

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 380**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2006 E 06763568 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1891446**

54 Título: **Procedimiento para la identificación de compuestos novedosos que interaccionan con enzimas**

30 Prioridad:

**14.06.2005 EP 05012722**

**25.08.2005 US 711399 P**

**14.03.2006 US 782170 P**

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

**11.07.2013**

73 Titular/es:

**CELLZOME AG (100.0%)**

**MEYERHOFSTRASSE 1**

**69117 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:

**DREWES, GERARD;**

**KUESTER, BERNHARD;**

**KRUSE, ULRICH;**

**HOPF, CARSTEN;**

**EBERHARD, DIRK;**

**BANTSCHIEFF, MARCUS;**

**READER, VALERIE;**

**MIDDLEMISS, DAVID y**

**RAIDA, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 412 380 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

Procedimiento para la identificación de compuestos novedosos que interaccionan con enzimas

La presente invención se refiere a procedimientos para la caracterización de enzimas usando ligandos de enzimas unidos a soportes sólidos.

- 5 La meta del descubrimiento de fármacos es desarrollar medicinas efectivas y seguras. Con el fin de lograr esta meta, la investigación farmacéutica tiene como objetivo identificar preferentemente fármacos de moléculas pequeñas dirigidos a dianas de fármacos que se sabe que son causantes de la enfermedad de interés.

10 Tradicionalmente, la mayoría de los fármacos de moléculas pequeñas están dirigidos contra proteínas receptoras (receptores de membrana celular tales como receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o receptores de hormonas nucleares), canales iónicos y enzimas. De los enzimas, son de interés particular por ejemplo proteasas, fosfodiesterasas y cinasas (revisión: Drews, 2000, "Drug discovery: a historical perspective", *Science* 287, 1960-1964).

15 Las proteasas se consideran como dianas de fármacos tratables como se demuestra por la gestión efectiva de SIDA con inhibidores de proteasas del VIH o por el uso de inhibidores de enzima convertora de angiotensina para tratar hipertensión. Para el tratamiento de cáncer están en desarrollo inhibidores de proteasas dirigidas contra metaloproteinasas de matriz y caspasas (Docherty y cols., 2003, "Proteases as drug targets", *Biochemical Society Symposia* 70, 147-161).

20 Las fosfodiesterasas (PDE) comprenden una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de AMPc o GMPc y están implicadas en diversas enfermedades. El inhibidor de PDE5 sildenafil (Viagra) proporciona un tratamiento efectivo para la disfunción eréctil. Actualmente los inhibidores de PDE4 (por ejemplo cilomast y roflumast) están en pruebas clínicas como productos terapéuticos anti-inflamatorios. Un desafío mayor en este campo es el desarrollo de inhibidores específicos de isotipo PDE con el fin de evitar reactividad cruzada que es responsable de efectos secundarios (Card y cols., 2004, "Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases", *Structure* 12, 2233-2247).

25 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.

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional común de proteínas y afecta la estructura de proteínas y funciona de numerosas maneras.

30 Una clase de cinasas que ha llegado a ser un foco reciente de descubrimiento de fármacos comprende las proteína cinasas debido a que estarán mostrando jugar papeles importantes en la iniciación y progresión de tumores por desregulación de rutas de transducción de señales en cáncer de pulmón; sobreexpresión del receptor de ErbB2/Her-2 en cáncer de mama; proteínas de fusión BCR-ABL en leucemia; revisión: Blume-Jensen y Hunter, 2001, "Oncogenic kinase signaling", *Nature* 411, 355-365).

35 El complemento de proteína cinasas codificadas en el genoma humano comprende 518 miembros de familia (quinoma) que pueden agruparse en varias subfamilias de acuerdo con la similitud de secuencias (revisión: Manning y cols., 2002, *The Protein Kinase Complement of the Human Genome*, *Science* 298, 1912-1934). En cualquier célula o tejido dado solo se expresa un subgrupo de quinoma. Las cinasas transfieren grupos fosfato desde ATP hasta moléculas sustrato e influyen por lo tanto la estabilidad, la actividad y la función de sus dianas. El bolsillo de unión a ATP de diferentes cinasas es estructuralmente similar y por lo tanto se considera difícil desarrollar inhibidores competitivos de ATP selectivos.

40 La familia de cinasas es una familia de enzimas muy grande (comparada con otras clases de enzimas relevantes como objetivos de fármacos, por ejemplo fosfodiesterasas) proporcionando múltiples oportunidades para descubrimiento de fármacos pero también retos únicos (familia de gran tamaño; similitud estructural de los bolsillos de unión a ATP, concentración de ATP intracelular alta) (revisión: Cohen, P., 2002, *Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century?* *Nature Reviews Drug Discovery*, volumen 1, 309-315).

45 Otra clase de cinasas de interés son las cinasas de lípidos. Las cinasas de lípidos catalizan la transferencia de grupos gamma-fosfatos a partir de nucleósido trifosfatos a sustratos lipídicos.

50 Se sabe que las cinasas de lípidos tales como los miembros de la familia de las fosfoinosítidos 3-cinasas (PI3K) son moduladores de la respuesta celular a factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores y están implicados en cáncer, diabetes y otras enfermedades (Fruman y cols., 1998. *Phosphoinositide kinases*. *Annual Review Biochemistry* 67, 481-507; Cantley, L.C., 2002, *Science* 296, 1655-1657).

Un prerrequisito para la identificación de compuestos que interaccionan con proteínas, por ejemplo enzimas, es la provisión de preparaciones de proteínas que contienen tantas proteínas como sea posible de una clase en una gran pureza. Especialmente, la provisión de muchas proteínas de una clase (por ejemplo cinasas) es importante dado que esto permite el rastreo de compuestos potencialmente interesantes farmacéuticamente contra muchos miembros de la

familia de las proteínas (así llamado identificación por acierto). Otros usos factibles de tales preparaciones de proteínas incluyen la realización de pruebas de compuestos químicamente optimizados (optimización de compuestos), la determinación de la selectividad de un compuesto dado (revelación del perfil completo de selectividad) así como la confirmación del modo de acción de un compuesto dado.

5 En la técnica, se han propuesto varias estrategias para valorar este tema.

Una aproximación para enriquecer las proteínas de unión a ATP tales como cinasas y otras proteínas de unión a nucleótidos a partir de extractos celulares se basa en ATP inmovilizado como reactivo de afinidad, es decir en el uso de un ligando que une potencialmente todas las enzimas de unión a ATP. En este caso el ATP está inmovilizado covalentemente acoplado el grupo gamma-fosfato por un engarce a una resina (Graves y cols., 2002, Molecular Pharmacology 62, N.º: 6, 1364-1372; documento US 5536822). Este enfoque se amplió adicionalmente para acoplar compuestos simples de bibliotecas de compuestos combinatorias (documento WO00/63694).

Una desventaja del ATP inmovilizado es que la afinidad por cinasas es más bien baja conduciendo a captura de cinasas ineficaz o a elución rápida debido a velocidades de disociación altas. Otra desventaja es que las cinasas no se capturan preferencialmente, sino que también se capturan otras clases de proteínas de unión a ATP que pueden expresarse a niveles mucho más altos en la célula. Las proteínas de unión a ATP más abundantes pueden causar captura ineficaz debido a competición o pueden conducir a problemas durante el análisis por espectrometría de masas de las proteínas unidas si la profundidad analítica no es suficiente.

Otro enfoque descrito en la técnica es el uso de ligandos específicos para una enzima individual, a saber inhibidores de cinasas de afinidad alta e inhibidores de cinasas altamente selectivos o derivados cercanos (por ejemplo fármacos optimizados). Estos se usan para enriquecer cinasas a partir de lisados celulares y el mismo compuesto no modificado se usa para elución específica con el fin de identificar el objetivo u objetivos de fármacos celulares (Godl y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 15434-15439; documento WO 2004/013633). Esta aproximación es solamente exitosa si la relación estructura-función (SAR) no se destruye por la modificación química del fármaco pero falla si la SAR se altera. Además, es difícil identificar objetivos que median efectos secundarios indeseados debido a que la SAR de la diana de fármaco relacionado puede ser diferente y la última SAR usualmente no se conoce.

El rastreo intensivo de una biblioteca de química combinatoria de purinas 2,6,9-trisustituidas ha conducido a la identificación de un inhibidor de CDK potente y selectivo llamado purvalanol (Knockaert y cols., 2002, Oncogene, vol. 21, 6413-6424). Aquí, los extractos celulares se rastrearon en busca de proteínas que interactuasen con purvalanol por cromatografía de afinidad en presencia de compuestos inmovilizados.

30 Se describe adicionalmente en la técnica la identificación de proteínas objetivo novedosas de la ruta de señalización de GMP cíclica llevando a cabo ensayos de unión de competición en lisados de tejido en los que el ligando GMPc inmovilizado está incubado con extractos celulares en la ausencia y presencia de cantidades en exceso de ligandos libres (Kim y Park, 2003, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, volumen 36, 299-304).

