-ratón IRDye™ 800, de Rockland, 610-732-124). Se hizo funcionar el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EE.UU.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en mayo de 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).

Se usó el aparato de transferencia puntual según las instrucciones del proveedor (aparato de microfiltración Bio-Dot, BioRad 170-65). Se trataron las membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT Nitrocellulose, PALL BTNT30R) con etanol al 20% y posteriormente se lavaron con tampón PBS. Por punto, se aplicaron 30 µl de muestra de eluato y se dejaron durante 30 min. antes de aplicar una bomba de vacío.

Para la detección de PI3K gamma, en primer lugar se bloquearon las membranas mediante incubación con tampón de bloqueo Odyssey (LICOR, 927-40000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las membranas bloqueadas durante 16 horas a 4°C con el primer anticuerpo (anti-PI3K gamma de Jena Bioscience, ABD-026S) que se diluyó en tampón de bloqueo Odyssey que contenía Tween-20 al 0,2%. Tras lavar la membrana cuatro veces durante 5 minutos con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,1%, se incubó la membrana durante 40 minutos con el anticuerpo de detección (anti-ratón IRDys™ 800 de Rockland, 610-732-124) diluido en tampón de bloqueo Odyssey que contenía Tween-20 al 0,2%. Después de eso, se lavó la membrana cuatro veces durante 5 minutos cada una con tampón 1x PBS/Tween 20 al 0,1% y una vez durante 5 minutos con tampón 1x PBS. Se mantuvo la membrana en el tampón PBS a 4°C y entonces se exploró con el instrumento Odyssey y se registraron las señales y se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5: Obtención del perfil de compuestos de compuestos de interacción con PI3K delta añadiendo compuestos a lisados celulares o células vivas

Este ejemplo demuestra los ensayos de unión en los que se añaden directamente los compuestos de prueba a un lisado celular o se incuban con células vivas (macrófagos RAW264.7).

Para el ensayo de unión competitiva del lisado celular, se añadieron compuestos a muestras de lisados y se dejó que se unieran a las proteínas contenidas en la muestra de lisado. Entonces se añadió la matriz de afinidad que contenía el ligando de feniltiazol inmovilizado con el fin de capturar proteínas no unidas al compuesto de prueba. Tras el tiempo de incubación, se separaron las perlas con proteínas capturadas del lisado mediante centrifugación. Entonces, se eluyeron las proteínas unidas a perlas y se detectó la presencia de proteína PI3K delta y se cuantificó usando un anticuerpo específico y el sistema de detección infrarrojo Odyssey.

Para el experimento de obtención del perfil de células, en primer lugar se incubaron alícuotas de macrófagos RAW264.7 vivos con compuestos durante 30 minutos en medio de cultivo celular. Durante este tiempo de incubación, los compuestos pueden entrar en las células y unirse a dianas de proteína dentro de las células. Entonces se recogieron las células, se prepararon lisados celulares y se añadió la matriz de afinidad con el fin de capturar las proteínas no unidas al compuesto de prueba. Tras 90 minutos de incubación del lisado celular con la matriz de afinidad, se separaron las perlas con las proteínas capturadas del lisado mediante centrifugación. Entonces, se eluyeron las proteínas unidas y se detectó la presencia de PI3K delta y se cuantificó usando un anticuerpo específico y el sistema de detección infrarrojo Odyssey.

Ambos enfoques produjeron resultados similares para el compuesto de referencia permeable en células PI-103 (figura 8). Los otros dos compuestos (compuesto 5 y 6) interaccionaron con PI3K delta en el ensayo de lisado pero no significativamente en el ensayo de células. Un posible motivo para esta diferencia es que los dos últimos compuestos no eran suficientemente permeables en la célula.

Cultivo celular

Se cultivaron macrófagos RAW264.7 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, L-glutamina 4 mM, glucosa 4,5 g/l; Gibco n.º41965) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (Gibco n.º10270) y bicarbonato de sodio 1,5 g/l (Gibco n.º25080, disolución al 7,5%) a 37°C en una atmósfera humidificada en presencia de CO₂ al 5%. Se subcultivaron los macrófagos raspando las células de la placa de cultivo en medio de cultivo DMEM usando un raspador de células y volviéndolas a sembrar en placa en medio de cultivo nuevo. Se usaron los macrófagos RAW264.7 para experimentos tras

alcanzar número de pase 3. Se lavaron las células una vez con solución salina tamponada con fosfato (D-PBS, Gibco n.º14040), se retiraron de la placa de cultivo en medio de cultivo DMEM y se centrifugaron a 1.000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se resuspendió el sedimento celular en medio de cultivo DMEM y se determinó el número de células. Se sembraron en placa 25 x 10⁶ células sobre una placa de cultivo de 10 cm y se incubaron durante 48 horas en medio de cultivo DMEM nuevo hasta que alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia.

A) Obtención del perfil de compuestos en células vivas

Tratamiento de células con compuesto de prueba

Se lavaron los macrófagos con tampón D-PBS y se añadió medio de cultivo DMEM nuevo. Se trataron las células con medio de cultivo DMEM que contenía DMSO al 0,2% (control de vehículo) o medio de cultivo DMEM con PI-103 10 µM (Calbiochem, número de catálogo 528100; Knight *et al.*, 2006, Cell 125, 733-747), compuesto 5 10 µM o compuesto 6 10 µM a lo largo de un periodo de 30 minutos. Se prepararon los compuestos de prueba como disoluciones madre 20 mM en DMSO y se diluyeron adicionalmente hasta alcanzar la concentración final de compuesto 10 µM y DMSO al 0,2% en el medio de cultivo celular.

Preparación de lisados celulares

Se retiró el medio de cultivo, se lavaron células una vez con tampón D-PBS y se añadieron 4 ml de tampón D-PBS enfriado con hielo. Se retiraron los macrófagos raspando suavemente las células y resuspendiéndolas en tampón D-PBS. Se transfirieron las suspensiones celulares a tubos Falcon de 15 ml y se mantuvieron en hielo. Se centrifugaron las suspensiones de macrófagos a 1500 rpm 4°C durante 3 minutos en una centrífuga Heraeus Multifuge. Se retiró el sobrenadante y se lavaron los sedimentos celulares con tampón D-PBS frío. Tras una etapa de centrifugación adicional, se congelaron rápidamente los sedimentos celulares en nitrógeno líquido. Se descongelaron las células sobre hielo y se lisaron añadiendo 120 µl de tampón de lisis 1x (tampón 1x-DP, NP40 al 0,8%). Se transfirieron los lisados a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se incubaron durante 30 minutos haciéndolos rotar a 4°C y luego se centrifugan durante 10 minutos a 13.200 rpm a 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos de ultracentrífuga y se centrifugaron en un rotor TLA-120.2 a 53.000 rpm (100.000 x g) durante 1 hora a 4°C. Se usó una alícuota del sobrenadante clarificado para la cuantificación de proteínas realizando un ensayo de Bradford (concentrado de colorante Protein Assay de Biorad, número de catálogo 500-0006). Se congelaron rápidamente las muestras restantes en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso en el ensayo de unión.

Dilución del lisado celular

Se prepararon lisados celulares tal como se describe a continuación a partir de macrófagos RAW264.7. Se descongeló una alícuota de lisado en un baño de agua a 37°C y entonces se mantuvo a 4°C. Al lisado se le añadió un volumen de tampón 1x-DP que contenía inhibidor de proteasas (1 comprimido de inhibidor de proteasas disuelto en 25 ml de tampón 1x-DP o 25 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,8%; cóctel inhibidor de proteasas de comprimido libre de EDTA de Roche Diagnostics, número de catálogo 41647) de modo que se logró una concentración de NP40 final del 0,8%. Se diluyó adicionalmente el lisado añadiendo tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,8% e inhibidores de proteinasas de modo que se logró una concentración de proteína final de 10 mg/ml.

Lavado de la matriz de afinidad

Se lavó la matriz de afinidad tal como se describió en el ejemplo 1 (0,25 ml de volumen de perlas secas) dos veces con 10 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,2% y finalmente se resuspendió en 5,0 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,2% (suspensión de perlas al 5%).

Incubación del lisado celular con la matriz de afinidad

Se dispensó un volumen de 50 µl de lisado diluido (proteína 10 mg/ml) en cada pocillo de una placa filtrante de 96 pocillos. Entonces se añadieron 100 µl de matriz de afinidad (suspensión al 5%) por pocillo. Se incubó la placa durante dos horas a 4°C en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf). Se lavó la placa usando un instrumento colector a vacío (Millipore, MAVM 096 0R). Se lavó cada pocillo dos veces con 220 µl de tampón 1x-DP que contenía NP-40 al 0,4%. Para la elución de las proteínas, se colocó la placa filtrante sobre una placa de recogida y se añadieron 20 µl de tampón de muestra 2x (TrisHCl 100 mM, pH 7,4; SDS al 4%; glicerol al 20%; azul de bromofenol al 0,0002%) con DTT (concentración final de 50 mM) a cada placa. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf). Posteriormente se centrifugaron las placas durante cuatro minutos a 1100 rpm (centrífuga Heraeus) y se recogió el eluato en los pocillos de la placa de recogida.

Detección y cuantificación de PI3K delta

Se detectó la proteína PI3K delta en los eluatos y se cuantificó colocando en forma de puntos alícuotas sobre una membrana de nitrocelulosa y detección con un primer anticuerpo dirigido contra PI3K delta y un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. Se trataron previamente las membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT Nitrocellulose, PALL BTNT30R) con etanol al 20% y posteriormente se lavaron con tampón PBS.

Para la detección de PI3K delta, en primer lugar se bloquearon las membranas mediante incubación con tampón de bloqueo Odyssey (LICOR, 927-40000) durante una hora a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las membranas bloqueadas durante 16 horas a 4°C con el primer anticuerpo (anti-PI3Kdelta, anticuerpo policlonal de conejo de Santa Cruz, número de catálogo sc-7176) que se diluyó 1:800 en tampón de bloqueo Odyssey que contenía Tween-20 al 0,2%. Tras lavar la membrana cuatro veces durante siete minutos con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,1%, se incubó la membrana durante 60 minutos con el anticuerpo de detección (de cabra anti-conejo IRDye™ 800CW de LICOR, número de catálogo 926-32211) diluido 1:2.500 en tampón de bloqueo Odyssey que contenía Tween-20 al 0,2% y SDS al 0,02%. Después de eso, se lavó la membrana cuatro veces durante 5 minutos cada una con tampón 1x PBS/Tween 20 al 0,1% y una vez durante cinco minutos con tampón 1x PBS. La membrana se mantuvo en tampón PBS a 4°C y entonces se exploró con el instrumento Odyssey y se registraron las señales y se analizaron según las instrucciones del fabricante. Se hizo funcionar el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EE.UU.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en mayo de 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).

B) Obtención del perfil de compuestos en lisados celulares

Preparación de lisados celulares

Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células una vez con tampón D-PBS y se añadieron 4 ml de tampón D-PBS enfriado con hielo. Se retiraron los macrófagos raspando suavemente las células y resuspendiéndolas en tampón D-PBS. Se transfirieron las suspensiones celulares a tubos Falcon de 15 ml y se mantuvieron en hielo. Se centrifugaron las suspensiones de macrófagos a 1500 rpm 4°C durante 3 minutos en un aparato Heraeus Multifuge. Se retiró el sobrenadante y se lavaron los sedimentos celulares con tampón D-PBS frío. Tras una etapa de centrifugación adicional, se congelaron rápidamente los sedimentos celulares en nitrógeno líquido. Se descongelaron las células en hielo y se lisaron añadiendo 120 µl de tampón de lisis 1x (tampón 1x-DP, NP40 al 0,8%). Se transfirieron los lisados a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se incubaron durante 30 minutos haciéndolos rotar a 4°C y entonces se centrifugaron durante 10 minutos a 13.200 rpm a 4°C. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos de ultracentrifuga y se centrifugaron en un rotor TLA-120.2 a 53.000 rpm (100.000 x g) durante 1 hora a 4°C. Se usó una alícuota del sobrenadante clarificado para la cuantificación de proteínas realizando un ensayo de Bradford (concentrado de colorante Protein Assay de Biorad, número de catálogo 500-0006). Se congelaron rápidamente las muestras restantes en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso en el ensayo de unión.

Dilución del lisado celular

Se prepararon los lisados celulares tal como se describe a continuación a partir de macrófagos RAW264.7. Se descongeló una alícuota de lisado en un baño de agua a 37°C y entonces se mantuvo a 4°C. Al lisado se le añadió un volumen de tampón 1x-DP que contenía inhibidor de proteasas (1 comprimido de inhibidor de proteasas disuelto en 25 ml de tampón 1x-DP o 25 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,8%; cóctel inhibidor de proteasas de comprimido libre de EDTA de Roche Diagnostics, número de catálogo 41647) de modo que se logró una concentración de NP40 final del 0,8%. Se diluyó adicionalmente el lisado añadiendo tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,8% e inhibidores de proteinasas de modo que se logró una concentración de proteína final de 10 mg/ml.

Lavado de la matriz de afinidad

Se lavó la matriz de afinidad tal como se describió en el ejemplo 1 (0,25 ml de volumen de perlas secas) dos veces con 10 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,2% y finalmente se resuspendió en 5,0 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,2% (suspensión de perlas al 5%).

Preparación de los compuestos de prueba

Para el experimento de competición en el lisado, se prepararon disoluciones madre de los compuestos de prueba en DMSO correspondientes a una concentración 50 veces superior en comparación con la concentración final en el ensayo (por ejemplo, se preparó una disolución madre 500 µM para una concentración de prueba final de 10 µM). Este esquema de dilución dio como resultado una concentración de DMSO final del 2% en el ensayo. Para experimentos control (sin compuesto de prueba), se usó un tampón que contenía DMSO al 2% de modo que todas

las muestras de prueba contenían DMSO al 2%.

Incubación del lisado celular con el compuesto de prueba y la matriz de afinidad

Se dispensó un volumen de 50 µl de lisado diluido (proteína 10 mg/ml) en cada pocillo de una placa filtrante de 96 pocillos. Entonces se añadieron 3,0 µl de compuesto de prueba diluido en DMSO. Para reacciones control, se usaron 3,0 µl de DMSO sin compuesto de prueba. Entonces, se añadieron 100 µl de matriz de afinidad (suspensión al 5%) por pocillo. Se incubó la placa durante dos horas a 4°C en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf). Se lavó la placa usando un instrumento colector a vacío (Millipore, MAVM 096 0R). Se lavó cada pocillo dos veces con 220 µl de tampón 1x-DP que contenía NP-40 al 0,4%. Para la elución de proteínas se colocó la placa filtrante sobre una placa de recogida y se añadieron 20 µl de tampón de muestra 2x (TrisHCl 100 mM, pH 7,4; SDS al 4%; glicerol al 20%; azul bromofenol al 0,0002%) con DTT (concentración final de 50 mM) a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf). Posteriormente, se centrifugaron las placas durante cuatro minutos a 1100 rpm (centrífuga Heraeus) y se recogió el eluato en los pocillos de la placa de recogida. Se realizó la detección y la cuantificación de PI3K delta tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 6: Obtención del perfil de selectividad de compuestos de interacción con PI3K usando espectrometría de masas cuantitativa

Este ejemplo demuestra un ensayo de unión competitiva en el que los compuestos de prueba se añaden directamente a un lisado celular. Se añadieron los compuestos de prueba (en diversas concentraciones) y la matriz de afinidad (mezcla 1:1 de perlas con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado y perlas con ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado) a las alícuotas de lisado celular y se dejó que se unieran a las proteínas contenidas en la muestra de lisado. Tras el tiempo de incubación, se separaron las perlas con proteínas capturadas del lisado. Entonces, se eluyeron las proteínas unidas y se midió la presencia de cinasas usando espectrometría de masas cuantitativa basándose en el método ITRAQ. Se determinaron los valores de CI_{50} para la interacción de tres compuestos con varias cinasas (figura 9).

Lavado de la matriz de afinidad

Se lavó la matriz de afinidad (mezcla 1:1 de perlas con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado y perlas con el ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado) dos veces con 15 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% y entonces se resuspendió en 5,5 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% (suspensión de perlas al 20%).

Preparación de los compuestos de prueba

Se prepararon disoluciones madre de los compuestos de prueba en DMSO correspondientes a una concentración 100 veces superior en comparación con la concentración de prueba deseada final (por ejemplo, se preparó una disolución madre 4 mM para una concentración de prueba final de 4 µM). Este esquema de dilución dio como resultado una concentración de DMSO final del 1%. Para experimentos control (sin compuesto de prueba), se usó un tampón que contenía DMSO al 1% de modo que todas las muestras de prueba contenían DMSO al 1%.

Compuesto CZC00018052: inhibidor de PI3K/mTOR cinasa doble PI-103 (número de catálogo de Calbiochem 528100; Knight *et al.*, 2006, Cell 125, 733-747).