Otra estrategia es la expresión in vitro de enzimas de una clase dada, por ejemplo cinasas. Fabian y colegas (Fabian y cols., 2005, Nature Biotechnology 23 (3), 329-336; documento WO 03084981) describen un procedimiento de realización de perfiles de cinasas que no recurre a cinasas endógenas contenidas en lisados celulares sino que usa cinasas que se presentan en el bacteriófago T7. Las cinasas (o dominios de cinasas) usadas en este ensayo son proteínas de fusión que se marcan con el fin de permitir expresión, purificación y detección. En el ensayo de unión de competición estas cinasas marcadas con fago están unidas a un inhibidor de cinasas inmovilizado, tratadas con un compuesto de prueba no inmovilizado y las cinasas marcadas unidas se cuantifican por PCR usando el ADN de fago como una plantilla. Una desventaja de este procedimiento es que las cinasas necesitan clonarse y solamente una fracción de las cinasas marcadas con fago están plegadas en el estado nativo correcto. Además, tales preparaciones de proteínas no reflejan en absoluto la situación natural en una célula.

Otra aproximación usa sondas dirigidas a sitio activo (así llamadas sondas basadas en actividad) que forman enlaces covalentes con enzimas diana. Este procedimiento se usa para realizar un perfil de la expresión de serina hidrolasas con sondas altamente selectivas (Liu y cols., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 14694-14699, WO 01/77668) y se expande adicionalmente a otras familias enzimáticas usando sondas más promiscuas que consisten en bibliotecas de sondas de ésteres de sulfonato fluorescente basadas en actividad no dirigida marcadas con rodamina y marcadas con biotina (Adam y cols., 2002, Nature Biotechnology 20, 805-809, documento WO 01/77684, documento WO 03/047509). Sin embargo, permanece sin aclarar qué propiedades estructurales y/o catalíticas están compartidas por estas enzimas marcadas con sulfonato. Otra limitación es la dificultad para distinguir interacciones específicas con enzimas e interacciones no específicas causadas por la reactividad intrínseca de las sondas.

Finalmente, se intentó enriquecer las proteínas biofosforiladas en tirosinas con anticuerpos específicos de tirosina (Blogoev y cols., 2004, Nature Biotechnology 9, 1139-1145). Blogoev y colegas describen un procedimiento que se puede usar para estudiar el efecto de compuestos tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF) en rutas de transducción de señales dependientes de fosfotirosina. Después de la lisis de las células estimuladas con EGF las proteínas que contienen fosfotirosina están enriquecidas por inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra fosfotirosina. En la segunda etapa estas proteínas enriquecidas se analizan e identifican por análisis espectrométrico

de masas. Una limitación principal de esta aproximación es que solamente pueden capturarse proteínas fosforiladas con tirosina.

5 En vista de esto, hay una necesidad de procedimientos mejorados para la caracterización de aquellas enzimas de una clase dada que se expresan en una célula. Además, hay una necesidad de procedimientos mejorados para la identificación de enzimas que son compañeras de unión de un compuesto dado.

10 La presente invención satisface estas necesidades. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que el uso de un ligando de enzima de amplio espectro inmovilizada en un soporte sólido permite el aislamiento efectivo de enzimas fuera de una preparación proteica, preferentemente un lisado celular. Después de este aislamiento, se pueden aplicar los procedimientos efectivos bien para la caracterización de la enzima unida al ligando enzimático de amplio espectro o para la identificación de interacciones de enzima y compuesto. La enzima se identifica preferentemente por espectrometría de masas. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos efectivos bien para la caracterización de las enzimas o bien para la identificación de los compañeros de unión de un compuesto dado.

15 En un primer aspecto, la presente invención describe un procedimiento para la caracterización de al menos una enzima, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una preparación proteica que contiene la enzima, preferentemente recolectando al menos una célula que contiene la enzima y lisando la célula,
- 20 b) poner en contacto la preparación proteica en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos un ligando de enzima de amplio espectro en un soporte sólido, en condiciones que permiten la unión de la enzima a dicho ligando de enzima de amplio espectro,
- c) eluir la enzima y
- d) caracterizar la enzima eluida por espectrometría de masas.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la caracterización de al menos una enzima, que comprende las etapas de:

- 25 a) proporcionar dos alícuotas que comprenden cada una al menos una célula que contiene la enzima,
- b) incubar una alícuota con un compuesto dado diferente de los ligandos,
- c) recolectar las células,
- d) lisar las células,
- 30 e) poner en contacto los lisados celulares en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos de enzimas de amplio espectro diferentes, en los que los ligandos están inmovilizados en un soporte sólido en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro,
- f) eluir la enzima o las enzimas y
- g) caracterizar la enzima eluida o las enzimas eluidas por espectrometría de masas cuantitativa.

35 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, la invención proporciona un procedimiento para la caracterización de al menos una enzima, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar dos alícuotas de una preparación proteica que contiene la enzima, preferentemente recogiendo al menos una célula que contiene la enzima y lisando la célula,
- 40 b) poner en contacto una alícuota en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos de enzimas de amplio espectro diferentes, en los que los ligandos están inmovilizados en soporte sólido en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro,
- c) poner en contacto la otra alícuota en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos enzimáticos de amplio espectro diferentes, en los que los ligandos están inmovilizados en un soporte sólido en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro y con un compuesto dado diferente de los ligandos,
- 45 d) eluir la enzima o las enzimas y
- e) caracterizar la enzima eluida o las enzimas eluidas por espectrometría de masas cuantitativa,

en el que una detección reducida de la enzima en la alícuota incubada con el compuesto indica que la enzima es una diana directa del compuesto.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se describe un procedimiento para la caracterización de un complejo compuesto-enzima, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una preparación que contiene la enzima, preferentemente recogiendo al menos una célula que contiene la enzima y lisando la célula,
- 5 b) poner en contacto la preparación proteica en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos un ligando de enzima de amplio espectro inmovilizado en un soporte sólido en condiciones que permiten la unión de la enzima a dicho ligando de enzima de amplio espectro,
- c) poner en contacto las enzimas unidas con un compuesto para liberar al menos una enzima unida y
- d) caracterizar la enzima liberada o las enzimas liberadas por espectrometría de masas, o
- 10 e) eluir la enzima o las enzimas a partir del ligando y caracterizar la enzima o las enzimas por espectrometría de masas, identificando de este modo uno o más compañeros de unión del compuesto.

Los enfoques como se mencionan anteriormente, especialmente el procedimiento de acuerdo con el 4º aspecto, tienen las siguientes ventajas:

- No es necesaria ninguna expresión de enzimas in vitro, sino que se usan enzimas endógenas a partir de lisados celulares.
- 15 - Sorprendentemente, se encontró que los ligandos de cinasa de especificidad amplia capturan cinasas muy eficientemente.
- Los compuestos de prueba no necesitan unirse ni inmovilizarse (procedimiento de ensayo libre de etiquetas).

La unión competitiva o la elución competitiva son posibles con cualquier compuesto de interés (no modificado, no inmovilizado).

- No se necesita ningún sustrato enzimático (como en ensayos enzimáticos bioquímicos).
- Es posible caracterizar el efecto in vivo del compuesto en una ruta de transducción de señales (véase 2º aspecto).
- Es posible la identificación de dianas directas e indirectas.

A lo largo de la invención, el término "enzima" incluye también cada proteína o péptido en la célula que es capaz de unir un ligando tal como vehículos, canales iónicos y proteínas que interactúan con enzimas tales como proteínas adaptadoras, que contienen dominios de interacción peptídica (por ejemplo dominios SH2, SH3 y PDZ).

Preferentemente, sin embargo, el término "enzima" se interpreta en su modo usual como que es un biocatalizador en una célula.

A lo largo de la invención, el término "ligando enzimático de espectro amplio" se refiere a un ligando que es capaz de unir algunas, pero no todas las enzimas presentes en una preparación proteica.

La presente invención preferentemente se refiere a procedimientos para la caracterización de enzimas o para la identificación de compañeros de unión a un compuesto dado, en el que la enzima o los compañeros de unión están incluidos en un lisado celular. Sin embargo, los procedimientos de la presente invención se pueden llevar a cabo también con cualquier preparación proteica como un material de partida, en la medida en que la(s) proteína(s) está(n) solubilizada(s) en la preparación. Los ejemplos incluyen una mezcla líquida de varias proteínas, un lisado celular parcial que no contiene todas las proteínas presentes en la célula original o una combinación de diversos lisados celulares.

Los lisados celulares parciales se pueden obtener aislando primero orgánulos celulares (por ejemplo núcleo, mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi, etc.) y después se pueden preparar preparaciones de proteínas derivadas de estos orgánulos. Se conocen en la técnica procedimientos 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).