Compuesto CZC00015097: Inhibidor de PI3K gamma I (Calbiochem 528106; AS-605240; Camps *et al.*, 2005, Nature Medicine 11, 936-943).

Dilución del lisado celular

Se prepararon lisados celulares a partir de células Ramos (número de la ATCC CRL-1596) tal como se describió en el ejemplo 2. Para un experimento típico, se descongeló una alícuota de lisado que contenía 50 mg de proteína en un baño de agua a 37°C y entonces se mantuvo a 4°C. Al lisado se le añadió un volumen de tampón 1x-DP de modo que se logró una concentración de NP40 final del 0,4%. Entonces, se añadió 1/50 del volumen final de una disolución de inhibidor de proteasa concentrada 50 veces (1 comprimido de inhibidor de proteasas disuelto en 0,5 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4%; cóctel inhibidor de proteasas de comprimido libre de EDTA de Roche Diagnostics, número de catálogo 41647). Se diluyó adicionalmente el lisado añadiendo tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% de modo que se logró una concentración de proteína final de 5 mg/ml.

Incubación del lisado con el compuesto de prueba y la matriz de afinidad

Se dispensó un volumen de 100 µl de lisado diluido en cada pocillo de una placa filtrante de 96 pocillos. Entonces,

se añadieron 1,5 µl de compuesto de prueba diluido en DMSO. Para las reacciones control, se usaron 1,5 µl de DMSO sin compuesto de prueba. Entonces, se añadieron 50 µl de matriz de afinidad (suspensión al 20%) por pocillo. Se incubó la placa durante 2 horas a 4°C en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf).

5 Se lavó la placa usando un instrumento colector a vacío (Millipore, MAVM 096 0R). Se lavó cada pocillo 4 veces con 400 µl de tampón 1x-DP que contenía NP-40 al 0,4% y 2 veces con 400 µl con tampón 1x-DP que contenía NP-40 al 0,2%.

10 Para la elución, se colocó la placa filtrante sobre una placa de recogida y se añadieron 40 µl de tampón de muestra 2x (TrisHCl 100 mM, pH 6,8; SDS al 4%; glicerol al 20%; azul de bromofenol al 0,02%) con DTT (concentración final de 50 mM) a cada pocillo. Se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador (750 rpm en un Thermomixer, Eppendorf). Posteriormente, se centrifugaron las placas durante 2 minutos a 1.100 rpm (centrífuga Heraeus) y se recogió el eluato en los pocillos de la placa de recogida.

Detección y cuantificación de cinasas mediante espectrometría de masas

15 Se detectaron las cinasas en el eluato mediante espectrometría de masas tal como se describió en el ejemplo 2 y se realizó el análisis cuantitativo usando el método ITRAQ tal como se describió previamente (documento WO 2006/134056; Bantscheff *et al.*, 2007. Nature Biotechnology 25, 1035-1044) y se calcularon los valores de CI_{50} para la interacción de cinasas y compuestos individuales (figura 9).

Ejemplo 7: Obtención del perfil de selectividad de compuestos de interacción con PI3K usando inmunodetección multiplexada

20 Este ejemplo demuestra un ensayo de unión competitiva en el que los compuestos de prueba se añaden directamente a un lisado celular. Se añadieron los compuestos de prueba (a diversas concentraciones) y la matriz de afinidad (mezcla 1:1 de perlas con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado y perlas con ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado) a alícuotas de lisado celular y se dejó que se unieran a las proteínas contenidas en la muestra de lisado. Tras el tiempo de incubación, se separaron las perlas con proteínas capturadas del lisado. Entonces, se eluyeron las proteínas unidas y se detectó la presencia de cinasas y se cuantificó usando un formato de inmunodetección multiplexada. Se generaron curvas de dosis-respuesta para cinasas individuales y se calcularon los valores de CI_{50} (figuras 10 y 11).

Lavado de la matriz de afinidad

30 Se lavó la matriz de afinidad (mezcla 1:1 de perlas con el ligando 1 de feniltiazol inmovilizado y perlas con ligando de fenilmorfolin-cromeno inmovilizado) dos veces con 15 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% y entonces se resuspendió en 5,5 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% (suspensión de perlas al 20%).

Preparación de compuestos de prueba

35 Se prepararon disoluciones madre de compuestos de prueba en DMSO correspondientes a una concentración 100 veces superior en comparación con la concentración de prueba deseada final (por ejemplo, se preparó una disolución madre 4 mM para una concentración de prueba final de 4 µM). Este esquema de dilución dio como resultado una concentración de DMSO final del 1%. Para experimentos control (sin compuesto de prueba), se usó un tampón que contenía DMSO al 1% de modo que todas las muestras de prueba contenían DMSO al 1%. Compuesto CZC00018052: inhibidor de PI3K/mTOR cinasa doble PI-103 (número de catálogo de Calbiochem 528100; Knight *et al.*, 2006, Cell 125, 733-747).

Dilución del lisado celular

40 Se prepararon los lisados celulares tal como se describió en el ejemplo 2. Para este experimento, se usó una mezcla 1:1 de lisados de células Jurkat (número de catálogo de la ATCC TIB-152 Jurkat, cloe E6-1) y Molt-4 (número de catálogo de la ATCC CRL-1582). Para un experimento típico, se descongeló una alícuota de lisado que contenía 50 mg de proteína en un baño de agua a 37°C y entonces se mantuvo a 4°C. Al lisado se le añadió un volumen de tampón 1xDP de modo que se logró una concentración de NP40 final del 0,4%. Entonces, se añadió 1/50 del volumen final de una disolución de inhibidor de proteasas concentrada 50 veces (1 comprimido de inhibidor de proteasas disuelto en 0,5 ml de tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4%; cóctel inhibidor de proteasas de comprimido libre de EDTA de Roche Diagnostics, número de catálogo 41647). Se diluyó adicionalmente el lisado añadiendo tampón 1x-DP que contenía NP40 al 0,4% de modo que se logró una concentración de proteína final de 5 mg/ml.

Incubación del lisado con el compuesto de prueba y la matriz de afinidad

A una placa filtrante de 96 pocillos (Multiscreen Solvint Filter Plate, Millipore MSRL N04 10) se le añadieron: 100 µl de matriz de afinidad (perlas) por pocillo, 3 µl de disolución de compuesto y 50 µl de lisado celular. Se sellaron las placas y se incubaron durante dos horas en una sala fría en un aparato Thermoxer con agitación (750 rpm). Después de eso, se lavó la placa dos veces con 220 µl de tampón de lavado. Entonces se eluyeron las perlas con 20 µl de tampón de muestra. Se congeló rápidamente el eluato a -80°C y se almacenó a -20°C.

Detección y cuantificación de cinasas eluidas

Se detectaron las cinasas en los eluatos y se cuantificaron mediante un procedimiento de colocación en forma de puntos sobre membranas de nitrocelulosa usando un primer anticuerpo dirigido contra la cinasa de interés y un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente (anticuerpos anti-ratón o anti-conejo IRDye™ de Rockland). Se hizo funcional el sistema de obtención de imágenes infrarrojas Odyssey de LI-COR Biosciences (Lincoln, Nebraska, EE:UU.) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Schutz-Geschwendener *et al.*, 2004. Quantitative, two-color Western blot detection with infrared fluorescence. Publicado en mayo de 2004 por LI-COR Biosciences, www.licor.com).

Tras colocar en forma de puntos los eluatos, en primer lugar se bloqueó la membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Millipore n.º 66485) mediante incubación con tampón de bloqueo Odyssey (LICOR, 927-40000) durante una hora a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las membranas bloqueadas durante 16 horas a 25°C con el primer anticuerpo que se diluyó en tampón de bloqueo Odyssey que contenía Tween-20 al 0,2%. Después de eso, se lavó la membrana cuatro veces durante 7 minutos con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Entonces se incubó la membrana durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo de detección (anticuerpo marcado con IRDye™ de Rockland) diluido en tampón de bloqueo Odyssey que contenía Tween-20 al 0,2% y SDS al 0,02%. Después de eso, se lavó la membrana cuatro veces durante 7 minutos cada una con tampón 1x PBS/Tween 20 al 0,1% y una vez durante 5 minutos con tampón 1x PBS. Se mantuvo la membrana en tampón PBS a 4°C y entonces se exploró con el instrumento Odyssey. Se registraron las señales de fluorescencia y se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Fuentes de anticuerpos:

Anti-PI3K gamma de ratón (Jena Bioscience ABD-026); anti-PI3K delta (Santa Cruz n.º sc-7176); anti-PI3K alfa (Cell signaling n.º 4255); anti-DNAPK (Calbiochem n.º NA57); Licor IRDye 800 de ratón (926-32210); Licor IRDye 680 de conejo (926-32221); Licor IRDye 800 de conejo (926-32211); Licor IRDye 680 de ratón (926-32220).

Ejemplo 8: Preparación de la matriz de afinidad con el ligando de fenilmorfolin-cromeno

Este ejemplo describe la síntesis del ligando de fenilmorfolin-cromeno (8-(4-aminometil-fenil)-2-morfolin-4-il-cromen-4-ona) (figura 16). Este ligando de captura se inmovilizó sobre un soporte sólido a través de unión covalente usando un grupo funcional amino y se usó para la captura de proteínas a partir de lisados celulares (véase por ejemplo la figura 17).

Síntesis de 8-(4-aminometil-fenil)-2-morfolin-4-il-cromen-4-ona

Etapa 1

Se agitó ácido 2,3-dihidroxi-benzoico [A] (25 g, 0,16 mol) (Sigma-Aldrich, n.º de cat 126209) en metanol (125 ml) con ácido sulfúrico concentrado (1 ml) y se calentó la reacción a reflujo suave durante la noche. Entonces se concentró y se repartió el residuo entre acetato de etilo y bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se lavó la fase orgánica con bicarbonato de sodio acuoso saturado adicional, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró proporcionando éster metílico del ácido 2,3-dihidroxi-benzoico [B]. Rendimiento 15,2 g, 57%.

HPLC (Método B): (M-H⁺) 167; TR = 2,3 min. ¹H RMN: (CDCl₃) δ 10,92 (s, 1H); 7,39 (dd, 1H); 7,13 (dd, 1H); 6,82 (dt, 1H); 3,70 (s, 1H); 3,98 (s, 3H).

Etapa 2

Se disolvió éster metílico del ácido 2,3-dihidroxi-benzoico [B] (15 g, 89 mmol) en diclorometano (100 ml) con piridina (3,6 ml, 44,6 mmol, 0,5 eq.) y DMAP (272 mg, 2,2 mmol, 0,025 eq.) y se enfrió la reacción en un baño de hielo/agua. Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (16,2 ml, 98,2 mmol, 1,1 eq.), se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano, se lavó con ácido clorhídrico 1 M (150 ml), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. Se recristalizó el producto en

acetato de etilo proporcionando éster metílico del ácido 2-hidroxi-3-trifluorometanosulfonilo-benzoico [C]. Rendimiento de la cosecha 1, 6,5 g, 24%. La recristalización adicional proporcionó una segunda cosecha, 6,8 g, 26%.

^1H RMN (CDCl_3): δ 11,11 (s, 1H); 7,80 (dd, 1H); 7,36 (dd, 1H); 6,86 (t, 1H); 3,93 (s, 3H).

5 Etapa 3

Se enfrió una disolución de N-acetilmorfolina (1,72 g, 13,3 mmol, 2 eq.) en 30 ml de tetrahidrofurano seco bajo nitrógeno en un baño de acetona/hielo seco (-78°C) y se trató con LDA (10 ml, disolución 2 M en THF, 3 eq.). Se agitó la mezcla de reacción durante 60 minutos, entonces se añadió éster metílico del ácido 2-hidroxi-3-trifluorometanosulfonilo-benzoico [C] (2 g, 6,6 mmol, 1 eq como una disolución en 10 ml de THF seco). Se dejó calentar la mezcla de reacción desde -78°C hasta temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Se diluyó la reacción con agua (4 ml) seguido por ácido clorhídrico 2 M (40 ml), entonces se extrajo tres veces con diclorometano. Se combinaron los extractos, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con acetato de etilo proporcionando éster 2-hidroxi-3-(3-morfolin-4-il-3-oxo-propionil)-fenílico del ácido trifluoro-metanosulfónico [D]. Rendimiento 1,06 g, 40%

^1H RMN (CDCl_3): δ 7,96 (dd, 1H); 7,49 (dd, 1H); 7,00 (t, 1H); 4,14 (s, 2H); 3,65-3,73 (m, 6H); 3,56 (t, 2H).

Etapa 4

Se trató éster 2-hidroxi-3-(3-morfolin-4-il-3-oxo-propionil)-fenílico del ácido trifluoro-metanosulfónico [D] (1,06 g, 2,7 mmol) en diclorometano (30 ml) con anhídrido trifluorometanosulfónico y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Entonces se concentró la mezcla de reacción, se redisolvió en metanol y se agitó durante otras 2 horas. Se diluyó la disolución con agua y se basificó hasta pH 8. Entonces se extrajo tres veces con diclorometano. Se combinaron los extractos, se lavaron con salmuera, se secaron con sulfato de magnesio y se evaporaron dando el producto bruto como un aceite marrón. La trituración con éter dio éster 2-morfolin-4-il-4-oxo-4H-cromen-8-ílico del ácido trifluoro-metanosulfónico [E] como un sólido marrón. Rendimiento 210 mg, 20%.

HPLC (método B): TR = 2,8 min. ^1H RMN (CDCl_3): δ 8,16 (dd, 1H); 7,49 (dd, 1H); 7,40 (t, 1H); 5,62 (s, 1H); 3,85 (dd, 4H); 3,60 (dd, 4H).

Etapa 5

Se agitaron éster 2-morfolin-4-il-4-oxo-4H-cromen-8-ílico del ácido trifluoro-metanosulfónico [E] (380 mg, 1,0 mmol), ácido 4-(N-Boc-aminometil)fenilborónico (280 mg, 1,1 mmol, 1,1 eq.), carbonato de potasio (275 mg, 2,0 mmol, 2 eq.) y tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) (60 mg, 0,05 mmol 0,05 eq.) en dioxano (4 ml) y se calentaron hasta 80°C durante 4 horas. Entonces se filtró la reacción enfriada y se concentró el filtrado a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida eluyendo con metanol al 0-3% en diclorometano proporcionando éster terc-butílico del ácido [4-(2-morfolin-4-il-4-oxo-4H-cromen-8-il)-bencil]-carbámico [F]. Rendimiento 238 mg, 54%.

HPLC (Método A): (MH^+) 437, (MNa^+) 459; TR 3,0 min. ^1H RMN (CDCl_3) δ 8,17 (dd, 1H); 7,55 (dd, 1H); 7,49 (d, 2H); 7,37-7,42 (m, 3H); 5,51 (s, 1H); 5,00 (sa, 1H); 4,39 (d, 2H); 3,74 (dd, 4H); 3,35 (dd, 4H); 1,48 (s, 9H).

Etapa 6

Se trató éster terc-butílico del ácido [4-(2-morfolin-4-il-4-oxo-4H-cromen-8-il)-bencil]-carbámico [F] (230 mg, 0,53 mmol), en diclorometano (5 ml) con cloruro de hidrógeno 4 M en dioxano (2 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas, tiempo durante el cual se forma un precipitado. Se eliminó el disolvente a vacío y se trituró el residuo con éter. Se recogió el sólido resultante mediante filtración y se secó dando 8-(4-aminometil-fenil)-2-morfolin-4-ilcromen-4-ona [G]. Rendimiento 189 mg, cuantitativo. HPLC (método 18): (MH^+) 337, (MNa^+) 359; TR 1,32 min. (amplio). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 8,54 (sa, 2H); 7,99 (dd, 1H); 7,68-7,73 (m, 3H); 7,62 (d, 2H); 7,51 (t, 1H); 5,79 (s, 1H); 4,09 (q, 2H); 3,68 (t, 4H); 3,41 (t, 4H)

Tabla 5: Abreviaturas

DCM	Diclorometano
DMAP	4-(dimetilamino)piridina

(continuación)

LDA	diisopropilamida de litio
MeOH	Metanol
THF	Tetrahidrofurano

- 5 Se obtuvieron los espectros de RMN en un aparato dpx400 de Bruker. Se llevó a cabo CLEM en un aparato Agilent 1100 usando una columna ZORBAX® SB-C18, 4,6 x 75 mm, 3,5 micrómetros. El flujo en la columna era 1 ml/min. y los disolventes usados eran agua y acetonitrilo (ácido fórmico al 0,1%) con un volumen de inyección de 10 µl. Las longitudes de onda eran de 254 y 210 nm. Los métodos se describen a continuación.

Método	Nombre del método de Easy Access	Nombre del método de ChemStation	Velocidad de flujo	Disolvente	Tiempo de ejecución
A	Columna corta ANL medio positivo	SANL_PGM.M	1 ml/min.	0-1,5 min. MeCN al 30-95% 1,5-4,5 min. MeCN al 95%	5 min.
B	Columna corta ANL medio negativo	SANL_NGM.M	1 ml/min.	0-1,5 min. MeCN al 30-95% 1,5-4,5 min. MeCN al 95%	5 min.