Además, las muestras proteicas se pueden preparar por fraccionamiento de extractos celulares enriqueciendo de este modo tipos específicos de proteínas tales como proteínas citoplásmicas o proteínas de membrana (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).

Además se pueden usar las preparaciones proteicas a partir de fluidos corporales (por ejemplo sangre, fluido cerebroespinal, fluido peritoneal y orina).

A lo largo de la invención, el término "soporte sólido" se refiere a cada soporte insoluble que es capaz de inmovilizar

dicho ligando enzimático de amplio espectro en su superficie.

- 5 El procedimiento de la invención de acuerdo con el segundo aspecto comprende las etapas de una provisión de dos alícuotas comprendiendo cada una al menos una célula que contiene la enzima e incubando una alícuota con un compuesto dado. En una realización preferida, la al menos una célula es parte del sistema de cultivos celulares que se divide en al menos dos alícuotas. Una alícuota de células se incuba también con el compuesto dado. Se conocen en la técnica procedimientos para la incubación de sistemas de cultivo celular con compuestos (Giuliano y cols., 2004, "High-content screening with siRNA optimizes a cell biological approach to drug discovery: defining the role of p53 activation in the cellular response to anticancer drugs". *Journal of Biomolecular Screening* 9 (7), 557-568).
- 10 Sin embargo, se incluye también dentro de la presente invención que al menos una célula de cada alícuota es parte de un sistema in vivo, por ejemplo un sistema de ratón o un sistema de vertebrado inferior.
- Por ejemplo se pueden usar los lisados de embriones completos derivados de fases de desarrollo definidas o de fases adultas de organismos modelo tales como *C. elegans*. Además, los órganos completos tales como corazón diseccionado de ratones pueden ser la fuente de preparaciones proteicas. Estos órganos pueden perfundirse también in vitro y así tratarse con el compuesto de prueba o con el fármaco de interés.
- 15 Todos los procedimientos de la presente invención incluyen al menos en una realización preferida las etapas de recoger al menos una célula que contiene la enzima y de lisar la célula.
- En una realización preferida, la célula es parte de un sistema de cultivo celular y los procedimientos para la recogida de una célula aparte de un sistema de cultivo celular se conocen en la técnica (bibliografía supra).
- 20 La elección de la célula dependerá principalmente de la clase de enzimas supuesta a analizarse, dado ello ha de asegurarse que la clase de enzima está presente de forma principal en la célula de elección. Con el fin de determinar si una célula dada es un sistema de partida adecuado para los procedimientos de la invención, procedimientos tales como prueba de bandas de Western, procedimientos de detección de ácidos nucleicos basados en PCR, prueba de bandas de Northern y procedimientos de microensayos de ADN ("chips de ADN") podrían ser adecuados con el fin de determinar si una clase dada de enzimas está presente en la célula.
- 25 La elección de la célula estará influenciada por el propósito del estudio. Si el objetivo in vivo para un fármaco dado necesita identificarse después se seleccionarán células o tejidos en los que ocurre el efecto terapéutico deseado (por ejemplo tejido de cáncer de mama para fármacos anticáncer). Por contraste, para la dilucidación de las dianas proteicas que median efectos secundarios indeseados se analizarán la célula o el tejido en los que el efecto secundario se observa (por ejemplo tejido cerebral para efectos secundarios del SNC).
- 30 Además, se prevé en la presente invención que la célula que contiene la enzima se pueda obtener a partir de un organismo, por ejemplo por biopsia. Los procedimientos correspondientes se conocen en la técnica. Por ejemplo, una biopsia es un procedimiento diagnóstico usado para obtener una cantidad pequeña de tejido, que puede examinarse después microscópicamente o con procedimientos bioquímicos. Las biopsias son importantes para diagnosticar, clasificar y manipular una enfermedad, pero también para evaluar y someter a seguimiento el tratamiento con fármacos. Las biopsias de cáncer de mama se preformaron anteriormente como procedimientos quirúrgicos, pero hoy en día se prefieren biopsias de aguja (Oyama y cols., 2004, *Breast Cancer* 11 (4), 339-342).
- 35 Los procedimientos de la invención descritos permiten realizar un perfil de las muestras de tejido para la presencia de las clases de enzimas. Por ejemplo, las enzimas mutadas causantes de la enfermedad se pueden identificar (por ejemplo mutaciones puntuales que activan cinasas oncogénicas). Además, pueden dilucidarse las enzimas mutadas que surgen durante el tratamiento y son responsables de la resistencia al tratamiento (por ejemplo las mutaciones de receptor EGF que causan resistencia a fármacos anticáncer).
- 40 La biopsia de hígado se usa por ejemplo para diagnosticar la causa de enfermedad hepática crónica que da como resultado un hígado agrandado o un hígado anormal causado por actividades enzimáticas hepáticas elevadas (Rocken y cols., 2001, *Liver* 21 (6), 391-396).
- 45 Está abarcado dentro de la presente invención que por la recogida de al menos una célula se lleva a cabo la lisis simultáneamente). Sin embargo, se prefiere igualmente que la célula se recoja primero y se lise aparte después.
- Los procedimientos para la lisis de las células se conocen en la técnica (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 de texto impreso: 0471328456; ISBN en Internet: 0471457817).
- 50 La lisis de diferentes tipos de células y tejidos se puede lograr por homogeneizadores (por ejemplo homogenizador de Potter), desintegradores ultrasónicos, lisis enzimática, detergentes (por ejemplo NP-40, Tritón X-100, CHAPS, SDS), choque osmótico, congelación y descongelación, o por una combinación de estos procedimientos.
- Además, todos los procedimientos de la invención contienen la etapa de poner en contacto la preparación celular o el lisado celular en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos enzimáticos de amplio espectro diferentes inmovilizados en un soporte sólido en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos
- 55

enzimáticos de amplio espectro.

El contacto en condiciones fisiológicas esenciales tiene la ventaja de que las interacciones entre el ligando, la preparación celular (es decir la enzima a caracterizarse) y opcionalmente el compuesto reflejan tanto como es posible las condiciones naturales. "Condiciones esencialmente fisiológicas" son *inter alia* aquellas condiciones que están presentes en el material de muestra no procesado, original. Incluyen la concentración de proteínas fisiológica, el pH, la concentración salina, la capacidad tamponante y las modificaciones postraduccionales de las proteínas implicadas. El término "condiciones fisiológicas esenciales" no requiere condiciones idénticas a aquellas en el organismo vivo original, a partir del que se deriva la muestra, sino esencialmente condiciones similares a las de las células o condiciones cercanas a las condiciones celulares. La persona experta en la técnica se dará cuenta, por supuesto, de que pueden surgir ciertas restricciones debido al diseño experimental que conducirán eventualmente a condiciones menos similares a las de las células. Por ejemplo, la disrupción eventualmente necesaria de las paredes celulares o de las membranas celulares cuando se toma y se procesa una muestra a partir de un organismo vivo requiere condiciones que no son idénticas a las condiciones fisiológicas halladas en el organismo. Variaciones adecuadas de condiciones fisiológicas para poner en práctica los procedimientos de la invención serán patentes para aquellos expertos en la técnica y están abarcadas por el término "condiciones fisiológicas esenciales" como se usa en el presente documento. En resumen, se entenderá que el término "condiciones esencialmente fisiológicas" se refiere a afecciones cercanas a condiciones fisiológicas, como por ejemplo se encuentran en las células naturales, pero no requieren necesariamente que estas condiciones sean idénticas.

Preferentemente, "condiciones esencialmente fisiológicas" pueden comprender NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-45 °C y catión divalente 0,001-10 mM (por ejemplo Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>); más preferentemente aproximadamente 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). Un detergente no iónico (Tween, NP- 40, Tritón-X100) puede estar presente a menudo usualmente a aproximadamente 0,001 al 2 %, típicamente 0,05-0,2 % (volumen/volumen). Para guía general, 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 y/o quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos.

Preferentemente, "condiciones esencialmente fisiológicas" quieren decir un pH desde 6,5 a 7,5, preferentemente desde 7,0 hasta 7,5, y/o una concentración de tampón desde 10 hasta 50 mM, preferentemente desde 25 hasta 50 mM, y/o una concentración de sales monovalentes (por ejemplo Na o K) desde 120 hasta 170 mM, preferentemente 150 mM. Las sales divalentes (por ejemplo Mg o Ca) pueden estar presentes adicionalmente a una concentración desde 1 hasta 5 mM, preferentemente 1 a 2 mM, en los que más preferentemente el tampón está seleccionado del grupo que consiste en Tris-HCl o HEPES.

En el contexto de la presente invención, el término "en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro" incluye todas las condiciones en las que tal unión es posible. Esto incluye la posibilidad de tener el soporte sólido en una fase inmovilizada y de verter el lisado en ella. En otra realización preferida, se incluye también que el soporte sólido esté en una forma particulada y se mezcle con el lisado celular.

En una realización preferida, la unión entre ligando y enzima es una unión no covalente, reversible, por ejemplo por medio de puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas o una combinación de los mismos.

Adicionalmente, los procedimientos de la invención incluyen la etapa de eluir la enzima o enzimas a partir de los ligandos inmovilizados en el soporte sólido.

Tales procedimientos se conocen principalmente en la técnica y dependen de la naturaleza de la interacción enzimática de ligando. Principalmente, cambiar la fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura o incubación con detergentes son procedimientos adecuados para disociar las enzimas objetivo a partir del ligando inmovilizado. La aplicación de un tampón de elución puede disociar compañeros de unión por extremos de valor de pH (pH alto o bajo; por ejemplo bajando pH usando citrato 0,1 M, pH 2-3), cambio de fuerza iónica (por ejemplo concentración salina alta usando NaI, KI, MgCl<sub>2</sub>, o KCl), agentes reductores de polaridad que alteran interacciones hidrófobas (por ejemplo dioxano o etilenglicol), o agentes desnaturizantes (sales caotrópicas o detergentes caotrópicos tales como dodecilsulfato de sodio, SDS; revisión: Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography. Mol. Biotechnol. 20 (1), 41-47).

Con estos procedimientos más bien no específicos la mayoría de todas las proteínas unidas se liberarán y después necesitarán ser analizadas por espectrometría de masas (o alternativamente por detección con anticuerpos, véase más adelante).

El procedimiento de acuerdo con el 4º aspecto incluye adicionalmente la etapa de poner en contacto las enzimas unidas con un compuesto para liberar al menos una enzima unida. Esta puesta en contacto tiene lugar también preferentemente en condiciones esencialmente fisiológicas.

Una ventaja de usar un compuesto de interés para elución en vez de los reactivos no específicos descritos anteriormente es que no todas las proteínas unidas se liberan sino solamente una subfracción, preferentemente la clase de enzimas de interés. Consecuentemente se necesitan menos proteínas para identificarse por espectrometría de masas dando como resultado análisis más rápido y mayor profundidad analítica (sensibilidad) para la clase de

enzimas de interés.

La persona experta apreciará que entre las etapas individuales de los procedimientos de la invención, pueden ser necesarias etapas de lavado. Tal lavado es parte del conocimiento de la persona experta en la técnica. El lavado sirve para retirar componentes no unidos del lisado celular del soporte sólido. Se pueden minimizar interacciones de unión no específicas (por ejemplo iónicas simples) añadiendo niveles bajos de detergente o por ajustes moderados a concentraciones salinas en el tampón de lavado.

Después de la elución o puesta en contacto, en algunos casos el soporte sólido tiene preferentemente que separarse del material liberado. Los procedimientos 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 flujo de movimiento continuo de columna. En caso de que el material de soporte se mezcle con los componentes del lisado (así llamado procedimiento en régimen estacionario) puede ser necesaria una etapa de separación adicional tal como centrifugación suave y el material liberado se recoge como sobrenadante. Alternativamente se pueden usar perlas magnéticas como soporte sólido de tal forma que las perlas se puedan eliminar de la muestra usando un dispositivo magnético.

De acuerdo con la presente invención, la enzima o enzimas eluida(s) o compañeros de unión coeluidos (véase más adelante) así como las enzimas liberadas de acuerdo con el procedimiento del cuarto aspecto están caracterizadas preferentemente por espectrometría de masas. Alternativamente, a lo largo de la invención también es posible llevar a cabo esta caracterización con anticuerpos específicos dirigidos contra la enzima respectiva o contra el compañero de unión coeluido.

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

Como una alternativa al análisis de espectrometría de masas, la enzima o enzimas eluida(s) (incluyendo compañeros de unión coeluidos, por ejemplo subunidades enzimáticas o proteínas de armazón), se pueden detectar usando anticuerpos específicos dirigidos contra una proteína de interés.

Además, en otra realización preferida, una vez la identidad de la enzima o enzimas eluida(s) se ha establecido por análisis de espectrometría de masas, cada enzima de interés puede detectarse con anticuerpos específicos dirigidos contra esta enzima.

Los ensayos basados en anticuerpos adecuados incluyen pero no se limitan a pruebas de bandas de Western, ensayos de ELISA, ensayos de ELISA en sándwich y disposiciones de anticuerpos o una combinación de los mismos. El establecimiento de tales ensayos se conocen 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 y cols., Wiley, Nueva York, 1999).

Se pueden llevar a cabo ensayos múltiples usando varios anticuerpos en paralelo, por ejemplo dirigido contra muchos miembros de una familia de enzimas (Pelch y cols., *Kinetworks Protein Kinase Multiblot analysis*, capítulo 8, páginas 99-112 en: *Cancer Cell Signalling. Methods and Protocols*. Editor: David M. Terrian. Humana Press, Totowa, EE.UU., 2002).

Estos ensayos pueden configurarse no solamente en cierto modo para detectar y cuantificar una enzima de interés, sino también para analizar patrones de modificación postraduccional tales como fosforilación. Por ejemplo, el estado de activación de una cinasa se puede determinar probando su estado de fosforilación con anticuerpos anti-fosfotirosina, anti-fosfoserina o anti-fosfotreonina específicos. Se conoce en la técnica como seleccionar y usar tales antifosfo-anticuerpos (Zhang y cols., 2002, *Journal of Biological Chemistry* 277, 43648-43658).

De acuerdo con una realización preferida del procedimiento de la invención de acuerdo con el 2º aspecto, caracterizando la enzima, se determina si la administración del compuesto da como resultado un estado de expresión o activación diferencial de la enzima. Por lo tanto, por administración del compuesto, bien se puede cambiar la expresión de la enzima o bien se puede cambiar el estado de activación de la enzima.

En este contexto, un cambio en la expresión de la enzima puede preferentemente querer decir que se produce en la célula bien más o bien menos enzima.

Por cambio del estado de activación, se quiere decir preferentemente que bien la enzima es más activa después de la administración del compuesto o bien es menos activa después de la administración del compuesto. Ello puede significar también que la afinidad de la enzima por el ligando inmovilizado se incrementa o decrece (por ejemplo cambio del estado de activación de una cinasa por fosforilación por medio de una cinasa corriente arriba; o unión del compuesto a un extremo regulador alostérico de la enzima y de este modo alteración del bolsillo de unión a ATP de una enzima de unión a ATP).

En el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto, la preparación proteica se incuba, preferentemente en



condiciones esencialmente fisiológicas, con un compuesto según se define más adelante. En consecuencia, solamente las enzimas no unidas al compuesto están subsiguientemente unidas al ligando, eluidas y caracterizadas.

5 De acuerdo con una realización preferida del procedimiento de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, en la etapa c) la alícuota se pone en contacto, preferentemente en condiciones esencialmente fisiológicas, con el compuesto antes de la incubación con el ligando. En consecuencia, solamente las enzimas no unidas al compuesto están subsiguientemente unidas al ligando, eluidas y caracterizadas.

10 En una realización preferida del procedimiento de la invención de acuerdo con el tercer aspecto, una detección reducida de la enzima en la alícuota incubada con el compuesto indica que la enzima es un objetivo directo del compuesto. Esto resulta del hecho de que en la etapa c) de este procedimiento de la invención, el compuesto compete con el ligando para la unión de la enzima. Si se puede detectar menos enzima en la alícuota incubada con el compuesto, esto quiere decir preferentemente que el compuesto ha competido con el inhibidor para la interacción con la enzima y es, por lo tanto, un objetivo directo de la enzima y viceversa.

15 En el procedimiento de acuerdo con el cuarto aspecto, se prefiere que este procedimiento se lleve a cabo como un rastreo de rendimiento medio o alto. Tales ensayos se conocen por la persona experta en la técnica (Mallari y cols., 2003, A generic high- throughput screening assay for kinases: protein kinase A as an example, *Journal of Biomolecular Screening* 8, 198-204; Rodems y cols., 2002, A FRET-based assay platform for ultra-high density screening of protein kinases and phosphatases, *Assay and Drug Development Technologies* 1 (1PT1), 9-19).

20 Es esencial para los procedimientos de acuerdo con el segundo, el tercero y el cuarto aspecto de la invención la provisión de un compuesto que se supone que interactúa con la enzima. Principalmente, de acuerdo con la presente invención, un compuesto tal puede ser cada molécula que sea capaz de interactuar con las enzimas. Preferentemente, el compuesto tiene un efecto en la enzima, por ejemplo un efecto estimulador o inhibidor.

25 Preferentemente, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en compuestos químicos sintéticos o que se dan en la naturaleza o fármacos orgánicos sintéticos, más preferentemente moléculas pequeñas, fármacos orgánicos o compuestos de moléculas pequeñas naturales. Preferentemente, dicho compuesto se identifica partiendo de una biblioteca que contiene tales compuestos. Después, en el curso de la presente invención, se rastrea una biblioteca tal.