Inmovilización del ligando de fenilmorfolin-cromeno sobre perlas (matriz de afinidad)

- 10 Se equilibró la sefarosa 4 Fast Flow activada con NHS (Amersham Biosciences, 17-0906-01) con DMSO anhidro (dimetilsulfóxido, Fluka, 41648, H₂O <= 0,005%). Se colocó 1 ml de perlas sedimentadas en un tubo Falcon de 15 ml, se añadió disolución madre de compuesto (habitualmente 100 mM en DMF o DMSO) (concentración final de 0,2-2 µmol/ml de perlas) así como 15 µl de trietilamina (Sigma, T-0886, 99% de pureza). Se incubaron las perlas a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador vertical (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante
- 15 16 - 20 horas. Se determina la eficacia de acoplamiento mediante HPLC. Se bloquearon los grupos NHS que no reaccionaron mediante incubación con aminoetanol a temperatura ambiente en el agitador vertical durante la noche. Se lavaron las perlas con 10 ml de DMSO y se almacenaron en isopropanol a -20°C. Se usaron estas perlas como matriz de afinidad en los ejemplos 2, 3 y 4. Se generaron perlas control (sin ligando inmovilizado) bloqueando los grupos NHS mediante incubación con aminoetanol tal como se describió anteriormente.

20

REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de
 - a) proporcionar una preparación de proteínas que contiene PI3K,
 - b) poner en contacto la preparación de proteínas con 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,
 - c) incubar el complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K con un compuesto dado,
 - d) determinar si el compuesto puede separar PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada, y
 - e) determinar si el compuesto puede separar también ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR de la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa d) incluye la detección de PI3K separada o la determinación de la cantidad de PI3K separada y/o en el que la etapa e) incluye la detección de ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR separados o la determinación de la cantidad de ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR separados, preferiblemente, en el que se detectan PI3K, ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR separados o se determina la cantidad de PI3K, ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR separados mediante métodos de inmunodetección o espectrometría de masas, preferiblemente con un anticuerpo dirigido contra PI3K, ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR.
3. Método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de
 - a) proporcionar una preparación de proteínas que contiene PI3K,
 - b) poner en contacto la preparación de proteínas con 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,
 - c) detectar el complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en la etapa b), y
 - d) detectar si también se ha formado un complejo entre la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR en la etapa b).
4. Método según la reivindicación 3, en el que en la etapa c) dicha detección se realiza determinando la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K y/o en el que en la etapa d) se determina la cantidad de un complejo entre la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que las etapas a) a c) se realizan con varias preparaciones de proteínas con el fin de someter a prueba diferentes compuestos.
6. Método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar dos alícuotas de una preparación de proteínas que contiene PI3K,
 - b) poner en contacto una alícuota con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,
 - c) poner en contacto la otra alícuota con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido y con un compuesto dado en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,

etoxi]-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K,

d) determinar la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en las etapas b) y c), y

5 e) determinar si también se ha formado un complejo entre la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR en las etapas b) y c).

7. Método para la identificación de un compuesto de interacción con PI3K, que comprende las etapas de:

a) proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene PI3K,

b) incubar una alícuota con un compuesto dado,

c) recoger las células de cada alícuota,

10 d) lisar las células con el fin de obtener preparaciones de proteínas,

e) poner en contacto las preparaciones de proteínas con la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida o sal de la misma inmovilizada sobre un soporte sólido en condiciones que permiten la formación de un complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K, y

15 f) determinar la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en cada alícuota en la etapa e), y

g) determinar si también se ha formado un complejo entre la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y o mTOR en la etapa e).

20 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en el que una cantidad reducida del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K formado en la alícuota incubada con el compuesto en comparación con la alícuota no incubada con el compuesto indica que PI3K es una diana del compuesto.

25 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que se determina la cantidad del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonilfenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K mediante la separación PI3K de la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada y la detección posterior de PI3K separada o la determinación posterior de la cantidad de PI3K separada.

30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que dicha determinación de si también se ha formado un complejo entre 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida y ATM, ATR, DNAPK y/o mTOR se realiza mediante la separación de dicha proteína de la 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida inmovilizada y la detección posterior de ATM, ATR, DNAPK y o mTOR separados o la determinación posterior de la cantidad de ATM, ATR, DNAPK y o mTOR separados, preferiblemente en el que se detecta dicha proteína o se determina la cantidad de dicha proteína mediante métodos de inmunodetección o espectrometría de masas, preferiblemente con un anticuerpo dirigido contra dicha proteína.

35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, realizado como una selección de medio o alto rendimiento, y/o en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en compuestos sintéticos, o fármacos sintéticos orgánicos, más preferiblemente fármacos orgánicos de molécula pequeña y compuestos de molécula pequeña naturales.

40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el compuesto de interacción con PI3K es un inhibidor de PI3K, y/o en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de sefarosa (por ejemplo sefarosa activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferro o ferrimagnéticas, y/o en el que la 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida está covalentemente acoplada al soporte sólido.

45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la PI3K es PI3K gamma y/o PI3K delta.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la provisión de una preparación de proteínas

incluye las etapas de recoger al menos una célula que contiene PI3K y lisar la célula.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que las etapas de la formación del complejo de 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-etoxi}-N-[5-(4-cloro-3-metanosulfonil-fenil)-4-metil-tiazol-2il]-propionamida - PI3K se realizan en condiciones esencialmente fisiológicas.

Figura 1

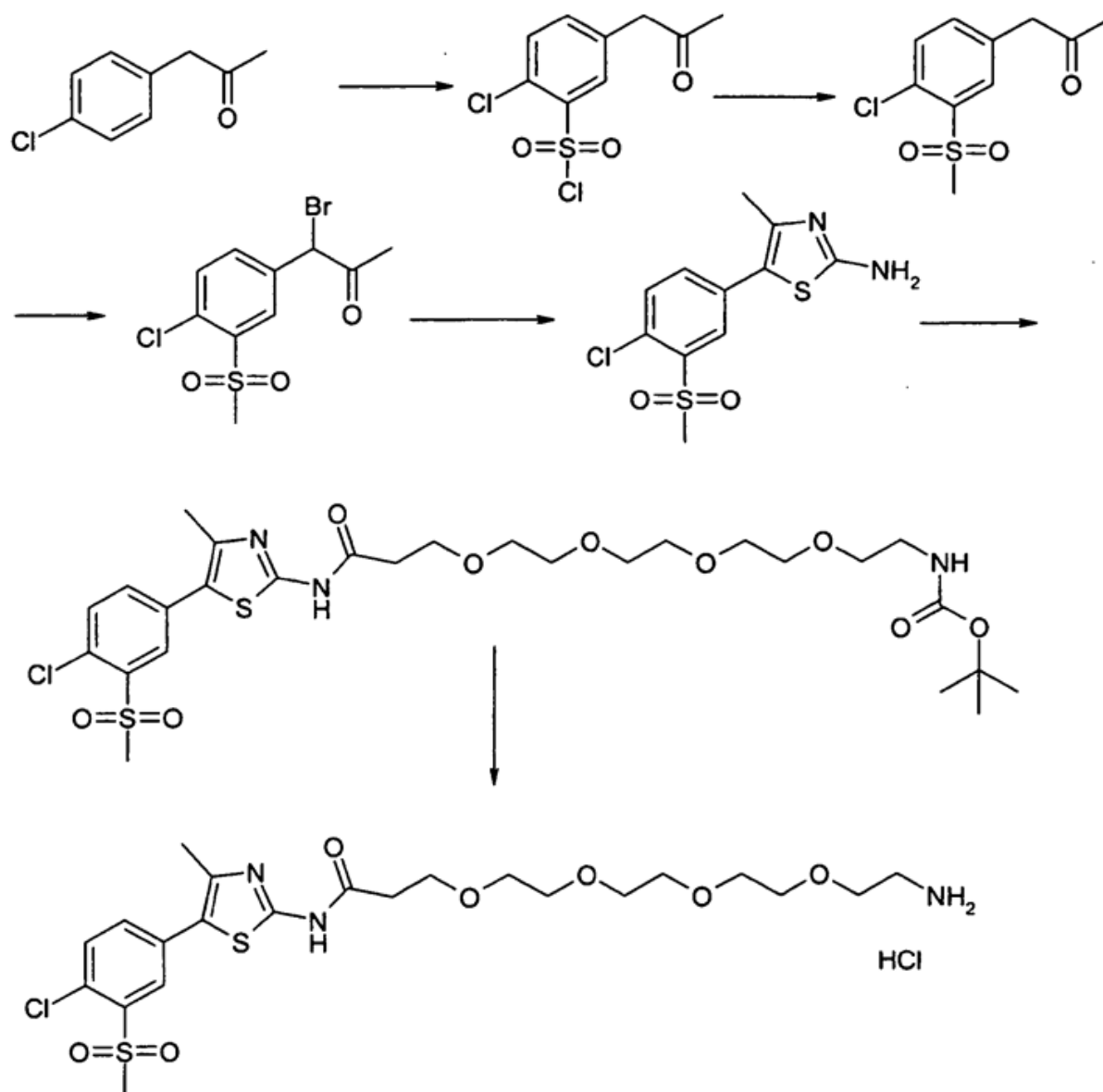


Figura 2

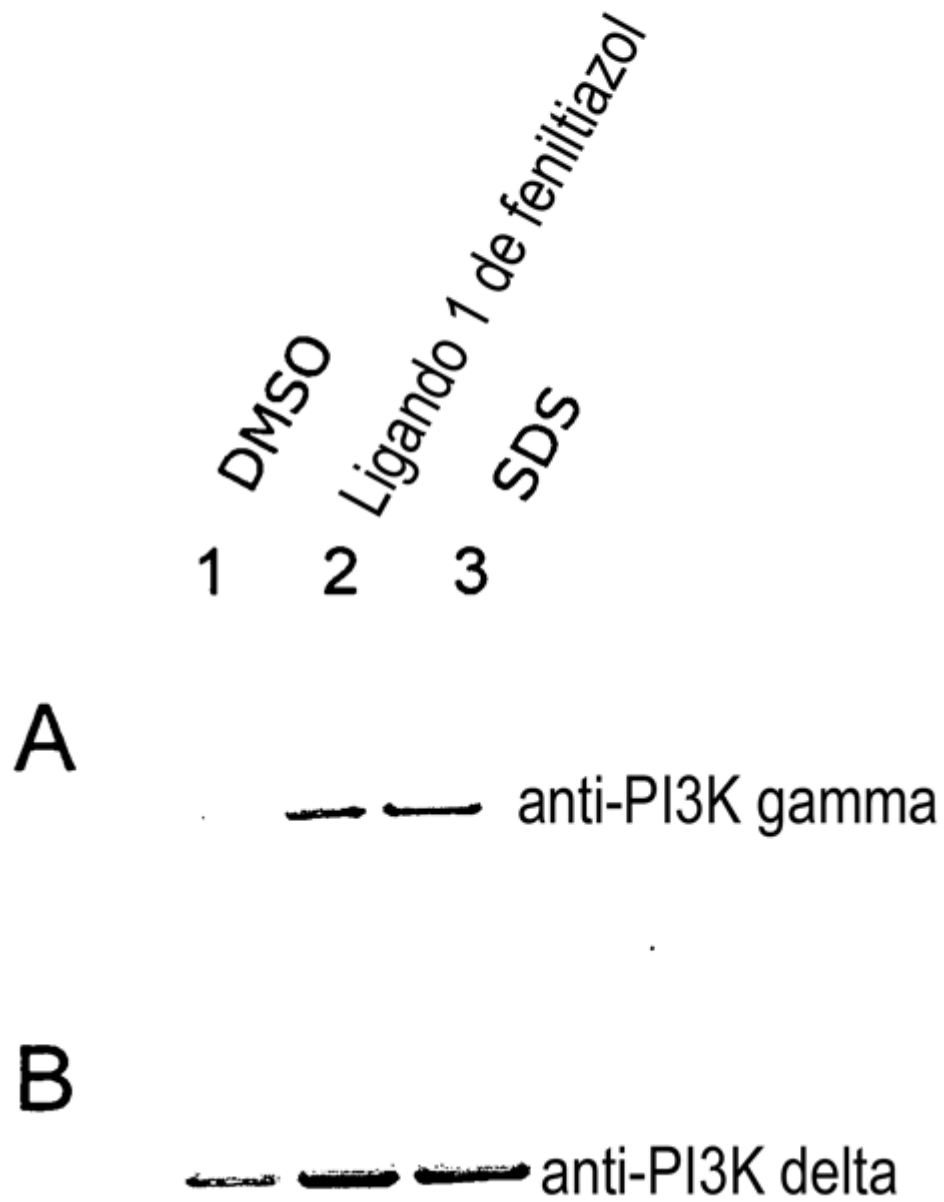


Figura 3

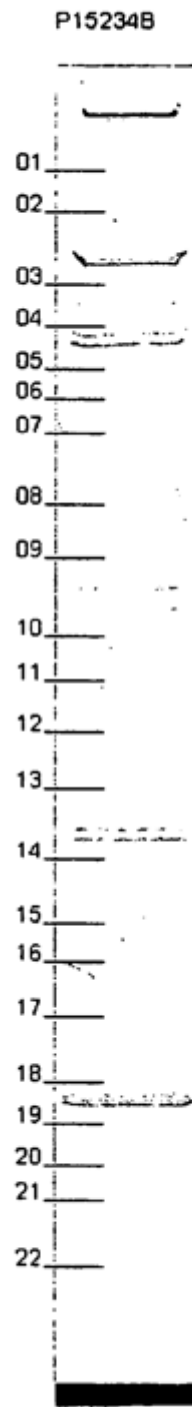


Figura 4

```

1      MELENYKQPV VLREDNCRRR RRMKPRSAAA SLSSMELIPI EFVLPTSQRK
51     CKSPETALLH VAGHGNVEQM KAQVWLRAL TSVAADFYHR LGPHHFLLLY
101    QKKGQWYEIY DKYQVVQTL DCLRYWKATHR SPGQIHLVQR HPPSEESQAF
151    QRQLTALIGY DVTDVSNVHD DELEFTRRGL VTPRMAEVAS RDPKLYAMHP
201    WVTSKPLPEY LWKKIANNCI FIVIHRSSTS QTIKVSPDDT PGAILQSFFT
251    KMAKKKSLMD IPESQSEQDF VLRVCGRDEY LVGETPIKNF QWVRHCLKNG
301    EEIHVVLDTP PDPALDEVK EEWPLVDDCT GVTGYHEQLT IHGKDHEVSF
351    TVSLWDCDRK FRVKIRGIDI PVLPRNTDLT VFVEANIQHG QQVLCQRRTS
401    PKPFTEEV LWNVLEFSIKI KDLPGKALLN LQIYCGKAPA LSSKASAESF
451    SSESCKGVQL LYYVNLILLID HRFLLRGEY VLHMWQISGK GEDQGSFNAD
501    KLTSATNPDK ENSMSISILL DNYCHPIALP KHQPTPDPEG DRVRAEMPNQ
551    LRKQLEAIIA TDPLNPLTAE DKELLWHFRY ESLKHPKAYP KLFSSVKWGO
601    QEIVAKTYQL LARREVWDQS ALDVGLTMQL LDCNFSDENV RAIQVQKLES
651    LEDDDVLHYL LQLVQAVKFE PYHDSALARF LLKRGLRNKR IGHFLFWFLR
701    SEIAQSRHYQ QRFVILEAY LRGCGTAMLH DFTQQVQVIE MLQKVTLDIK
751    SLSAEKYDVS SQVISQLKQK LENLQNSQLP ESFRVPYDPG LKAGALAIK
801    CKVMASKKKP LWLEFKCADP TALSNETIGI IFKHGDDLRO DMLILQILRI
851    MESIWETESL DLCLLPYGC I STGDKIGMIE IVKDATTIAK IQQSTVGNTG
901    AFKDEVLNHW LKEKSPTEEK FQAAVERFVY SCAGYCVATF VLGIGDRHND
951    NIMITETGNL FHIDFGHILG NYKSFLGINK ERVFPVLTDP FLFVMGTSGK
1001   KTSPHFQKFQ DICVKAYLAL RHHTNLLIIL FSMMLMTGMP QLTSEKEDIEY
1051   IRDALTVGKN EEDAKKYFLD QIEVCRDKGW TVQFNWFLHL VLGKQGEKH
1101   SA

```

Figura 5

```

1      MPPGVDCPME FWTKEENQSV VVDFLLPTGV YLNFPVSRNA NLSTIKQLLW
51     HRAQYEPLFH MLSGPEAYVF TCINQTAEQQ ELEDEQRRLC DVQPFLPVLR
101    LVAREGDRVK KLINSQISLL IGKGLHEFDS LCDPEVNDFR AKMCQFCEEA
151    AARRQQLGWE AWLQYSFPLQ LEPSAQTWGP GTLRLPNRAL LVNVKFEGSE
201    ESFTFQVSTK DVPLALMACA LRKKATVFRQ PLVEQPEDYT LQVNGRHEYL
251    YGSYPLCQFQ YICSLHSGSL TPHLTMVHSS SILAMRDEQS NPAPQVQKPR
301    AKPPPIPAKK PSSVSLWSLE QPFRIELIQG SKVNADERMK LVVQAGLFHG
351    NEMLCKTVSS SEVSVCSEPV WKQRLEFDIN ICDLPRMARL CFALYAVIEK
401    AKKARSTKKK SKKADCPIAW ANLMLFDYKD QLKTGERCLY MWPSVPDEKG
451    ELLNPTGTVR SNPNTDSAAA LLICLPEVAP HPVYYPALEK ILELGRHSEC
501    VHVTEEEQLQ LREILERRGS GELYEHEKDL VWKLRHEVQE HFPEALARLL
551    LVTKWNKHED VAQMLYLLCS WPPELVLSAL ELLDFSFPDC HVGSFAIKSL
601    RKLTDDDELQ YLLQLVQVLK YESYLDCELT KFLLDRALAN RKIGHFLFWH
651    LRSEMHVPSV ALRFGILILEA YCRGRTHHMK VLMKQGEALS KLKALNDFVK
701    LSSQKTPKPQ TKELMHLCMR QEAYLEALSH LQSPLDPSTL LAEVCVEQCT
751    FMDSKMKPLW IMYSNEEAGS GGSVGIIFKN GDDL RQDMLT LQMIQLMDVL
801    WKQEGLDLRM TPYGCLPTGD RTGLIEVVL SDTIANIQLN KSNMAATAAF
851    NKDALLNWLK SKNPGEALDR AIEEFTLSCA GYCVATYVLG IGDRHSDNIM
901    IRESGQLFHI DFGHFLGNFK TKFGINRERV PFILTYDFVH VIQOGKTNNS
951    EKFERFRGYC ERAYTILRRH GLLFLHLFAL MRAAGLPELS CSKDIQYLKD
1001   SLALGKTEEE ALKHFRVKFN EALRESWKTK VNWLAHNVSK DNRQ