Tales moléculas pequeñas no son preferentemente proteínas o ácidos nucleicos. Preferentemente, las moléculas pequeñas muestran un peso molecular de menos de 5000 Da, más preferido menos de 2000 Da, incluso más preferido menos de 1000 Da y lo más preferido menos de 500 Da.

30 Una "biblioteca" de acuerdo con la presente invención se refiere a una (mayoritariamente grande) colección de entidades químicas diferentes (numerosas) que se proporcionan en una manera clasificada que permite tanto un análisis funcional rápido (rastreo) de las diferentes entidades individuales, como proporcionar al mismo tiempo una identificación rápida de las entidades individuales que forman la biblioteca. Ejemplos son colecciones de tubos o pocillos en superficies que contienen compuestos químicos que se pueden añadir en reacciones con uno o más compañeros de interacción potencialmente definidos en una manera de alto rendimiento. Después de la identificación de una interacción "positiva" de ambos compañeros, el compuesto respectivo puede identificarse rápidamente debido a la construcción de la biblioteca. Bibliotecas de orígenes naturales y sintéticos se pueden bien adquirir o bien diseñar por el trabajador experto.

35 Ejemplos de la construcción de bibliotecas se proporcionan 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 las que se describen productos naturales que son puntos de partida para el diseño de bibliotecas combinatorias, ya que tienen un registro demostrado de relevancia biológica. Este papel especial de productos naturales en química medicinal y biología química se puede interpretar a la luz de nuevos conocimientos sobre la arquitectura de dominios de proteínas obtenidos por biología estructural y bioinformática. Con el fin de cumplir los requerimientos específicos del bolsillo de unión individual dentro de una familia de dominios puede ser necesario optimizar la estructura del producto natural por variación química. Se dice que la química en fase sólida llega a ser una herramienta eficaz para este procedimiento de optimización y se destacan avances recientes en este campo en este artículo de revisión. Otras referencias relacionadas incluyen Edwards PJ, Morrell AI. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. *Curr Opin Drug Discov Devel.* julio de 2002; 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, revisión; Goodnow RA Jr. Current practices in generation of small molecule new leads. *J Cell Biochem Suppl.* 2001; Supl. 37: 13-21; que describe que los procedimientos de descubrimiento de fármacos actuales en muchas compañías farmacéuticas requieren colecciones grandes y crecientes de estructuras principales de alta calidad para usar en ensayos de rastreo de alto rendimiento. Las colecciones de moléculas pequeñas con diversas estructuras y propiedades "similares a fármacos" se han adquirido, en el pasado por varios medios: por archivo de esfuerzos de optimización principales internos anteriores, por adquisición a partir de proveedores de compuestos y por unión de colecciones separadas tras fusión de compañías. Aunque se describe química de alto rendimiento/química combinatoria como que es un componente importante en el procedimiento de generación principal nueva, la selección de diseños de biblioteca para síntesis y el diseño subsiguiente de miembros de biblioteca ha evolucionado a un nuevo nivel de desafío e importancia. Los beneficios potenciales de diseños de bibliotecas de compuestos de moléculas

pequeñas múltiples contra dianas biológicas múltiples ofrecen oportunidad sustancial para descubrir estructuras principales nuevas.

5 Los compuestos de prueba que pueden eluir enzimas objetivo a partir de los ligandos inmovilizados (4º aspecto de la invención) pueden ponerse a prueba en ensayos enzimáticos convencionales. En lo siguiente, se describirán ensayos ejemplares que se pueden usar para caracterizar adicionalmente estos compuestos. No se desea que la descripción de estos ensayos limite el ámbito de la presente invención.

### Ensayo de proteasas

10 Puede llevarse a cabo un ensayo de proteasas ejemplar poniendo en contacto una proteasa con un sustrato peptídico con flúor (por ejemplo EDANS) y cromóforos desactivadores (por ejemplo DABCYL) en condiciones apropiadas y detectar el incremento de la fluorescencia después de escisión.

15 El sustrato contiene también un donante fluorescente, cerca de un extremo del péptido y un grupo aceptor, cerca del otro extremo. La fluorescencia de este tipo de sustrato se desactiva inicialmente por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia intramolecular (FRET) entre el donante y el aceptor. Cuando la proteasa escinde los sustratos los productos se liberan a partir de desactivación y la fluorescencia del donante llega a estar aparte. El incremento de la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizada (Taliani, M. y cols., 1996, *Methods* 240: 60-7).

### Ensayo de fosfodiesterasa

20 Un lisado celular de células leucocitarias humanas (U937) se puede preparar en un tampón adecuado y sirve como fuente de la enzima PDE. Después de 20 minutos de incubación a 25 °C con [<sup>3</sup>H]AMPc como sustrato en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) la [<sup>3</sup>H]Adenosina se cuantifica (Cortijo y cols., 1993, *British Journal of Pharmacology* 108, 562-568).

### Ensayo de actividad enzimática in vitro para proteína cinasas

25 Brevemente, un sustrato peptídico marcado con fluoresceína puede incubarse con la tirosina cinasa (por ejemplo Lck), ATP y un anticuerpo antifosfotirosina. Según transcurre la reacción, el péptido fosforilado se une al anticuerpo anti-fosfotirosina, dando como resultado un incremento en la señal de polarización. Los compuestos que inhiben la cinasa dan como resultado una señal de polarización baja.

30 Alternativamente, el ensayo puede configurarse en un formato indirecto modificado. Se usa un fosfopéptido fluorescente como un trazador para formación de complejos con el anticuerpo anti-fosfo-tirosina proporcionando una señal de polarización alta. Cuando el sustrato no marcado está fosforilado por la cinasa, el producto compite con el péptido fosforilado fluorescente por el anticuerpo. El péptido fluorescente se libera después del anticuerpo en solución resultante en un péptido señal de polarización. Tanto el ensayo directo como el indirecto se pueden usar para identificar inhibidores de actividad proteína tirosina cinasa (Seethala, 2000, *Methods* 22, 61-70; Seethala y Menzel, 1997, *Anal. Biochem.* 253, 210-218; Seethala y Menzel, 1998, *Anal. Biochem.* 255, 257-262).

35 Este ensayo de polarización de fluorescencia se puede adaptar para el uso con proteína serina/treonina cinasas reemplazando el anticuerpo antifosfotirosina con un anticuerpo antifosfoserina o antifosfotreonina (Turek y cols., 2000, *Anal. Biochem.* 299, 45-53, PMID 11726183; Wu y cols., 2000, *J. Biomol. Screen.* 5, 23-30, PMID 10841597).

40 Los compuestos identificados en el procedimiento de acuerdo con el 4º aspecto de la presente invención pueden optimizarse adicionalmente (optimización principal). Esta optimización subsiguiente de tales compuestos se acelera a menudo debido a la información de relación de estructura-actividad (SAR) codificada en estas bibliotecas de generación principales. La optimización principal se facilita a menudo debido a la fácil aplicabilidad de procedimientos de química de alto rendimiento (HTC) para proseguir síntesis.

45 Preferentemente, la optimización principal está respaldada con un procedimiento de acuerdo con el 2º, 3º o 4º aspecto de la presente invención, más preferentemente con un procedimiento de acuerdo con el 4º aspecto. Los resultados de estos procedimientos pueden proporcionar guía a químicos medicinales o a otra persona experta en la técnica de como optimizar compuestos adicionalmente con respecto a por ejemplo selectividad.

Un uso de una biblioteca tal se describe en, por ejemplo, Wakeling AE, Barker AJ, Davies DH, Brown DS, Green LR, Cartledge SA, Woodburn JR. Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines. *Breast Cancer Res Treat.* 1996; 38 (1): 67-73.

50 La enzima que puede caracterizarse de acuerdo con la presente invención, se selecciona preferentemente del grupo que consiste en una cinasa, una fosfatasa, una proteasa, una fosfodiesterasa, una hidrogenasa, una deshidrogenasa, una ligasa, una isomerasa, una transferasa, una acetilasa, una deacetilasa, una GTPasa, una polimerasa, una nucleasa y una helicasa.

Preferentemente, la proteína es una cinasa y más preferentemente una proteína cinasa. Igualmente preferido, la proteína es una cinasa de lípidos.

Como ya se indica anteriormente, es esencial para la presente invención que el ligando sea un ligando de amplio espectro que sea capaz de unir diversas, pero no todas las enzimas de una clase dada de enzimas. Preferentemente, el ligando se une al 10 al 50 %, más preferentemente al 30 al 50 % de las enzimas de una clase de enzimas dada.

Preferentemente, el ligando es un inhibidor de la enzima.

- 5 En una realización más preferida, la enzima es una cinasa y el ligando es un inhibidor de cinasas.

Preferentemente, este inhibidor de cinasas está seleccionado del grupo que consiste en Bisindolilmaleimida VIII, Purvalanol B, CZC00007324 (PD173955 enlazable), CZC00008004.