```

Figura 6

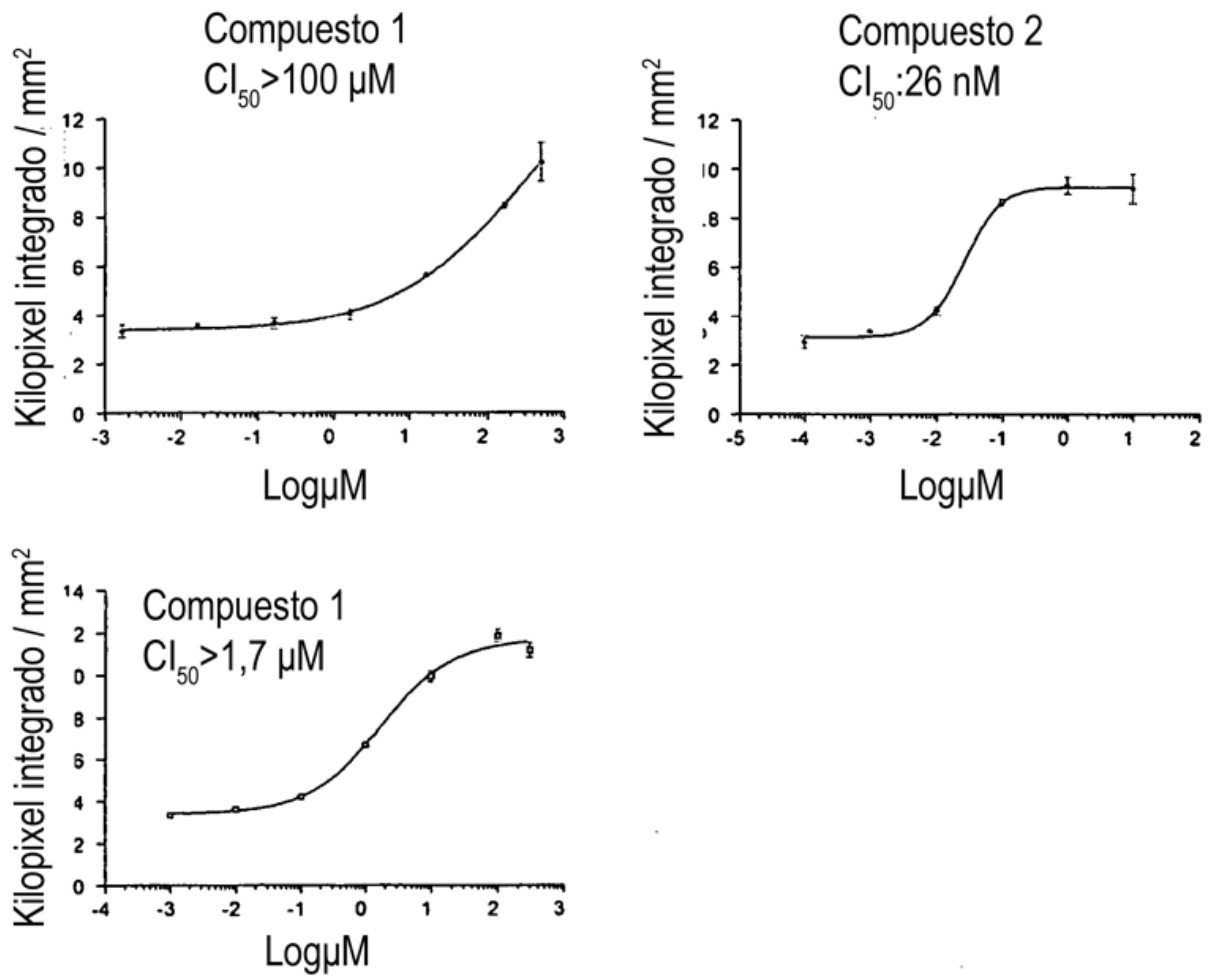


Figura 7A

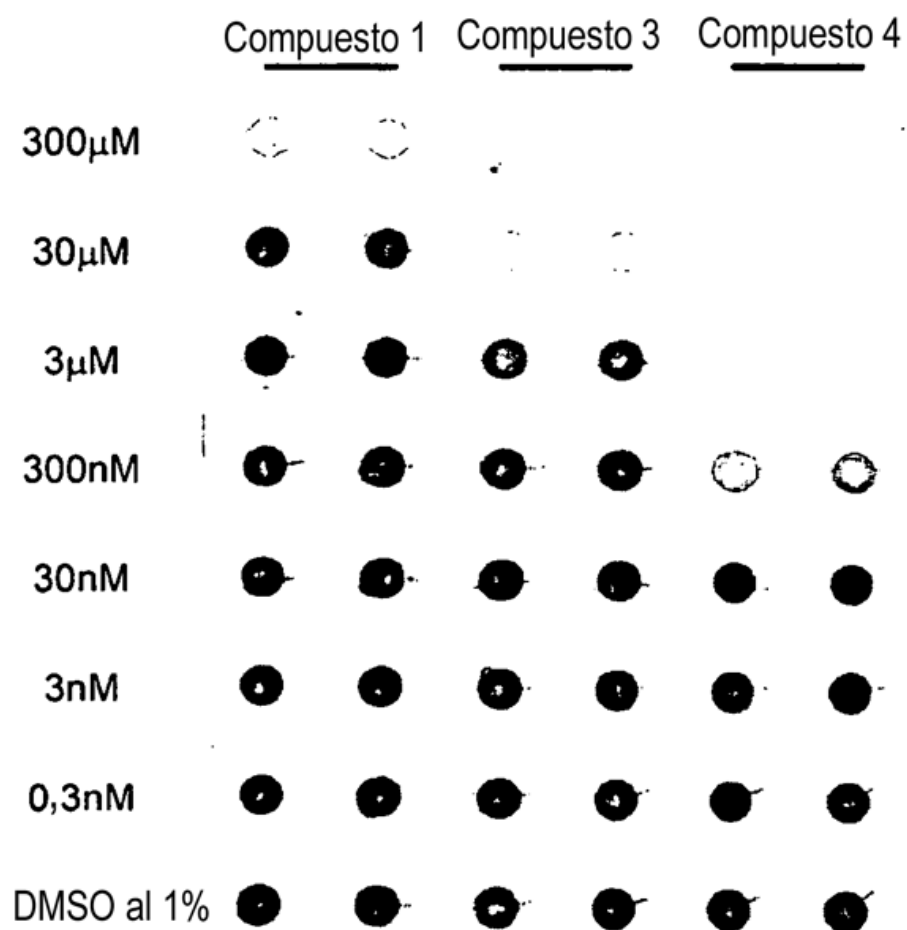


Figura 7 B

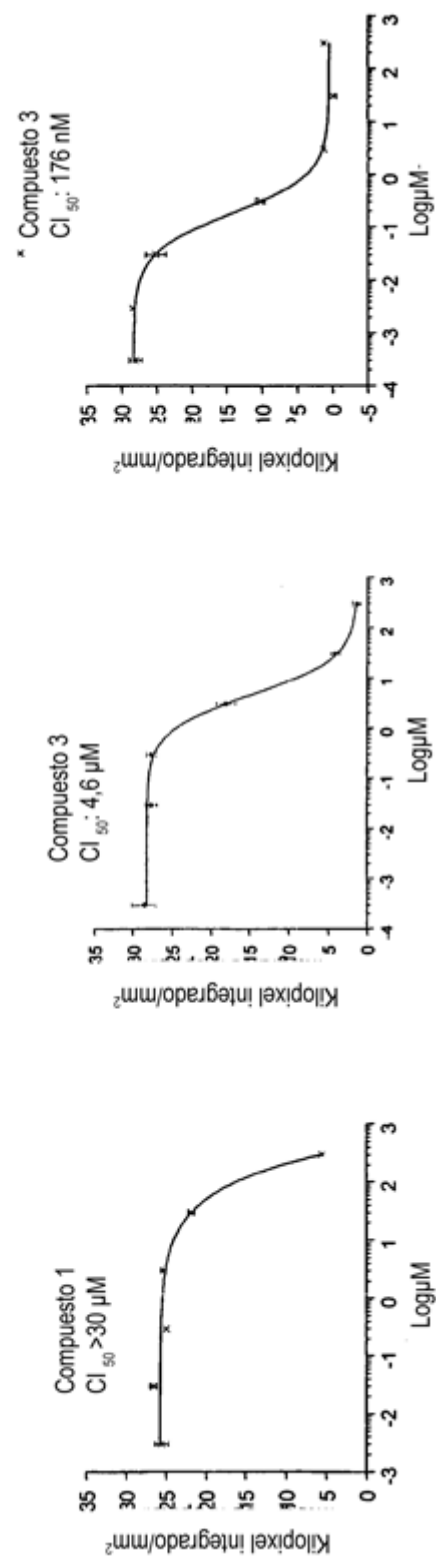


Figura 8

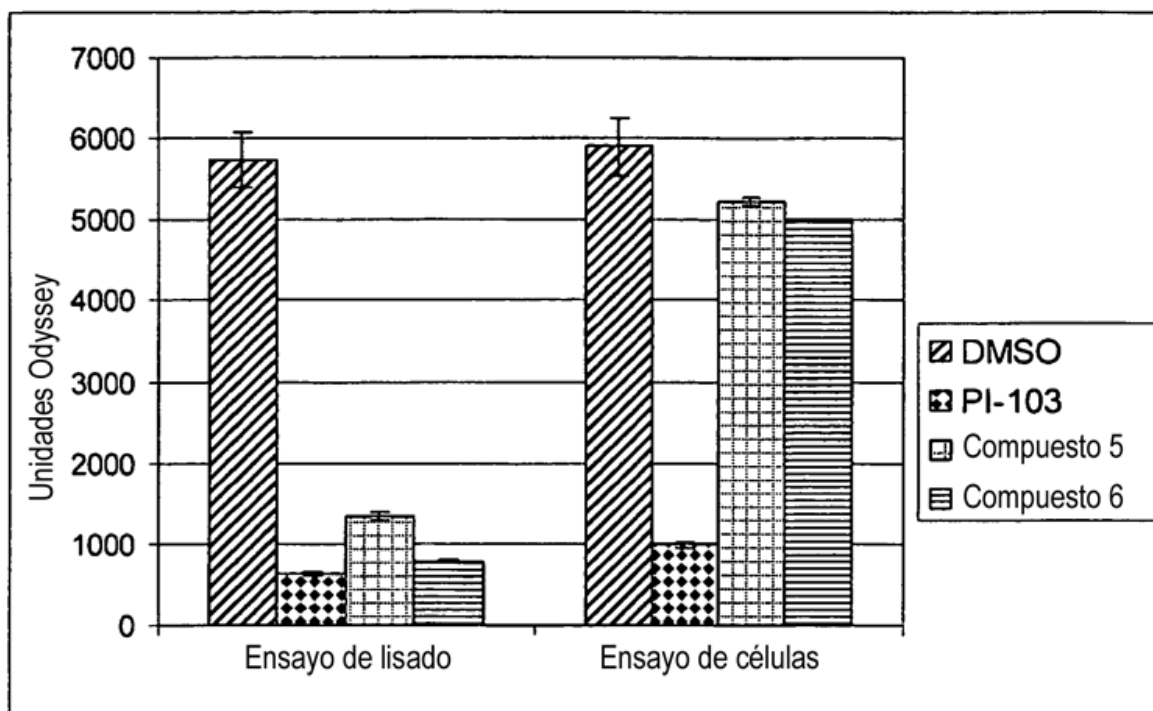


Figura 9

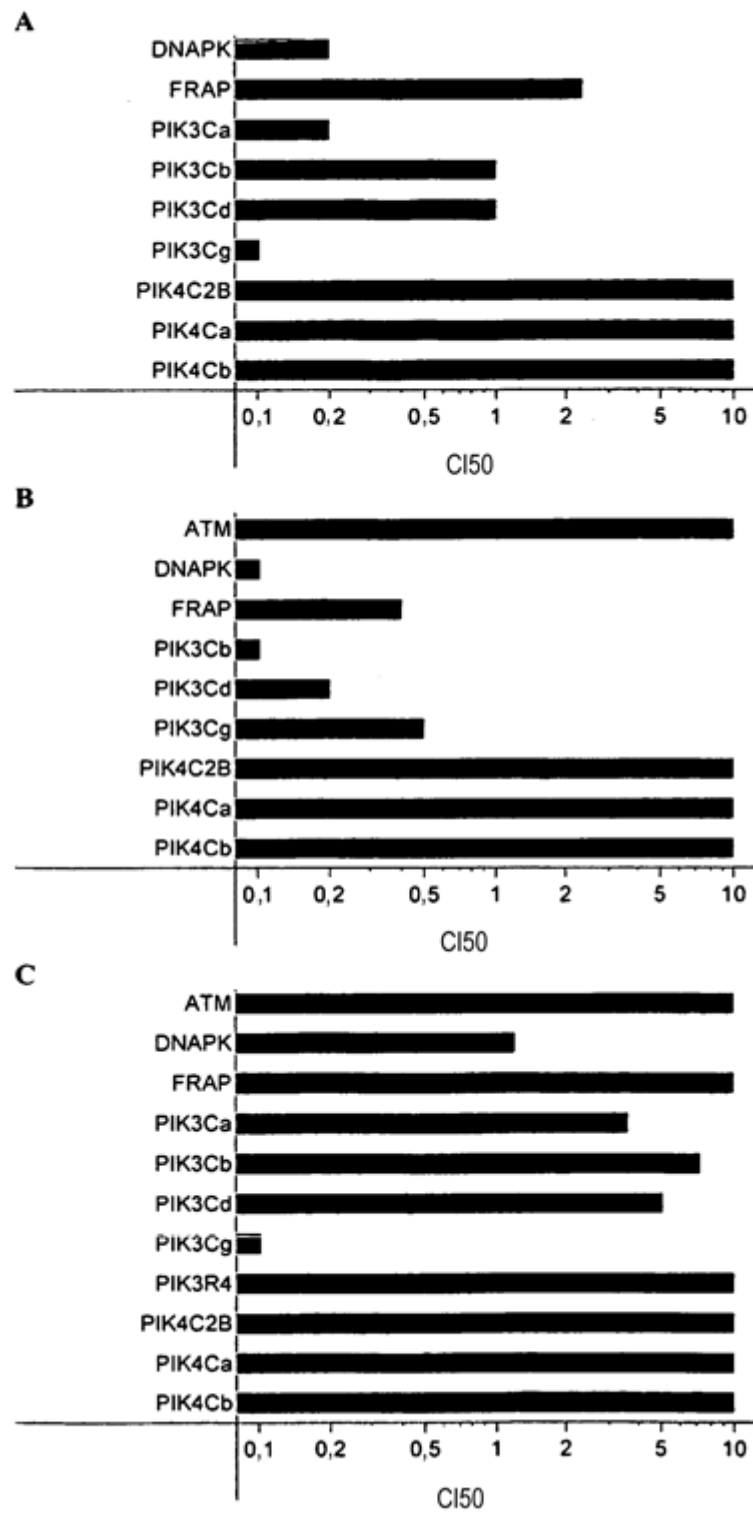


Figura 10

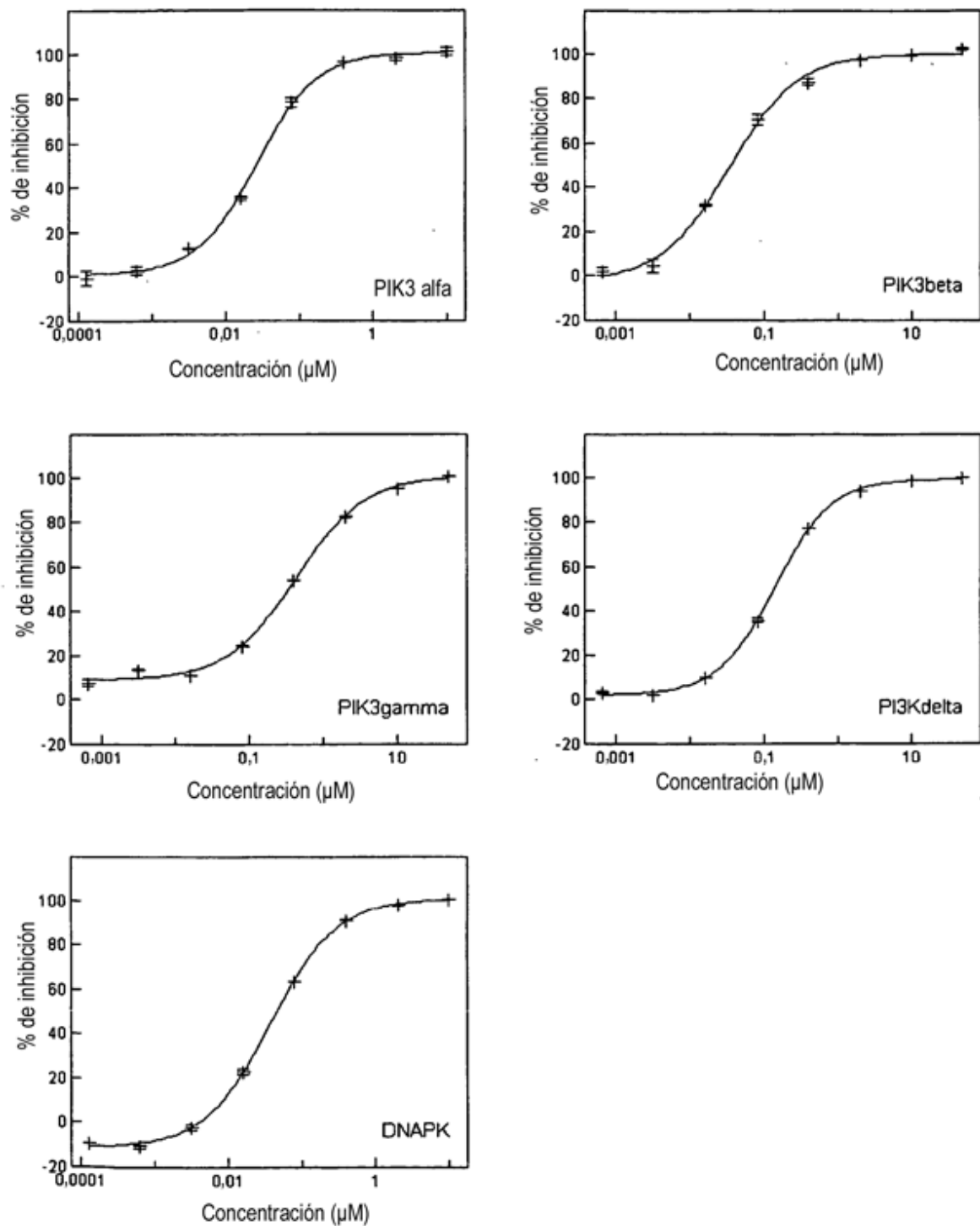


Figura 11

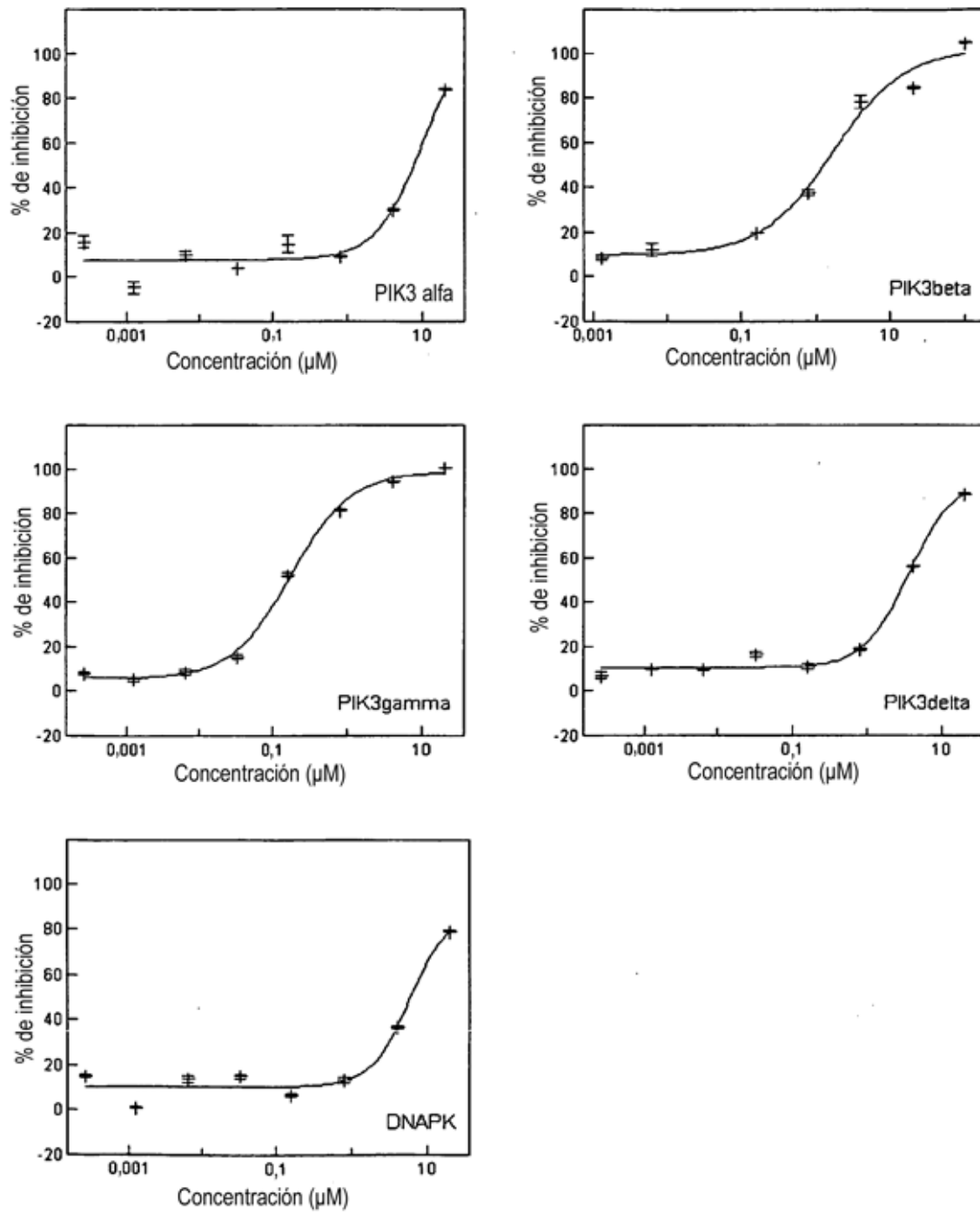


Figura 12

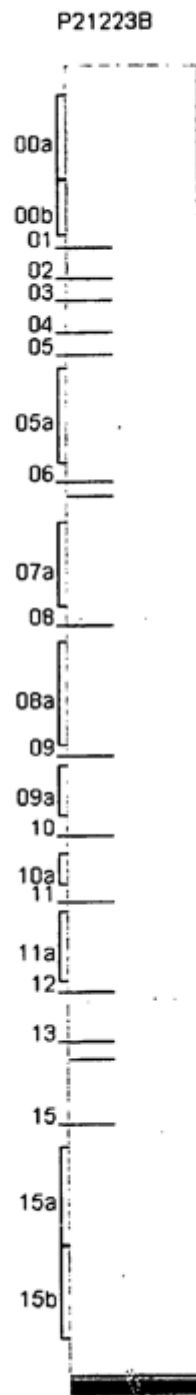


Figura 13

1 MAGSGAGVRC SLLRLQETLS AADRCGAALA GHQLIRGLGQ ECVLSSSPAV
 51 LALQTSLVFS RDFGLLVFVR KSLNSIEFRE CREEILKFLC IFLEKMGQKI
 101 APYSVEIKNT CTSVYTKDRA AKCKIPALDL LIKLLQTFRS SRLMDEFKIG
 151 ELFSKFYGEL ALKKKIPDTV LEKVYELLGL LGEVHPSEMI NNAENLFRAF
 201 LGELKTQMTS AVREP KLPVL AGCLKG LSSL LCNFTKSMEE DPQTSREIFN
 251 FVLKAIRPQI DLKRYAVPSA GLRLFALHAS QFSTCLLDNY VSLFEVLLKW
 301 CAHTNVELKK AALSALESFL KQVSNMVAKN AEMHKKNLQY FMEQFYGIIR
 351 NVDSNNKELS IAIRGYGLFA GPCKVINAKD VDFMYVELIQ RCKQMFLTQT
 401 DTGDDRQYQM PSFLQSVASV LLYLDTVPEV YTPVLEHLVV MQIDSFPQYS
 451 PKMQLVCCRA IVKVFLALAA KGPVLRNCIS TVVHQGLIRI CSKPVVLPKG
 501 PESESEDHRA SGEVRTGKWK VPTYKDYVDL FRHLLSSDQM MDSILADEAF
 551 PSVNSSSESL NHLLYDEFVK SVLKIVEKLD LTLEIQTVEG QENGDEAPGV
 601 WMIPTSDPAA NLHPAKPKDF SAFINLVEFC REILPEKQAE FFEPWVYSFS
 651 YELILQSTRL PLISGFYKLL SITVRNAKKI KYFEGVSPKS LKHSPEDPEK
 701 YSCFALFVKF GKEVAVKMKQ YKDELLASCL TFLLSLPHNI IELDVRAYVP
 751 ALQMAFKLGL SYTPLAEVGL NALEEWSIYI DRHVMQPYK DILPCLDGYL
 801 KTSALSDETK NNWEVSALSR AAQKGFNKVV LKHLKKTKNL SSNEAISLEE
 851 IRIRVVQMLG SLGGQINKNL LTVTSSDEMM KSYVAWDREK RLSFAVPFRE
 901 MKPVIFLDVF LPRVTELALT ASDRQTKVAA CELLHSMVMF MLGKATQMPE
 951 GGQGAPPMYQ LYKRTFPVLL RLACDQDQVT RQLYEPLVMQ LIHWFTNNKK
 1001 FESQDTVALL EAILDGIVDP VDSTLRDFCG RCIREFLKWS IKQITPOQQE
 1051 KSPVNTKSLF KRLYSLALHP NAFKRLGASL AFNNIYREFR EEESLVEQFV
 1101 FEALVIYMES LALAHADEKS LGTIQCCDA IDHLCRIIEK KHVSLNKAKK
 1151 RRLPRGFPPS ASLCLLDLVK WLLAHCGRPQ TECRHKSIEL FYKFVPLLPG
 1201 NRSPNLWLKD VLKEEGVSFL INTFEGGGCG QPSGILAQPT LLYLRGPFSL
 1251 QATLCWLDLL LAALECYNTF IGERTVGALQ VLGTEAQSSL LKAVAFFLES
 1301 IAMHDIIAAE KCFGTGAAGN RTSPQEGERY NYSKCTVVVR IMEFTTTLLN
 1351 TSPEGWKLLK KDLCNTHLMR VLVQTLCEPA SIGFNIGDVQ VMAHLPDVCV
 1401 NLMKALKMSP YKDILETHLR EKITAQSIEE LCAVNLYGPD AQVDRSRLAA
 1451 VVSACKQLHR AGLLHNILPS QSTD LHHSVG TELL SLVYKG IAPGDERQCL
 1501 PSLDLSCKQL ASGLLELAFa FGGLCERLVS LLLNPAVLST ASLGSSQGSV
 1551 IHFSHGeyFY SLFSETINTE LLKNLDLAVL ELMQSSVDNT KMVSAVLNGM
 1601 LDQSFRERAN QKHQGLKLAT TILQHWKKCD SWWAKDSPLE TKMAVLALLA
 1651 KILQIDSSVS FNTSHGSFPE VFTTYISLLA DTKLDLHLKG QAVTLLPFFT
 1701 SLTGGSLEEL RRVLEQLIVA HFPMQSREFP PGTPRFNNYV DCMKKFLDAL
 1751 ELSQSPMLLE LMTEVLCREQ QHVMEE LFQS SFRRIARRGS CVTQVGLLES
 1801 VYEMFRKDDP RLSFTRQSFV DRSLTLTLLWH CSLDALREFF STIVVDAIDV
 1851 LKSRTFKLNE STFDTQITKK MGYKKILDVM YSRLPKDDVH AKESKINQVF
 1901 HGSCITEGNE LTKTLIKLCY DAFTENMAGE NOLLERRRLY HCAAYNCAIS
 1951 VICCVFNElK FYQGFLFSEK PEKNLLIFEN LIDLKRRYNF PVEVEVPMER
 2001 KKKYIEIRKE AREAANGDSD GPSYMSSLSY LADSTLSEEM SQFDFSTGVQ
 2051 SYSYSSQDPR PATGRFRRRE QRDPTVHDDV LELEMDELNR HECMAPLTAL
 2101 VKHMHRSLGP PQGEEDSVPR DLPSWMKFLH GKLGNPiVPL NIRLFLAKLV

Figura 13 - continuación

2151	INTEEVFRPY	AKHWLSPLLQ	LAASENNGGE	GIHYMVVEIV	ATILSWTGLA
2201	TPTGVPK <u>DEV</u>	<u>LANRLLNFLM</u>	KHVFHPKRAV	<u>FRHNLEIIKT</u>	<u>LVECWKDCLS</u>
2251	<u>IPYRLIFEKF</u>	SGKDPNSKDN	SVGIQLLGIV	MANDLPPYDP	QCGIQSSEYF
2301	QALVNNMSFV	RYKEVYAAAA	EVLGLILRYV	<u>MERKNILEES</u>	<u>LCELVAKQLK</u>
2351	QHQNTMEDKF	IVCLNKVTKS	FPPLADRFMN	AVFFLLPKFH	GVLKTLCLEV
2401	VLCRVEGMTE	LYFQLKSKDF	VQVMRHRDDE	<u>RQKVCLDIIY</u>	<u>KMMPKLPKVE</u>
2451	LRELLNPVVE	FVSHPSTTCR	EQMYNILMWI	HDNYRDPES	TDNDSQEIFK
2501	LAKDVLIQGL	IDENPGLQLI	IRNFWSHETR	<u>LPSNTLDRLL</u>	<u>ALNSLYSPKI</u>
2551	EVHFLSLATN	FLLEMTSMSP	DYPNPMFEHP	LSECEFQEYT	IDSDWRFRST
2601	VLTPMFVETQ	ASQGTLOTRT	<u>QEGSLSARWP</u>	<u>VAGQIRATQQ</u>	<u>QHDFTLTQTA</u>
2651	<u>DGRSSFWDLT</u>	GSSTDPLVDH	TSPSSDSLFF	AHKRSERLQR	APLKSVPDF
2701	<u>GKKRLGLPGD</u>	<u>EVDNKVKGAA</u>	GRTDLLRLRR	RFMRDQEKLS	LMYARKGVAE
2751	QKREKEIKSE	LKMKQDAQVV	LYRSYRHGDL	<u>PDIQIKHSSL</u>	<u>ITPLQAVAQR</u>
2801	DPIIAKQLFS	<u>SLFSGILKEM</u>	DKFKTLSEKN	NITQKLLQDF	NRFLNTTFSF
2851	FPPFVSCIQD	ISCQHAALLS	LDPAAVSAGC	LASLQQPVGI	RLLEEALLRL
2901	<u>LPAELPAKRV</u>	RGKARLPDPV	<u>LRWVELAKLY</u>	RSIGEYDVL	GIFTSEIGTK
2951	QITQSALLAE	ARSDYSEAAK	<u>QYDEALNKQD</u>	WVDGEPTAE	KDFWELASLD
3001	CYNHLAEWKS	LEYCSTASID	SENPPDLNKI	WSEPFYQETY	LPYMIRSKLK
3051	<u>LLLQGEADQS</u>	<u>LLTFIDKAMH</u>	GELQKAIEL	HYSQELSLLY	LLQDDVDRAK
3101	YYIQNGIQSF	MQNYSSIDVL	LHQSRITKLQ	SVQALTEIQE	FISFISKQGN
3151	<u>LSSQVPLKRL</u>	LNTWTNRYPD	<u>AKMDPMNIWD</u>	<u>DIITNRCFFL</u>	SKIEEKLTP
3201	PEDNSMNVDQ	DGDPSDRMEV	QEQEEDISSL	IRSCKFSMKM	KMIDSARKQN
3251	NFSLAMKLLK	ELHKESKTRD	DWLVSQVQSY	CRLSHCRSRS	<u>QGCSEQVLT</u>
3301	<u>LKTVSLLDEN</u>	NVSSYLSKNI	LAFRDQNIL	GTTRYRIANA	<u>LSSEPACLA</u>
3351	<u>IEEDKARRIL</u>	<u>ELSGSSSEDS</u>	<u>EKVIAGLYQR</u>	AFQHLSEAVQ	AAEEEAQPPS
3401	WSCGPAAGVI	DAYMTLADFC	<u>DQQLRKEEEN</u>	<u>ASVIDSAELQ</u>	<u>AYPALVVEKM</u>
3451	LKALKLNSNE	ARLKFPRLQ	<u>IIERYPEETL</u>	<u>SLMTKEISSV</u>	PCWQFISWIS
3501	HMVALLDKDQ	AVAVQHSVEE	ITDNYPQAI	YPFIISSESY	SFKDTSTGHK
3551	NKEFVARIKS	KLDQGGVIQD	FINALDQLSN	PELLFKDWSN	DVRAELAKTP
3601	VNKKNIEKMY	<u>ERMYAALGDP</u>	<u>KAPGLGAFRR</u>	<u>KFIQTFGKEF</u>	DKHFGKGGSK
3651	<u>LLRMKLSDFN</u>	<u>DITNMLLLKM</u>	NKDSKPPGNL	KECSPWMSDF	<u>KVEFLRNELE</u>
3701	<u>IPGQYDGRGK</u>	PLPEYHVRIA	GFDERVTVMA	SLRRPKRIII	RGHDEREHPF
3751	LVKGGEDLRQ	DQVEQLFQV	MNGILAQDSA	<u>CSQALQLRT</u>	<u>YSVVPMTSRL</u>
3801	GLIEWLENTV	TLKDLLLLNTM	SQEEKAAAYLS	DPRAPPCEYK	DWLTKMSGKH
3851	DVGAYMLMYK	GANRTETVTS	<u>FRKRESKVP</u>	<u>DLKRAFRVM</u>	<u>STSPEAFLAL</u>
3901	<u>RSHFASSHAL</u>	ICISHWILGI	GDRHLNNFMV	AMETGGVIGI	DFGHAFGSAT
3951	QFLPVPELMP	FRLTRQFINL	MLPMKETGLM	YSIMVHALRA	<u>FRSDPGLLTN</u>
4001	<u>TMDVFVKEPS</u>	<u>FDWKNFEQKM</u>	<u>LKKGGSWIQE</u>	<u>INVAEKNWYP</u>	RQKICYAKRK
4051	LAGANPAVIT	CDELLLGHEK	APAFRDYVAV	ARGSKDHNIR	AQEPESGLSE
4101	ETQVKCLMDQ	<u>ATDPNILGRT</u>	WEGWEPWM		

Figura 14

1 MSLVLNDLLI CCRQLEHDRA TERKKEVEKF KRLIRDPETI KHLDRHSDSK
 51 QGKYNWDAV FRFLQKYIQK ETECLRIAKP NVSASTQASR QKKMQEISSL
 101 VKYFIKCANR RAPRLKCOEL LNyimDTVkd SSNGAIYGAD CSNILLKDIL
 151 SVRKYWCEIS QQQWLELFSV YFRLYLKPSQ DVHRVLVARI IHAVTKGCCS
 201 QTDGLNSKFL DFFSKAIQCA RQEKSSSGLN HILAALTIFL KTlAVNFRIR
 251 VCELGDDEILP TLLYIWTQHR LNDLSKEVII ELFQLQIYIH HPKGAKTQEK
 301 GAYESTKWRS ILYNLYDLLV NEISHIGSRG KYSSGFRNIA VKENLIELMA
 351 DICHQVFNE D TRSLEISQSY TTTQRESSDY SVPCKRKKIE LGWEVIKDHL
 401 QKSQNDFDLV PWLQIATQLI SKYPASLPNC ELSPLLMILS QLLPQQRHGE
 451 RTPYVLRCLT EVALCQDKRS NLESSQKSDL LKLWNKIWC TFRGISSEQI
 501 QAENFGLLGA IIQGSLEVD REFVKLFTGS ACRPSCPAVC CLTLALTTSI
 551 VPGAVKMGIE QNMCEVNRSF SLKESIMKWL LFYQLEGDLE NSTEVPPIILH
 601 SNFPHLVLEK ILVSLTMKNC KAAMNFFQSV PECEHHQKDK EELSFSEVEE
 651 LFLQTTFDKM DFLTIVRECG IEKHQSSIGF SVHQNLKESL DRCLLGLSEQ
 701 LLNNYSSEIT NSETLVRCR LLVGVLCYC YMGVIAEEEA YKSELFQKAN
 751 SLMQCAGESI TLFKNKTNEE FRIGSLRNM QLCTRCLSN TKKSPNKIAS
 801 GFFLRLLTSK LMNDIADICK SLASFIKKPF DRGEVESMED DTNGNLMEVE
 851 DQSSMNLFND YPDSSVSDAN EPGESQSTIG AINPLAE EYL SKQDLLFLDM
 901 LKFLCLCVTT AQTNTVSFRA ADIRRKLLML IDSSTLEPTK SLHLHMYLML
 951 LKELPGEEYP LPMEDVLELL KPLSNVCSLY RRDQDVCKTI LNHVLHVVK
 1001 LGQSNMDS SEN TRDAQQQFLT VIGAFWHLTK ERKYIFSVM ALVNCLKTLL
 1051 EADPYKSWAI LNVMGKDFPV NEVFTQFLAD NHHQVRMLAA ESINRLFQDT
 1101 KGDSSRLKA LPLKLQQTAF ENAYLKAQEG MREMSHAEN PETLDEIYNR
 1151 KSVLLTLIAV VLSCSPICEK QALFALCKSV KENGLEPHLV KKVLEKVSET
 1201 FGYYRLED FM ASHLDYLVLE WLNLDQTEYN LSSFPFILLN YTNIEDFYRS
 1251 CYKVLIPHLY IRSHFDEVKS IANQIQEDWK SLLTDCFPKI LVNIPYFAY
 1301 EGTRDSGMAQ QRETATKVYD MLKSENLLGK QIDHLFISNL PEIVVELLMT
 1351 LHEPANSSAS QSTDLCDFSG DLDPA NP PP FSHVIKATF AYISNCHKTK
 1401 LKSILEILSK SPDSYQKILL AICEQAAETN NVYK KHRILK IYHLFVSLLL
 1451 KDIKSGLGGA WAFVLRDVIY TLIHYINQRP SCIMDVSLRS FSLCCDLLSQ
 1501 VCQTAVTYCK DALENHLHVI VGTLIPLVYE QVEVQKQVLD LLKYLVIDNK
 1551 DNENLYITIK LLDPPDPHV FKLRLITQOK IKYSRGPFS LEEINHFSLV
 1601 SVYDALPLTR LEGLKDLRRQ LELHKDQMV D IMRASQDNPO DGIMVKLVVN
 1651 LLQLSKMAIN HTGEKEVLEA VGSCLEGEVGP IDFSTIAIQH SKDASYTKAL
 1701 KLFEDKELQW TFIMLTYLNN TLVEDCVKVR SAAVTCLKNI LATKTGHSFW
 1751 EIYKMTTDP M LAYLQPFRTS RKKFLEVPRF DKENPFEGLD DINLWIPLSE
 1801 NHDIWIKTLT CAFLDSGGTK CEILQLLKPM CEVKTD FCQT VLPYLIHDIL
 1851 LQDTNESWRN LLSTHVQGFF TSCLRHFSQT SRSTTPANLD SESEHFFRCC
 1901 LDKKSQRTML AVVDYMRRQK RPSSGTIFND AFWLDLNYLE VAKVAQSCAA
 1951 HFTALLYAEI YADKKSMD DQ EKRS SLAFEEG SQSTTISSLS EKSKEETGIS
 2001 LQDLLLEIYR SIGEPDSL YG CGGGKMLQPI TRLR TYEHEA MWG KALVTYD
 2051 LETAIPSSR QAGIIQALQN LGLCHILSVY LKGLDYENKD WCPELEELHY

Figura 14- continuación

2101	<u>QAAWRNMQWD</u>	<u>HCTSVSKEVE</u>	GTSYHESLYN	ALQSLRDREF	STFYESLKYA
2151	RVKEVEEMCK	<u>RSLESVYSLY</u>	<u>PTLSRLQAIG</u>	ELESIGELFS	RSVTHRQLSE
2201	VYIKWQKHSQ	<u>LLKDSDFSFO</u>	<u>EPIMALRTVI</u>	<u>LEILMEKEMD</u>	<u>NSQRECIKDI</u>
2251	<u>LTKHLVELSI</u>	<u>LARTFKNTQL</u>	PERAIFQIKQ	YNSVSCGVSE	WQLEEAQVFW
2301	<u>AKKEQSLALS</u>	<u>ILKQMIKKLD</u>	<u>ASCAANNPSL</u>	<u>KLTYTECLRV</u>	CGNWLAECL
2351	ENPAVIMQTY	<u>LEKAVEVAGN</u>	<u>YDGESSDEL</u>	NGKMKAFSL	<u>ARFSDTQYQR</u>
2401	IENYMKSSSEF	<u>ENKQALLKRA</u>	<u>KEEVGLLREH</u>	KIQTNRYTVK	<u>VQRELELDEL</u>
2451	<u>ALRALKEDRK</u>	RFLCKAVENY	INCLLSGEEH	DMWVFRCLSL	WLENSGVSEV
2501	NGMMKRDGMK	<u>IPTYKFLPLM</u>	<u>YQLAARMGTK</u>	MMGGLGFHEV	LNNLISRISM
2551	DHPHHTLFII	<u>LALANANRDE</u>	<u>FLTKPEVARR</u>	SRITKNVPKQ	<u>SSQLDED RTE</u>
2601	<u>AANRIICTIR</u>	SRRPQMVRVS	EALCDAYIIL	ANLDATQWKT	<u>QRKGINIPAD</u>
2651	<u>QPITKLKNLE</u>	<u>DVVVPTMEIK</u>	VDHTGEYGNL	VTIQSFKAEF	RLAGGVNLPK
2701	<u>IIDCVGSDGK</u>	<u>ERRQLVKGRD</u>	DLRQDAVMQO	VFQMCNTLLQ	RNTETRKRL
2751	TICTYKVVPL	<u>SQRSGVLEWC</u>	TGTVPIGEFL	VNNEDGAHKL	<u>YRPNDFS AFO</u>
2801	<u>CQKKMMEVQK</u>	KSFEKEYEVF	MDVCQNFQPV	FRYFCMEKFL	<u>DPAIWFEKRL</u>
2851	AYTRSVATSS	IVGYILGLGD	RHVQNILINE	QSAELVHIDL	<u>GVAFEQGKIL</u>
2901	<u>PTPETVPFRL</u>	<u>TRDIVDGMGI</u>	<u>TGVEGVFRR</u>	CEKTMEVMRN	SQETLLTIVE
2951	VLLYDPLFDW	TMNPLKALYL	QQRPEDETEL	HPTLNADDQE	<u>CKRNLS DIDO</u>
3001	<u>SFNKVAERVL</u>	MRLQEKLKG	EEGTVLSVGG	QVNLLIQQAI	DPKNLSRLFP
3051	GWKAWV				

Figura 15

1	<u>MLGTGPAAAT</u>	<u>TAATTSSNV</u>	<u>VLQQFASGLK</u>	SRNEETRAKA	AKELQHYVTM
51	ELREMSQEE	TRFYDQLNHH	IFELVSSSDA	NERKGGILAI	ASLIGVEGGN
101	ATRIGRFANY	LRNLLPSNDP	VVMEMASKAI	GRLAMAGDTF	TAEYVEFEVK
151	RALEWLGADR	NEGRRHAAVL	VLRELAISVP	TFFFQQVQPF	FDNIFVAVWD
201	PKQAIREGAV	AALRACLIIT	TQREPKEKQK	PQWYRHTFEE	<u>AEKGFDETLA</u>
251	KEKGMNRDDR	IHGALLILNE	LVRISMEGE	RLREEMEEIT	QQQLVHDKYC
301	<u>KDLMGFGTKP</u>	<u>RHITPFTSFQ</u>	AVQPQQSNAL	VGLLGYSSHQ	GLMGFGTSPS
351	PAKSTLVESR	CCRDLMEEKF	DQVCQWVLKC	RNSKNSLIQM	TILNLLPRLA
401	AFRPSAFTDT	QYLQDTMNHV	LSCVKKEKER	TAAFQALGLL	SVAVRSEFKV
451	YLPRVLDIIR	AALPPKDFAH	KRQKAMQVDA	TVFTCISMLA	<u>RAMGPGIQQD</u>
501	<u>IKELLEPMLA</u>	VGLSPALTAV	LYDLRQIPQ	LKKDIQDGLL	KMLSLVLMHK
551	PLRHGMPKG	LAHQLASPGL	TTLPEASDVG	SITLALRTL	SFEFEGHSLT
601	QFVRHCADHF	LNSEHKEIRM	EAARTCSRLL	TPSIHLISGH	AHVVSQTAVQ
651	VVADVLSKLL	<u>VVGITDPDPD</u>	<u>IRYCVLASLD</u>	ERFDAHLAQA	ENLQALFVAL
701	NDQVFEIREL	<u>AICTVGRLLS</u>	<u>MNPAFVMPFL</u>	<u>RKMLIQILTE</u>	<u>LEHSGIGRIK</u>
751	EQSARMLGHL	<u>VSNAPRLIRP</u>	<u>YMEPILKALI</u>	LKLKDPDPDP	NPGVINNVLA
801	TIGELAQVSG	LEMWKVDEL	FIIIMDMLQD	SSLLAKRQVA	LWTGLQLVAS
851	TGYVVEPYRK	YPTLLEVLN	FLKTEQNQGT	RREAIRVLGL	LGALDPYKHK
901	<u>VNIGMIDQSR</u>	<u>DASAVLSSES</u>	<u>KSSQDSSDYS</u>	TSEMLVNMGN	LPLDEFYPVAV
951	SMVALMRIFR	DQSLSHHHTM	VVQAITFIFK	SLGLKCVQFL	<u>PQVMPTFLNV</u>
1001	IRVCDGAIRE	FLFQQLGMLV	SFVKSHIRPY	MDEIVTLMRE	FWVMNTSIQS
1051	TIILLIEQIV	VALGGEFKLY	LPQLIPHMLR	<u>VFMHDNSPGR</u>	IVSIKLLAAI
1101	QLFGANLDDY	LHLLLPPIVK	<u>LFDAPEAPLP</u>	<u>SRKAALETVD</u>	RLTESLDFTD
1151	YASRIIHPIV	RTLQDQSPER	<u>STAMDTLSSL</u>	<u>VFQLGKKYQI</u>	<u>FIPMVNKKVLV</u>
1201	RHRINHQRVD	VLICRIVKGY	TLADEEEDPL	IYQHRMLRSG	<u>QGDALASGPV</u>
1251	<u>ETGPMKKLHV</u>	STINLQKAWG	AARRVSKDDW	LEWLRLSLE	<u>LLKDDSSPSL</u>
1301	RSCWALAQAY	NPMARDLFNA	AFVSCWSELN	EDQQDELIRS	IELALTSQDI
1351	AEVTQTLLNL	AEFMEHSDKG	PLPLRDDNGI	VLLGERAAKC	RAYAKALHYK
1401	ELEFQKGPTP	AILESLISIN	<u>NKLQOPEAAA</u>	<u>GVLEYAMKHF</u>	GELEIQATWY
1451	<u>EKLHEWEDAL</u>	<u>VAYDKKMDTN</u>	KDDPELMLGR	MRCLEALGEW	GQLHQCCCEK
1501	<u>WTLVNDETQA</u>	KMARMAAAAA	WGLGQWDSME	EYTCMIPRDT	HDGAFYRAVL
1551	ALHQDLFSLA	QQCIDKARDL	LDAELTAMAG	ESYSRAYGAM	VSCHMLSELE
1601	EVIQYKLVPE	RREIIRQIWW	ERLQGCQRIV	EDWQKILMVR	<u>SLVVSPHEDM</u>
1651	<u>RTWLKYASLC</u>	<u>GKSGRLALAH</u>	<u>KTLVLLLGVD</u>	<u>PSRQLDHPLP</u>	<u>TVHPQVITYAY</u>
1701	<u>MKNMWKSARK</u>	IDAFQHMQHF	VQTMQQQAQH	AIATEDQQHK	QELHKLMARC
1751	<u>FLKLGEWQLN</u>	<u>LQGINESTIP</u>	<u>KVLQYYSAAAT</u>	EHDRSWYKAW	HAWAVMNFEA
1801	VLHYKHQNA	RDEKKKLRHA	SGANITNATT	AATTAATATT	TASTECSNSE
1851	SEAESTENSP	TPSPLOKKVT	<u>EDLSKTLLMY</u>	<u>TVPAVQGGFR</u>	<u>SISLSRGNNL</u>
1901	<u>QDTLRVLTW</u>	FDYGHWPDPV	EALVEGVKAI	QIDTWLQVIP	QLIARIDTPR
1951	<u>PLVGRLIHQ</u>	<u>LTDIGRYHPQ</u>	<u>ALIYPLTVAS</u>	<u>KSTTTARHNA</u>	ANKILKNMCE
2001	HSNTLVQQAM	MVSEELIRVA	<u>ILWHEMWHEG</u>	<u>LEEASRLYFG</u>	ERNVKGMFEV
2051	LEPLHAMMER	GPQTLKETSF	NQAYGRDLME	AQEWCRKYM	SGNVKDLTQA