Ligandos adicionales incluyen ligando indol 91, ligando quinazolina 32 y una estaurosporina modificada (véanse Ejemplos 5 a 7).

- 10 La estructura de ligando indol 91 ((3-amino-propil)-amida del ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico) se da en la Figura 3. Este compuesto es una molécula estructural similar al inhibidor de cinasa Sutent (SU11248; Sun y cols., 2003. J. Med. Chem. 46, 1116-1119). El ligando indol 91 puede estar acoplado covalentemente a un material de soporte sólido adecuado por medio del grupo amino primario y se usa para el aislamiento de proteínas de unión. La síntesis del  
15 ligando indol 91 se describe en el Ejemplo 1. De acuerdo con la invención, la expresión "ligando indol 91" también incluye compuestos que comprenden el núcleo idéntico pero que tienen otro engarce, preferentemente acoplado al grupo NH que no es parte de las estructuras cíclicas, para enlace al soporte sólido. Típicamente los engarces tienen armazón de 8, 9 o 10 átomos. Los engarces contienen bien un grupo carboxi-activo o bien un grupo amino-activo.

- 20 De acuerdo con una realización adicionalmente preferida, la caracterización del enzima se lleva a cabo caracterizando compañeros de unión co-eluidos de la enzima, subunidades de la enzima o modificaciones postraduccionales de la enzima.

- 25 La base de esta realización preferida es que debido al uso de condiciones esencialmente fisiológicas durante la unión entre el ligando y la enzima, es preferentemente posible preservar la condición natural de la enzima que incluye la existencia de patrones de unión, subunidades enzimáticas o modificaciones postraduccionales. Con la ayuda de la espectrometría de masas (EM) es posible no solo identificar la enzima, sino también los compañeros de unión no eluidos, las subunidades enzimáticas o dichas modificaciones postraduccionales.

- 30 De acuerdo con una realización preferida adicionalmente de la presente invención, la caracterización por espectrometría de masas (EM) se lleva a cabo por la identificación de péptidos proteotípicos de la enzima o del compañero de unión de la enzima. El concepto de péptidos proteotípicos se describe en detalle en la sección de ejemplo. La idea es que la enzima eluida o el compañero de unión se digieran con proteasas y los péptidos resultantes se determinen por EM. Como un resultado, las frecuencias peptídicas para péptidos de la misma proteína fuente difieren en un gran grado, llamándose los péptidos más frecuentemente observados que contribuyen "típicamente" a la identificación de esta proteína "péptidos proteotípicos". Por lo tanto, un péptido proteotípico como se usa en la presente invención es un péptido experimentalmente bien observable que identifica únicamente una proteína  
35 específica o una isoforma proteica.

- 40 De acuerdo con una realización preferida, la caracterización se llevó a cabo comparando los péptidos proteotípicos obtenidos para la enzima y el compañero de unión con péptidos proteotípicos obtenidos. A partir de entonces, cuando se usan fragmentos preparados por digestión de proteasas para la identificación de una proteína en EM, usualmente 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 e identificar por lo tanto la enzima que está presente en la muestra.

El análisis de espectrometría de masas se lleva a cabo de una manera cuantitativa, por ejemplo usando tecnología iTRAQ (marcas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta) o cICAT (etiquetas de afinidad codificadas por isótopos escindibles) (Wu y cols., 2006. J. Proteome Res. 5, 651-658).

- 45 De acuerdo con una realización adicionalmente preferida, el soporte sólido está seleccionado del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de sefarosa (por ejemplo sefarosa activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferrimagnéticas o ferromagnéticas.

- 50 El ligando de enzima de amplio espectro puede acoplarse al soporte sólido bien covalentemente o bien no covalentemente. La unión no covalente incluye unión por medio de ligandos de afinidad a biotina que se unen a matrices de estreptavidina.

Preferentemente, el ligando de amplio espectro está acoplado covalentemente al soporte sólido.

Antes del acoplamiento, las matrices pueden contener grupos activos tales como NHS, carbodiimida etc. para permitir la reacción de acoplamiento con compuestos. Los compuestos pueden acoplarse al soporte sólido por acoplamiento directo (por ejemplo usando grupos funcionales tales como grupos amino-, sulfhidril-, carboxil-, hidroxil-, aldehído- y

cetona) y por acoplamiento indirecto (por ejemplo por medio de biotina, estando la biotina covalentemente unida al compuesto y unión no covalente de biotina a estreptavidina que está unida a soporte sólido directamente).

El enlace al material de soporte sólido puede implicar engarces escindibles y no escindibles. La escisión puede lograrse por escisión enzimática o por tratamiento con procedimientos químicos adecuados.

- 5 Las interfases de unión preferentes para unir el compuesto de interés al soporte sólido son engarces con un armazón de átomos de carbono. Típicamente los engarces tienen armazón de 8, 9 o 10 átomos. Los engarces contienen, dependiendo del compuesto a acoplarse, bien un grupo carboxi-activo o bien un grupo amino-activo.

Se logra cobertura más completa de una clase de enzimas usando combinaciones de ligandos de amplio espectro.

- 10 Preferentemente, se usan 2 a 10 ligandos diferentes, más preferido 2 a 6 ligandos diferentes, incluso más preferido 2 a 4 ligandos diferentes. Lo más preferido, se usan 3 o 4 ligandos diferentes.

Los al menos dos o todos los ligandos diferentes están presentes en un soporte sólido.

Se prefiere que el espectro que cada ligando individual pueda unir sea diferente de tal manera que se pueda lograr la máxima cobertura de la clase de enzimas.

- 15 Preferentemente, cada ligando se une al 10 al 50 %, más preferentemente al 30 al 50 % de las enzimas de una clase de enzimas dada.

- 20 De acuerdo con una realización individual preferida, caracterizando la enzima o el complejo enzimático compuesto, se determina la identidad de todos o varios de los miembros de una clase enzimática en la célula. Esto se debe al hecho de que incubando el ligando con el lisado celular, potencialmente todas las enzimas que son capaces de unir al ligando se aíslan y posteriormente se caracterizan. Dependiendo del perfil de expresión de las enzimas, el ligando es capaz de unir a todos o algunos de los miembros de una clase enzimática, que puede así identificarse. En el caso de las cinasas, los procedimientos de la presente invención permiten a la persona experta identificar y caracterizar la quinoma expresada en una célula dada.

El compuesto es diferente del ligando.

- 25 La invención describe adicionalmente un procedimiento para la producción de una composición farmacéutica, que comprende las etapas de:

- a) identificar un complejo de compuesto enzimático de acuerdo con el procedimiento del cuarto aspecto de la presente invención, y
- b) formular el compuesto para una composición farmacéutica.

- 30 Por lo tanto, la invención describe un procedimiento para la preparación de composiciones farmacéuticas, que pueden administrarse a un sujeto en una cantidad eficaz. En un aspecto preferido, el agente terapéutico se purifica sustancialmente. El sujeto a tratarse es preferentemente un animal incluyendo, pero no limitado a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc. y es preferentemente un mamífero y más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero no humano.

- 35 En general, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal de EE.UU. o recogido en farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales y más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, incluyendo pero no limitados a aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La solución salina y la dextrosa acuosa son vehículos preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Para soluciones inyectables se emplean preferentemente soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol como vehículos líquidos. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, píldoras, cápsulas, polvos,
- 40 formulaciones de liberación mantenida y similares. Se puede formular la composición en forma de supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Las composiciones de este tipo contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del

compuesto terapéutico, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debería ser adecuada para el modo de administración.

5 La composición puede estar formulada, de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y una anestesia local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan bien por separado o bien mezclados juntos en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un contenedor sellado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición ha de administrarse por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga solución salina o agua estéril de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección de tal manera que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

15 Los productos terapéuticos pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como aquellas derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., aquellas formadas con grupos amina libres tales como aquellas derivadas de isopropilamina, trietilamina, 2-(etilamino)etanol, histidina, procaína, etc. y aquellas derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio e hidróxidos férricos, etc..

20 La cantidad del agente terapéutico que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y puede determinarse por técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y debería decidirse de acuerdo con la opinión del médico y las circunstancias de cada paciente. No obstante, los intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa son, en general, de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para administración intranasal son, en general, de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Se pueden extrapolar dosis eficaces a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelo animal. En general, los supositorios pueden contener ingrediente activo en el intervalo del 0,5 % al 10 % en peso; las formulaciones orales contienen preferentemente ingrediente activo al 10 % al 95 %.

Se conocen y pueden usarse diversos sistemas de administración para administrar un agente terapéutico, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas y microcápsulas; uso de células recombinantes capaces de expresar el agente 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 retroviral u otro vector, etc. Los procedimientos de introducción incluyen pero no están limitados a vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, 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 en el sistema nervioso central por medio de cualquier vía adecuada, incluidas la inyección intraventricular e intratecal; se puede facilitar la inyección intraventricular por medio de un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, por medio del uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente de aerosol.