Figura 15 - continuación

2101	<u>WDLYYHVFRR</u>	ISKQLPQLTS	LELQYVSPKL	LMCRDLELAV	<u>PGTYDPNQPI</u>
2151	<u>IRIQSIAPSL</u>	QVITSKQRPR	KLTLMGSNHG	EFVFLKKGHE	DLRQDERVMQ
2201	LFGLVNTLLA	NDPTSLRKNL	SIQRYAVIPL	STNSGLIGWV	PHCDTLHALI
2251	RDYREKKKIL	LNIEHRIMLR	MAPDYDHLTL	MQKVEVFEHA	VNNTAGDDLA
2301	KLWLK <u>SPSS</u>	<u>EVWFDRRTNY</u>	TRSLAVMSMV	GYILGLGDRH	<u>PSNLMLDRLS</u>
2351	GKILHIDFGD	CFEVAMTREK	FPEKIPFRLT	<u>RMLTNAMEVT</u>	<u>GLDGNYRITC</u>
2401	<u>HTVMEVLREH</u>	KDSVMAVLEA	FVYDPLLNR	LMDTNTKGNK	RSRTRTDSYS
2451	AGQSVEILDG	VELGEPAAKK	TGTTVPESIH	SFIGDGLVKP	EALNKKAIQI
2501	INRVRDKLTG	RDFSHDDTLD	VPTQVELLIK	QATSHENLCQ	CYIGWCPFW

Figura 16

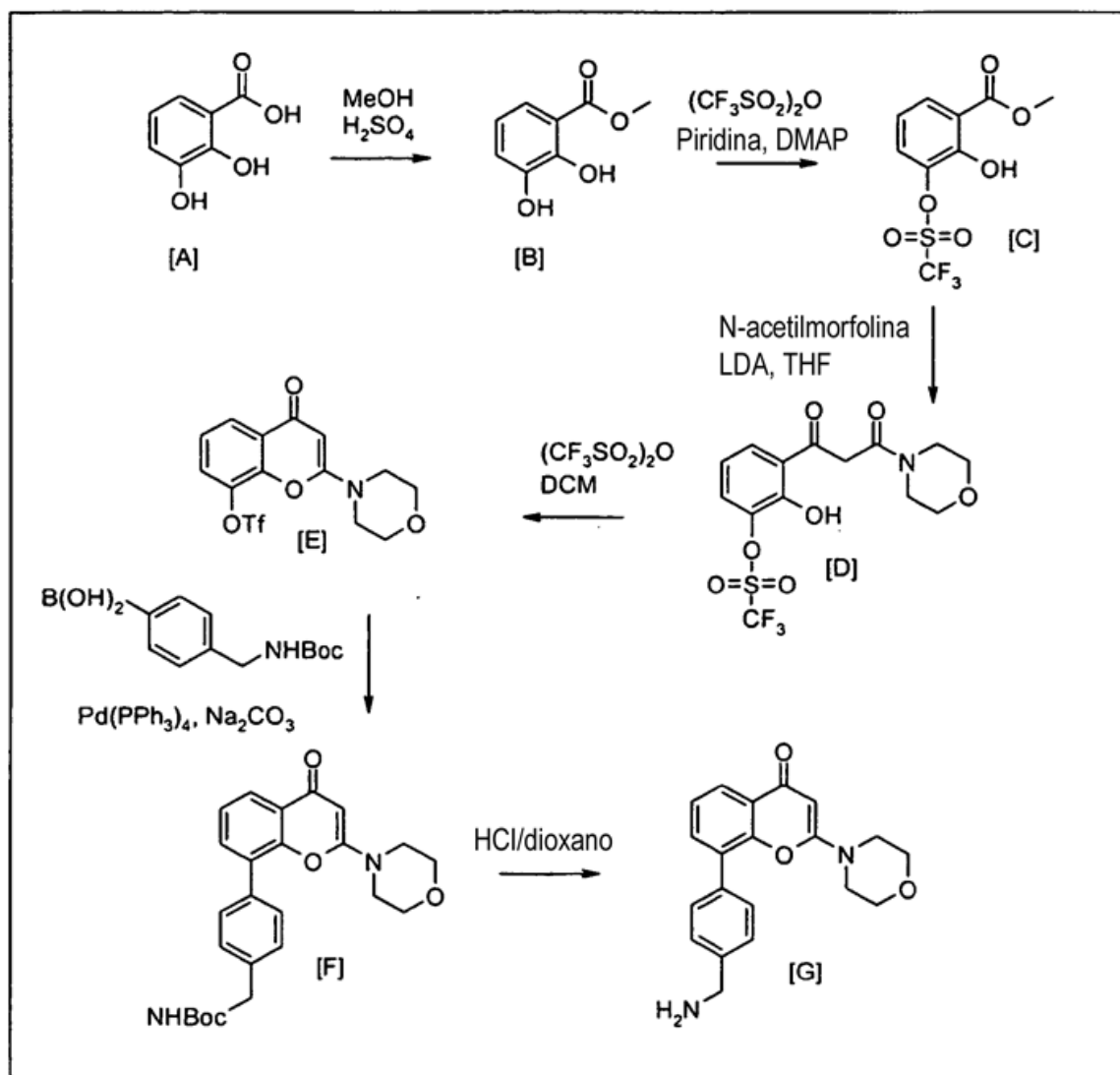


Figura 17

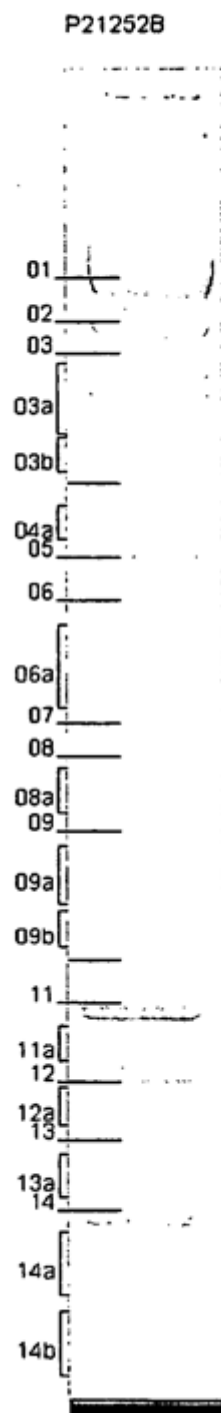


Figura 18

1	MGEHGLELAS	MIPALRELGS	ATPEEYNTVV	QKPRQILCQF	IDRILTDVNV
51	VAVELVKKTD	SQPTSVMLLD	FIQHIMKSSP	LMFVNVSGSH	EAKGSCIEFS
101	NWIIITRLLRI	<u>AATPSCHLLH</u>	<u>KKICEVICSL</u>	LFLFKSKSPA	IFGVLTKELL
151	QLFEDLVYLH	RRNVMGHAVE	WPVMSRFLS	QLDEHMGYLQ	SAPLQLMSMQ
201	NLEFIEVTLL	MVLTRIIAIV	FFRRQELLLW	QIGCVLLEYG	SPKIKSLAIS
251	FLTELFQLGG	LPAQPASTFF	SSFLELLKHL	VEMDTDQLKL	YEEPLSKLIK
301	TLFPFEAEAY	RNIEPVYLM	LLEKLCVMFE	DGVLMLKSD	LLKAALCHLL
351	QYFLKFVPAG	<u>YESALQVRKV</u>	YVRNICKALL	DVLGIEVDAE	YLLGPLYAAL
401	KMESMEIEE	IQCQTQQENL	SSNSDGISPK	RRRLSSSLNP	SKRAPKQTEE
451	<u>IKHVDMNQKS</u>	<u>ILWSALKQKA</u>	ESLQISLEYS	GLKNPVIEML	EGIAVVLQLT
501	ALCTVHCSHQ	NMNCRTFKDC	QHKSKKKPSV	VITWMSLDFY	TKVLKSCRSL
551	LESVQKLDLE	ATIDKVVKIY	DALIYMQVNS	SFEDHILEDL	CGMLSLPWIIY
601	SHSDDGCLKL	TTFAANLLTL	SCRISDSYSP	QAQSRCVFL	TLFPRRIFLE
651	WRTAVYNWAL	QSSHEVIRAS	CVSGFFILLQ	QQNSCNRVPK	ILIDKVKDDS
701	DIVKKEFASI	LGQLVCTLHG	MFYLTSSLTE	PFSEHGHVDL	FCRNLKATSQ
751	<u>HECSSSQLKA</u>	SVCKPFLFLL	KKKIPSPVKL	AFIDNLHHLC	KHLDFREDET
801	DVKAUVTLL	NLMEDPKDV	RVAFSGNIKH	ILESLSDEG	FIKELFVLRM
851	<u>KEAYTHAQIS</u>	<u>RNNELKDTLI</u>	LTTGDIGRAA	KGDLVPFALL	HLLHCLLSKS
901	ASVSGAAYTE	IRALVAAKSV	KLQSFFSQYK	KPICQFLVES	LHSSQMTALP
951	NTPCQNADVR	KQDVAHQREM	ALNTLSEIAN	VDFDPDLNRF	LTRTLQVLLP
1001	DLAAKASPAA	SALIRTLGKQ	LNVNRREILI	NNFKYIFSHL	VCSCSKDELE
1051	RALHYLKNET	EIELGSLLRQ	DFQGLHNELL	LRIGEHYQQV	FNGLSILASF
1101	ASSDDPYQGP	RDIISPELMA	DYLQPKLLGI	LAFFNMQLLS	SSVGIEDKKM
1151	ALNSLMSLMK	LMGPKHVSSV	RVKMMTTLRT	<u>GLRFKDDFPE</u>	<u>LCCRAWDCFV</u>
1201	RCLDHACLGS	LLSHVIVALL	PLIHQPKET	AAIFHYLIIE	NRDAVQDFLH
1251	EIYFLPDHPE	LKKIKAVLQE	YRKETSESTD	LQTTQLSMK	AIQHENVQVR
1301	<u>IHALTSLKET</u>	LYKNQEKLIK	YATDSETVEP	IISQLVTVLL	KGCQDANSQA
1351	RLLCGECLGE	LGAIIDPGRD	FSTTETQGD	FTFVTGVEDS	SFAYGLLMEL
1401	TRAYLAYADN	SRAQDSAAYA	IQELLSIYDC	REMETNGPGH	QLWRRFPPEHV
1451	REILEPHLNT	RYKSSQKSTD	WSGVKKPIYL	SKLGSNFAEW	SASWAGYLIT
1501	KVRHDLASKI	FTCCSIMMKH	DFKVTIYLLP	HILVYVLLGC	NQEDQQEVYA
1551	EIMAVLKHDD	QHTINTQDIA	SDLCQLSTQT	VFSMLDHLTQ	WARHKFQALK
1601	AEKCPHSSKN	RNKVDSMVST	VDYEDYQSVT	RFLDLIPQDT	LAVASFRSKA
1651	YTRAVMHFES	FITEKKQNIQ	EHLGFLQKLY	AAMHEPDGVA	GVS AIRKAEP
1701	SLKEQILEHE	SLGLLRDATA	CYDRAIQLEP	DQIIHYHGVV	KSMLGLGQLS
1751	TVITQVNGVH	ANRSEWTDL	NTYRVEAAWK	LSQWDLVENY	LAADGKSTTW
1801	SVRLGQLLLS	<u>AKKRITAFY</u>	DSLKLVRREQ	IVPLSAASFE	RGSYQRGYFY
1851	IVRLHMLCEL	EHSIKPLFQH	SPGDSSQEDS	LNWVARLEMT	QNSYRAKEPI
1901	LALRRALLSL	NKRDPDYNEMV	GECWLQSARV	ARKAGHHQTA	YNALLNAGES
1951	RLAELYVERA	KWLWSKGDVH	<u>QALIVLQKGV</u>	ELCFPENETP	PEGKNMLIHG
2001	RAMLLVGRFM	<u>EETANFESNA</u>	<u>IMKKYKDVTA</u>	CLPEWEDGHF	YLAKYYDKLM

Figura 18 - continuación

2051	PMVTDNKMEK	QGD LIRYIVL	HFGRSLQYGN	QFIYQSMPRM	LTWLWDYGTK
2101	AYEWEKAGRS	DRVQMRNDLG	KINKVITEHT	NYLAPYQFLT	AFSQLISRIC
2151	HSHDEVFVVL	MEIIAKVFLA	YPQQAMWMMT	AVSKSSYPMR	VNRCKEILNK
2201	AIHMKKSLEK	FVGDATRLTD	KLLELCNKPV	DGSSSTLSMS	THFKMLKKLV
2251	EEATFSEILI	PLQSVMIPTL	PSILGTHANH	ASHEPFPQHW	AYIAGFDDMV
2301	EILASLQKPK	KISLKGSDGK	FYIMMCKPKD	DLRKDCRLME	<u>FNSLINK</u> CLR
2351	KDAESRRREL	HIRTYAVIPL	NDECGIIEWV	NNTAGLRPIL	TKLYKEKGVY
2401	MTGKELRQCM	LPKSAALSEK	LKVFREFLLP	RHPPIFHEWF	LRTFPDPTSW
2451	YSSRSAYCRS	TAVMSMVGII	LGLGDRHGEN	ILFDSLGTGEC	VHVDNFNCLFN
2501	KGETFEVPEI	VPFRLTHNMV	NGMGPMGTEG	LFRRACEVTM	RLMRDQREPL
2551	MSVLKTFLHD	PLVEWSKPVK	GHSK <u>APLNET</u>	<u>GEVVNEKAKT</u>	HVLDIEQRLQ
2601	GVIKTRNRVT	GLPLSIEGHV	HYLIQEATDE	NLLCQMYLGW	TPYM

Figura 19

1	MSLVLNDDLI	CCRQLEHDRA	TERKKEVEKF	KRLIRDPETI	KHLDRHSDSK
51	QGKYLNWDAV	<u>FRFLQKYIQK</u>	<u>ETECRLRIAKP</u>	NVSASTQASR	QKKMQEISSL
101	VKYFIKCANR	RAPRLKCQEL	LNyimDTVkd	SSNGAIYGAD	CSNILLKDIL
151	SVRKYWCEIS	QQQWLELFSV	YFRlyLKPSQ	DVHRVLVARI	IHAVTKGCCS
201	QTDGLNSKFL	DFFSKAIQCA	RQEKSSSGLN	HILAALTIFL	KTlAVNFRIR
251	VCELGDEILP	TLLYIWTQHR	LNDSLKEVII	ELFQLQIYIH	HPKGAKTQEK
301	GAYESTKWRS	ILYNLYDLLV	NEISHIGSRG	KYSSGFRNIA	VKENLIELMA
351	DICHQVFNE	TRSLEISQSY	TTTQRESSDY	SVPCKRKKIE	LGWEVIKDHL
401	QKSQNDFDLV	PWLQIATQLI	SKYPASLPNC	ELSPLLMILS	QLLPQQRHGE
451	RTPYVLRCLT	EVALCQDKRS	NLESSQKSDL	LKLWNKIWCI	TFRGISSEQI
501	QAENFGLLGA	IIQGSLEVD	REFWKLFPGS	ACRPSCPAVC	CLTLALTTSI
551	VPGAVKMGIE	QNMCEVNRSF	SLKESIMKWL	LFYQLEGDLE	NSTEVPPILH
601	SNFPHLVLEK	ILVSLTMKNC	KAAMNFFQSV	PECEHHQKDK	EELSFSEVEE
651	LFLQTTFDKM	DFLTIVRECG	IEKHQSSIGF	SVHQNLKESL	DRCLLGLSEQ
701	LLNNYSSEIT	NSETLVRCRS	LLVGVLGCYC	YMGVIAEEEE	YKSELFQKAN
751	SLMQCAGESI	TLFKNKTNEE	FRIGSLRNMM	QLCTRCLSNC	TKKSPNKIAS
801	GFFLRLLTSK	LMNDIADICK	SLASFIKKPF	DRGEVESMED	DTNGNLMEVE
851	DQSSMNLFND	YPDSSVSDAN	EPGESQSTIG	AINPLAEEYL	SKQDLLFLDM
901	LKFLCLCVTT	AQTNTVSFRA	ADIRRKLLML	IDSSTLEPTK	SLHLHMYLML
951	LKELPGEEYP	LPMEDVLELL	KPLSNVCSLY	RRDQDVCKTI	LNHVLVHVKN
1001	<u>LGQSNMDS</u>	<u>EN</u>	<u>TRDAQGQFLT</u>	VIGAFWHLTK	ERKYIFSVM
1051	EADPYSKWAI	LNVMGKDFPV	NEVFTQFLAD	NHHQVRMLAA	ESINRLFQDT
1101	KGDSSRLKA	LPLKLQQTAF	ENAYLKAQEG	MREMSHAEN	PETLDEIYNR
1151	KSVLLTLIAV	VLSCSPICEK	QALFALCKSV	KENGLEPHLV	KKVLEKVSET
1201	FGYRRLEDFM	ASHLDYLVLE	WLNLDQTEYN	LSSFPPILLN	YTNIEDFYRS
1251	CYKVLIPHLV	IRSHFDEVKS	IANQIQEDWK	SLLTDCFPKI	LVNIPYFAY
1301	EGTRDSGMAQ	QRETATKVYD	MLKSENLLGK	QIDHLFISNL	PEIVVELLMT
1351	LHEPANSSAS	QSTDLCDFSG	DLDPAFNPPH	FPSHVIKATF	AYISNCHKTK
1401	<u>LKSILEILSK</u>	SPDSYQKILL	AICEQAAETN	NVYKKHRILK	IYHLFVSLLL
1451	KDIKSGLGGA	WAFVLRDVIY	TLIHYINQRP	SCIMDVSLRS	FSLCCDLLSQ
1501	VCQTAVTYCK	DALENHLHVI	VGTLIPLVYE	QVEVQKQVLD	LLKYLVIDNK
1551	DNENLYITIK	LLDPFPDHVV	FKDLRITQQK	IKYSRGPFSL	LEEINHFLSV
1601	SVYDALPLTR	LEGLKDLRRQ	LELHKDQMVD	IMRASQDNPQ	DGIMVKLVVN
1651	LLQLSKMAIN	HTGEKEVLEA	VGSCLGEGVP	IDFSTIAIQH	SKDASYTKAL
1701	KLFEDKELQW	TFIMLTYLNN	TLVEDCVKVR	<u>SAAVTCLKNI</u>	LATKTGHSFW
1751	EIYKMTTDP	<u>M</u>	<u>LAYLQPFRTS</u>	<u>RKKFLEVPRF</u>	DKENPFEGLD
1801	NHDIWIKTLT	CAFLDSGGTK	CEILQLLKPM	CEVKTDFCQT	VLPYLIHDIL
1851	LQDTNESWRN	LLSTHVQGFF	TSCLRHFSTQ	SRSTTPANLD	SESEHFFRCC
1901	LDKKSQRTML	AVVDYMRRQK	RPSSGTIFND	AFWLDLNYLE	VAKVAQSCAA
1951	HFTALLYAEI	YADKKSMDQ	EKRSLAFEEG	SQSTTISSLS	EKSKEETGIS
2001	LQDLLLEIYR	SIGEPDSLYG	CGGGKMLQPI	TRLRTEHEA	MWGKALVTYD

Figura 19 - continuación

2051	LETAIPSSTR	QAGIIQALQN	LGLCHILSVY	LKGLDYENKD	WCPELEELHY
2101	QAAWRNMQWD	HCTSVSKEVE	GTSYHESLYN	ALQSLRDREF	STFYESLKYA
2151	RVKEVEEMCK	RSLESVYSLY	PTLSRLQAIG	ELESIGELFS	RSVTHRQLSE
2201	VYIKWQKHSQ	LLKDSDFSFQ	EPIMALRTVI	LEILMEKEMD	NSQRECIKDI
2251	LTKHLVELSI	LARTFKNTQL	PERAIFQIKQ	YNSVSCGVSE	WQLEEAQVFW
2301	AKKEQSLALS	ILKQMIKKLD	ASCAANNPSL	KLTYTECLRV	CGNWLAETCL
2351	ENPAVIMQTY	LEKAVEVAGN	YDGESSDEL	NGKMK <u>AFLSL</u>	<u>ARFSDTQYQR</u>
2401	IENYMKSSFE	ENKQALLKRA	KEEVGLLREH	KIQTNRYTVK	VQRELELDEL
2451	ALRALKEDRK	RFLCKAVENY	INCLLSGEEH	DMWVFRLLCSL	WLENSGVSEV
2501	NGMMKRDGMK	IPTYKFLPLM	YQLAARMGTK	MMGGLGFHEV	LNNLISRISM
2551	DHPHHTLFII	LALANANRDE	FLTKPEVARR	SRITKNVPKQ	SSQLDEDRT
2601	AANRIICTIR	SRRPQMVRVS	EALCDAYIIL	ANLDATQWKT	QRKGINIPAD
2651	QPITKLKNLE	DVVVPTMEIK	VDHTGEYGNL	VTIQSFKAEF	RLAGGVNLPK
2701	IIDCVGSDGK	ERRQLVKGRD	DLRQDAVMQQ	VFQMCNTLLQ	RNTETRKRKL
2751	TICTYKVVPL	SQRSGVLEWC	TGTVPIGEFL	VNNEDGAHKR	YRPNDFSFAQ
2801	CQKMMMEVQK	KSFEKEYEVF	MDVCQNFQPV	FRYFCMEKFL	DPAIWFEKRL
2851	AYTRSVATSS	IVGYILGLGD	RHVQNILINE	QSAELVHIDL	GVAFEQGKIL
2901	PTPETVPFRL	TRDIVDGMGI	TGVEGVFRRC	CEKTMEVMRN	SQETLLTIVE
2951	VLLYDPLFDW	TMNPLKALYL	QQRPEDETEL	HPTLNADDQE	CKRNLSIDIDQ
3001	SFDKVAERVL	MRLQEKLKG	EEGTVLSVGG	QVNLLIQQAI	DPKNLSRLFP
3051	GWKAWV				

Figura 20

1	MLGTGPAAAT	TAATTSSNV	VLQQFASGLK	SRNEETRAKA	AKELQHYVTM
51	<u>ELREMSQEE</u>	<u>TRFYDQLNHH</u>	<u>IFELVSSSDA</u>	<u>NERKGGILAI</u>	<u>ASLIGVEGGN</u>
101	<u>ATRIGRFANY</u>	<u>LRNLLPSNDP</u>	<u>VVMEMASKAI</u>	<u>GRLAMAGDTF</u>	<u>TAEYVEFEVK</u>
151	<u>RALEWLGA</u>	<u>NEGRRHAAVL</u>	<u>VLRELAISVP</u>	<u>TFFFQQVQPF</u>	<u>FDNIFVAVWD</u>
201	<u>PKQAIREGAV</u>	<u>AALRACLILT</u>	<u>TQREPKEMQK</u>	<u>PQWYRHTFEE</u>	<u>AEKGFDETLA</u>
251	<u>KEKGMNRDDR</u>	<u>IHGALLILNE</u>	<u>LVRISMEGE</u>	<u>RLREEMEEIT</u>	<u>QQQLVHDKYC</u>
301	<u>KDLMGFGTKP</u>	<u>RHITPFTSFQ</u>	<u>AVQPQQSNAL</u>	<u>VGLLGYS</u>	<u>GLMGFGTSPS</u>
351	<u>PAKSTLVESR</u>	<u>CCRDLMEEKF</u>	<u>DQVCQWVLKC</u>	<u>RNSKNSLIQM</u>	<u>TILNLLPRLA</u>
401	<u>AFRPSAFTDT</u>	<u>OYLQDTMNHV</u>	<u>LSCVKKEKER</u>	<u>TAAFOALGLL</u>	<u>SVAVRSEFKV</u>
451	<u>YLPRVLDIIR</u>	<u>AALPPKDFAH</u>	<u>KRQKAMQVDA</u>	<u>TVFTCISMLA</u>	<u>RAMGPGIQQD</u>
501	<u>IKELLEPMLA</u>	<u>VGLSPALTAV</u>	<u>LYDLSRQIPQ</u>	<u>LKKDIQDGLL</u>	<u>KMLSLVLMHK</u>
551	<u>PLRHPGMPKG</u>	<u>LAHQLASPG</u>	<u>TTLPEASDVG</u>	<u>SITLALRTL</u>	<u>SFEFEGHSLT</u>
601	<u>QFVRHCADHF</u>	<u>LNSEHKEIRM</u>	<u>EAARTCSRL</u>	<u>TPSIHLISGH</u>	<u>AHVVSQTAVQ</u>
651	<u>VVADVLSKLL</u>	<u>VVGITDPDPD</u>	<u>IRYCVLASLD</u>	<u>ERFDAHLAQA</u>	<u>ENLQALFVAL</u>
701	<u>NDQVFEIREL</u>	<u>AICTVGR</u>	<u>LNSEHKEIRM</u>	<u>EAARTCSRL</u>	<u>TPSIHLISGH</u>
751	<u>EQSARMLGHL</u>	<u>VSNAPRLIRP</u>	<u>YMEPILKALI</u>	<u>LKLKDPDPDP</u>	<u>NPGVINNVLA</u>
801	<u>TIGELAQVSG</u>	<u>LEMWKVDEL</u>	<u>FIIIMDMLQD</u>	<u>SSLLAKRQVA</u>	<u>LWTLGQLVAS</u>
851	<u>TGYVVEPYRK</u>	<u>YPTLLEVLLN</u>	<u>FLKTEQNQGT</u>	<u>RREAIRVLGL</u>	<u>LGALDPYKHK</u>
901	<u>VNIGMIDQSR</u>	<u>DASAVSLSES</u>	<u>KSSQDSSDYS</u>	<u>TSEMLVNMGN</u>	<u>LPLDEFYP</u>
951	<u>SMVALMRIFR</u>	<u>DQSLSHHHTM</u>	<u>VVQAITFIFK</u>	<u>SLGLKCVQFL</u>	<u>PQVMPTFLNV</u>
1001	<u>IRVCDGAIRE</u>	<u>FLFQQLGMLV</u>	<u>SFVKSHIRPY</u>	<u>MDEIVTLMRE</u>	<u>FWVMNTSIQS</u>
1051	<u>TIILLIEQIV</u>	<u>VALGGEFKLY</u>	<u>LPQLIPHMLR</u>	<u>VFMHDNSPGR</u>	<u>IVSIKLLAAI</u>
1101	<u>QLFGANLDDY</u>	<u>LHLLLPPIVK</u>	<u>LFDAP</u>	<u>SRKAALETVD</u>	<u>RLTESLDFTD</u>
1151	<u>YASRIIHPIV</u>	<u>RTLDQSP</u>	<u>STAMDTLSSL</u>	<u>VFQLGKQYQI</u>	<u>FIPMVNKVLV</u>
1201	<u>RHRINHORYD</u>	<u>VLICRIVKGY</u>	<u>TLADEEEDPL</u>	<u>IYQHRMLRSG</u>	<u>QGDALASGPV</u>
1251	<u>ETGPMKKLHV</u>	<u>STINLQKATA</u>	<u>WGAARRVSKD</u>	<u>DWLEWLRRLS</u>	<u>LELLKDSSSP</u>
1301	<u>SLRSCWALAQ</u>	<u>AYNPMARDLF</u>	<u>NAAFVSCWSE</u>	<u>LNEDQQDELI</u>	<u>RSIELALTSQ</u>
1351	<u>DIAEVTQTLL</u>	<u>NLAEFMEHSD</u>	<u>KGPLPLRDDN</u>	<u>GIVLLGERAA</u>	<u>KCRAYAKALH</u>
1401	<u>YKELEFQKGP</u>	<u>TPAILESLIS</u>	<u>INNKLQOPEA</u>	<u>AAGVLEYAMK</u>	<u>HFGLEIQTAT</u>
1451	<u>WYEKLHEWED</u>	<u>ALVAYDKKMD</u>	<u>TNKDDPELML</u>	<u>GRMRCLEALG</u>	<u>EWGQLHQQCC</u>
1501	<u>EKWTLVND</u>	<u>QAKMARMAAA</u>	<u>AAWGLGQWDS</u>	<u>MEEYTCMIPR</u>	<u>DTHDGAFYRA</u>
1551	<u>VLALHQDLFS</u>	<u>LAQQCIDKAR</u>	<u>DLLDAELTAM</u>	<u>AGESYSRAYG</u>	<u>AMV</u>
1601	<u>LEEVIQYKLV</u>	<u>PERREIIRQI</u>	<u>WVERLQGCQR</u>	<u>IVEDWQKILM</u>	<u>VRSLVSPHE</u>
1651	<u>DMRTWLKYAS</u>	<u>LCGKSGRLAL</u>	<u>AHKT</u>	<u>VDPSRQLDHP</u>	<u>LPTVHPQVTY</u>
1701	<u>AYMKNMWKSA</u>	<u>RKIDAFQHM</u>	<u>HFVQTMQQA</u>	<u>QHA</u>	<u>HKQELHKLMA</u>
1751	<u>RCFLKLGEWQ</u>	<u>LNLOGINEST</u>	<u>IPKVLQYISA</u>	<u>ATEHDRSWYK</u>	<u>AWHAWAVMNF</u>
1801	<u>EAVLHYKHQN</u>	<u>QARDEKKKLR</u>	<u>HASGANITNA</u>	<u>TTAATTAATA</u>	<u>TTTASTE</u>
1851	<u>SESEAESTEN</u>	<u>SPTPSPLQKK</u>	<u>VTEDLSKTLL</u>	<u>MYTVPAVQGF</u>	<u>FRSISLSRGN</u>
1901	<u>NLQDTLRVLT</u>	<u>LWFDYGHWP</u>	<u>VNEALVEGVK</u>	<u>AIQIDTWLQV</u>	<u>IPQLIARIDT</u>
1951	<u>PRPLVGRLIH</u>	<u>QLLTDIGRYH</u>	<u>PQALIYPLTV</u>	<u>ASKSTTTARH</u>	<u>NAANKILKNM</u>
2001	<u>CEHSNTLVQQ</u>	<u>AMMVSEELIR</u>	<u>VAILWHEMWH</u>	<u>EGLEEASRLY</u>	<u>FGERNVKGMF</u>

Figura 20 - continuación

2051	<u>EVLEPLHAMM</u>	<u>ERGPQTLKET</u>	<u>SFNQAYGRDL</u>	<u>MEAQEWCRKY</u>	<u>MKSGNVKDLT</u>
2101	<u>QAWDLYYHVF</u>	<u>RRISKQLPQL</u>	<u>TSLELQYVSP</u>	<u>KLLMCRDLEL</u>	<u>AVPGTYDPNQ</u>
2151	<u>PIIRIQSIAP</u>	<u>SLQVITSKQR</u>	<u>PRKLTLMGSN</u>	<u>GHEFVFLKKG</u>	<u>HEDLRQDERV</u>
2201	<u>MQLFGLVNTL</u>	<u>LANDPTSLRK</u>	<u>NLSIQRYAVI</u>	<u>PLSTNSGLIG</u>	<u>WVPHCDTLHA</u>
2251	<u>LIRDYREKKK</u>	<u>ILLNIEHRIM</u>	<u>LRMAPDYDHL</u>	<u>TLMQKVEVFE</u>	<u>HAVNNTAGDD</u>
2301	<u>LAKLLWLKSP</u>	<u>SSEVWFDRRT</u>	<u>NYTRSLAVMS</u>	<u>MVGYILGLGD</u>	<u>RHPSNLMLDR</u>
2351	<u>LSGKILHIDF</u>	<u>GDCFEVAMTR</u>	<u>EKFPEKIPFR</u>	<u>LTRMLTNAME</u>	<u>VTGLDGNYRI</u>
2401	<u>TCHTVMEVLR</u>	<u>EHKDSVMAVL</u>	<u>EAFVYDPLLN</u>	<u>WRLMDTNTKG</u>	<u>NKRSRTRTDS</u>
2451	<u>YSAGQSVEIL</u>	<u>DGVELGEPAH</u>	<u>KKTGTTVPES</u>	<u>IHSFIGDGLV</u>	<u>KPEALNKKAI</u>
2501	<u>QIINRVRDKL</u>	<u>TGRDFSDDT</u>	<u>LDVPTQVELL</u>	<u>IKQATSHENL</u>	<u>CQCYIGWCPF</u>
2551	W				