45 Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente al área en necesidad de tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo y no a modo de limitación, por infusión local durante una operación quirúrgica, aplicación tópica, por ejemplo junto con un vendaje después de una operación quirúrgica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o edema o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser inyección directa al sitio (o primer sitio) de un tumor maligno o tejido neoplásico o pre-neoplásico.

El agente terapéutico se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat y cols., 1989, en: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler, eds., Liss, Nueva York, páginas 353-365; López-Berestein, *ibid.*, páginas 317-327; véase generalmente *ibid.*)

55 El agente terapéutico se puede administrar por medio de un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201-240; Buchwald y cols., 1980, Surgery 88: 507-516; Saudek y cols., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574-579. En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise, eds., CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball, eds., Wiley, Nueva York, 1984; Ranger y Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; Levy y cols., 1985, Science

228: 190-192; During y cols., 1989, Ann. Neurol. 25: 351-356; Howard y cols., 1989, J. Neurosurg. 71: 858-863. En aún otra realización, se puede situar un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo así solamente una fracción de dosis sistémica (por ejemplo, Goodson, 1984, en: Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, páginas 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión por Langer (1990, Science 249: 1527-1533).

El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de modular la afinidad de unión del compuesto al enzima. Esto puede lograrse por procedimientos conocidos por la persona experta en la técnica, por ejemplo por una modificación química de diversos residuos del compuesto y análisis subsiguientes de la afinidad de unión del compuesto a la enzima.

La invención describe adicionalmente el uso de al menos un ligando de enzimas de amplio espectro inmovilizado en un soporte sólido para la caracterización de al menos una enzima o de un complejo compuesto-enzima. Con respecto a este uso, se aplican todas las realizaciones como se describen anteriormente para los procedimientos de la invención.

La invención está ilustrada adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos, lo que no se considera que sea limitante para el alcance de la protección conferida por las reivindicaciones de la presente solicitud.

### 15 Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Estructuras de ligandos de Kinobeads. La fuente y las vías de síntesis de los ligandos se describen en el Ejemplo 1.

Figura 1a: Ligando de Kinobeads 1 (bisindolilmaleimida VIII).

Figura 1b: Ligando de Kinobeads 2 (purvalanol B).

20 Figura 1c: Ligando de Kinobeads 3 (CZC00007324, (7-(4-aminometil-fenilamino)-3-(2,6-dicloro-fenil)-1-metil-1H-[1,6]naftiridin-2-ona)).

Figura 1d: Ligando de Kinobeads 4 (CZC00008004, 2-(4'-aminometilfenilamina)-5-fluoro-pirimidin-4-il)-fenil- amina).

**Figura 2:** Signaloquinoma (véase Ejemplo 2).

25 Esta figura muestra una comparación de exposiciones consecutivas de fármacos usando Kinobeads (círculo central) e inmunoprecipitaciones convencionales con perlas de anticuerpos antifosfotirosinas (círculo derecho). En los experimentos de Kinobeads se identificaron un total de 626 proteínas, de estas 100 son cinasas. En el experimento de inmunoprecipitación (IP) se identificaron un total de 503 proteínas, 12 de estas eran cinasas. Las cinasas identificadas con ambos experimentos (cinasas comunes) se enumeran en el área que se superpone. El resultado muestra que con las Kinobeads se identificaron significativamente más cinasas (100 cinasas) comparado con las perlas de anticuerpos anti-fosfotirosinas (12 cinasas).

**Figura 3:** Estructuras de los ligandos de Kinobeads 5, 6 y 7. Las vías de síntesis de los ligandos se describen en los Ejemplos 5, 6 y 7.

Figura 3a: Estructura del ligando de Kinobeads 5 (ligando indol 91).

Figura 3b: Estructura del ligando de Kinobeads 6 (ligando quinazolina 32).

35 Figura 3c: Estructura del ligando de Kinobeads 7 (estaurosporina modificada).

**Figura 4:** Perfil de afinidad de proteína cuantitativo (PAP).

40 La figura muestra competición en lisado con compuesto de prueba Bis VIII y detección de proteínas con análisis de bandas de Western. El experimento expuesto de forma consecutiva se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8 con muestras de lisado de células Jurkat que contienen 10 mg de proteína. Lisado de entrada (carril L; 50 µg de proteína) y eluatos de SDS de Kinobeads (carriles 1 a 7) se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida, se transfirieron a una membrana y se sondearon con anticuerpos. Figura 4A: La prueba de bandas de Western se sondeó primero con un anticuerpo dirigido contra GSK3beta. Anticuerpos de detección secundarios marcados con peroxidasa se usaron para detección quimioluminiscente. Como un control de carga se sondea una banda con un anticuerpo anti-ITK. Carril L: 50 µg de lisado de Jurkat; carril 1: Bis VIII 6,0 µM; carril 2: Bis VIII 2,0 µM; carril 3: Bis VIII 0,67 µM; carril 4: Bis VIII 0,22 µM; carril 5: Bis VIII 0,074 µM; carril 6: Bis VIII 0,025 µM; carril 7: DMSO al 0,5 % (control de disolvente).

45 Figura 4B: Competición dependiente de concentración de unión de GSK3 beta a Kinobeads por Bis VIII. Las bandas de GSK3 beta en la prueba de bandas de Western mostradas en la Figura 2A se cuantificaron y se representaron frente a la concentración de Bis VIII añadida al lisado.

**Figura 5:** Perfil de afinidad de proteína cuantitativo para cinasas.

50 Los resultados del experimento de perfil de afinidad del Ejemplo 8 se muestran para cuatro cinasas. Los valores de

intensidad relativa (IR) se representan frente a concentración de compuesto (Bis VIII). El valor de IR<sub>50</sub> representa la concentración de compuesto a la que la intensidad relativa de la señal de EM para una cinasa dada es el 50 % comparada con el control de DMSO.

Figura 5A: Curva para glucógeno sintasa cinasa 3 alfa (GSKa; IR<sub>50</sub> = 72,7 nM).

5 Figura 5B: Curva para glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSKb; IR<sub>50</sub> = 95 nM).

Figura 5C: Curva para proteína cinasa C alfa (PKCa; IR<sub>50</sub> = 12,2 nM).

Figura 5D: Curva para proteína cinasa C beta (PKCb; IR<sub>50</sub> = 21,5 nM).

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Preparación de Kinobeads

10 Este ejemplo ilustra la preparación de Kinobeads con 4 ligandos diferentes. Estas Kinobeads se usaron más tarde en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo 3.

Los ligandos de captura de amplio espectro se inmovilizaron covalentemente en un soporte sólido por enlace covalente usando grupos funcionales adecuados (por ejemplo grupos amino o carboxilo). Los compuestos que no contienen un grupo funcional adecuado se modificaron con el fin de introducir un grupo tal. Los procedimientos químicos necesarios se conocen en la bibliografía de la química medicinal y se ilustran más adelante.

15

#### 1. Selección y síntesis de ligandos

Los siguientes cuatro ligandos de especificidad amplia (ligandos de Kinobeads 1 a 4; Figura 1) se acoplaron covalentemente a perlas en reacciones aparte según se describe más adelante y después se mezclaron y usaron los cuatro tipos de perlas para los experimentos expuestos consecutivamente de fármacos.

20 **Ligando de Kinobeads 1:** Bisindolilmaleimida VIII-acetato (Fórmula química: C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>COOH; P.M.: 398,5; número CAS 138516-31-1; Alexis Biochemicals, AXXORA Deutschland GmbH, Grünberg; Cat-ALX-270-056).

**Ligando de Kinobeads 2:** Purvalanol B (composición química: C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; P.M.: 441,92; número CAS 212844-54-7; Tocris Biochemicals Cat-1581, BIOTREND Chemikalien GmbH Köln, Alemania).

25 **Ligando de Kinobeads 3:** CZC00007324; (7-(4-aminometil-fenilamino)-3-(2,6-diclorofenil)-1-metil-1H-[1,6]naftiridin-2-ona).

#### Síntesis de ligando de Kinobeads 1:

##### 7-(4-aminometil-fenilamino)-3-(2,6-diclorofenil)-1-metil-1H-[1,6]naftiridin-2-ona

Las primeras siete etapas de la síntesis de CZC00007324 se llevan a cabo según se describe en Klutchko, S.R. y cols., 1998, Journal of Medicinal Chemistry 41, 3276-3292. Las etapas que quedan se llevaron a cabo como se describe a continuación.

30

**Etapas 1-7:** 6-(2,6-diclorofenil)-2-metanosulfonil-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona se sintetizó a partir de éster de 4-cloro-2-metilsulfanil-5-pirimidinacarboxilato de etilo siguiendo el procedimiento en J. Med. Chem. 1998, 41, 3276-3292.

#### **Etapas 8:** Éster terc-butílico del ácido

35 {4-[3-(2,6-dicloro-fenil)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidro-[1,6]naftiridin-7-ilamino]bencil}-carbámico

6-(2,6-diclorofenil)-2-metanosulfonil-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (0,100 g, 0,2 mmol) y 3-(*N*-Boc-metilamino)anilina (0,421 g, 2,0 mmol) se mezclaron como sólidos y se calentaron a 140 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción en bruto se disolvió en diclorometano y se lavó con HCl 2 N (ac.) x 2. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró. El producto en bruto se recristalizó a partir del acetato de etilo caliente proporcionando éster *terc*-butílico del ácido {4-[3-(2,6-dicloro-fenil)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidro-[1,6]naftiridin-7-ilamino]bencil}-carbámico como un sólido amarillo (0,031 g-al 25 %). RMN de <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,18 (s, 1H); 8,83 (s, 1H); 7,76 (d, 2H); 7,58 (d, 2H); 7,46 (dd, 1H); 7,32 (ta, 1H); 7,23 (d, 2H); 4,10 (d, 2H); 3,66 (s, 3H); 1,40 (s, 9H). CLEM: procedimiento A, TR = 5,60 minutos.

40

#### **Etapas 9:** 7-(4-aminometil-fenilamino)-3-(2,6-dicloro-fenil)-1-metil-1H-[1,6]naftiridin-2-ona

45 Se disolvió éster *terc*-butílico del ácido {4-[3-(2,6-dicloro-fenil)-1-metil-2-oxo-1,2-dihidro-[1,6]naftiridin-7-ilamino]bencil}-carbámico (0,026 g, 0,05 mmol) en metanol (3 ml) y se añadió ácido clorhídrico (4 N en dioxano, 1,2 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas cuando HPLC no mostró que quedase ningún material de partida. Se retiró el disolvente *al vacío*. El residuo se disolvió en agua y la solución se basificó en carbonato de sodio (sat., ac.). El precipitado resultante se recogió y se secó proporcionando 7-(4-aminometil-fenilamino)-3-(2,6-dicloro-fenil)-1-metil-1H-[1,6]naftiridin-2-ona

50

(0,021 g-al 100 %) como un sólido amarillo. RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10,20 (da, 1H); 8,83 (d, 1H); 7,90 (d, 1H); 7,76 (d, 1H); 7,72 (d, 1H); 7,60 (dd, 2H); 7,47 (ddd, 1H); 7,33 (d, 1H); 7,24 (d, 1H); 4,07 (d, 2H); 3,66 (s, 3H). LCMS: procedimiento A, TR = 4,44 minutos, [MH+ = 426].

5 **Ligando de Kinobeads 4:** CZC00008004. 2-(4'-aminometilfenilamina)-5-fluoro-pirimidin-4-il)-fenil-amina. Fórmula química  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{F}$ . P.M.: 309,34. Esto es un análogo de CZC00004919.

### Síntesis de CZC00008004-(2-(4'-aminometilfenilamina)-5-fluoro-pirimidin-4-il)-fenil-amina

#### Etapa 1: 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina

10 Se añadió oxiclورو de fósforo (2 ml) a 5-fluorouracilo (1 g, 7,688 mmol) seguido por pentaclورو de fósforo (3,28 g, 15,76 mmol), la mezcla se calentó y se agitó a 110 °C durante 5 horas y después se dejó enfriar. El oxiclورو de fósforo se hidrolizó lentamente en una mezcla de baño de hielo/agua (10 ml). La mezcla acuosa se extrajo con éter dietílico (3 x 10 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con bicarbonato de sodio saturado (10 ml) seguido por cloruro de sodio saturado (10 ml), se secaron con sulfato de magnesio anhidro y después se filtraron. El disolvente se retiró por evaporación a 46.662,7 pascales (350 mm de Hg) dejando un aceite viscoso que cristaliza proporcionando el compuesto del título (1,22 g-al 95 %). El compuesto se usó sin análisis adicional en la etapa siguiente.

#### 15 Etapa 2: (2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-fenilamina

20 A una solución de 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina (0,550 g, 3,30 mmol) en dimetilformamida (13 ml) se añadió anilina (0,301 ml, 3,30 mmol) y *N*-etil-diisopropilamina (0,602 ml, 3,63 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla se desactivó con acetato de etilo (20 ml) y se lavó con cloruro de amonio saturado (20 ml) y la fase orgánica se retiró. La fase acuosa se lavó con acetato de etilo (20 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (20 ml), cloruro de sodio saturado (10 ml) y se secaron con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se evaporó por evaporación y el sólido resultante se sometió a cromatografía en columna (sílice, acetato de etilo (0 al 20 %/éter de petróleo) proporcionando el compuesto del título (0,532 g-al 72 %). CLEM: procedimiento A, TR = 4,67 minutos, [MH+ = 224].

#### Etapa 3: Éster *terc*-butílico del [4-(5-fluoro-4-fenilamino-pirimidin-2-ilamino)-bencil]-carbámico

25 Se mezclaron conjuntamente (2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-fenilamina (0,087 g, 0,39 mmol) y 4[*N*-Boc-aminometil]anilina (0,087g, 0,39 mmol). Se añadió una barra agitadora y el matraz se situó en un baño de aceite a 110 °C durante 20 minutos. La mezcla se enfrió, el residuo se disolvió en 3 ml de diclorometano/metanol (99:5) y se cargó en un cartucho de cromatografía en matraz y se purificó usando acetato de etilo (20 al 60 %) en éter de petróleo dando el compuesto deseado como un sólido amarillo (0,051 g-al 32 %). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ - $d_6$ )  $\delta$  7,85 (d, 1H); 7,50 (dd, 2H); 7,39 (d, 2H); 7,27 (t, 2H); 7,12-7,00 (m, 3H); 6,81 (s, 1H); 6,66 (s, 1H); 4,67 (s, 1H), 4,17 (d, 2H), 1,36 (s, 9H). CLEM: procedimiento B, TR = 9,20 minutos, [MH+ = 410].

#### Etapa 4: (2-(4'-aminometilfenilamina)-5-fluoro-pirimidin-4-il)-fenil-anilina

35 A una solución de éster *terc*-butílico del ácido [4-(5-fluoro-4-fenilamino-pirimidin-2-ilamino)-bencil]-carbámico (0,055 g, 0,134 mmol) en metanol (5 ml) HCl (4N en dioxano) (2 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró el disolvente por evaporación. Se añadió agua (5 ml) y el pH de la solución se elevó a 8 por adición de bicarbonato de sodio. El precipitado resultante se filtró y se secó proporcionando el compuesto del título (0,035 g-al 84 %). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,90 (d, 1H); 7,70 (dd, 2H); 7,55 (dd, 2H); 7,35 (t, 2H); 7,20 (d, 2H); 7,10 (t, 1H); 3,80 (s, 2H). CLEM: procedimiento B, TR = 5,022 minutos, [MH+ = 310].

40 Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte. Se obtuvieron espectros de RMN en un dpx400 de Bruker. CLEM se llevó a cabo en un Agilent 1100 usando un Zorbax SBC-18, columna 4,6 mm x 150 mm x 5  $\mu$ . El flujo en columna fue 1 ml/minuto y los disolventes usados fueron agua y acetonitrilo (TFA al 0,1 %) con un volumen de inyección de 10  $\mu$ l. Las longitudes de onda fueron de 254 y 210 nm. A continuación se describen los procedimientos.

Tabla 1: Procedimientos analíticos

Procedimiento	Nombre de Procedimiento de Acceso Fácil	Nombre de Procedimiento de ChemStation	Caudal	Disolvente	Tiempo de ejecución
A	Analítica positiva de 7 minutos	ANL_POS7.M	1ml/minuto	MeCN al 5-95 % durante 0-2,5 minutos MeCN al 95 % durante 2,5-6 minutos	7 minutos
B	Analítica positiva iónica	ANAL_POS.M	1ml/minuto	MeCN al 5-95 % durante 0-11 minutos MeCN al 95 % durante 11-13 minutos	15 minutos



**Tabla 2: Abreviaturas usadas en protocolos de química**

ac.	acuoso
d	doblete
DMSO	dimetilsulfóxido
g	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
CLEM	Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
m	multiplete
min	minuto
mmol	milimol
N	Normal
RMN	resonancia magnética nuclear
c	cuadrupele
TR	Tiempo de retención
s	singlete
sat	saturado
t	triplete

## 2. Inmovilización de ligandos que contienen grupos amina

5 Se equilibró sefarosa 4 activada por NHS de Flujo Rápido (Amersham Biosciences, 17-0906-01) con DMSO anhidro (dimetilsulfóxido, Fluka, 41648, H<sub>2</sub>O <= 0,005 %). Se situó 1 ml de perlas sedimentadas en un tubo Falcon de 15 ml, se añadió solución de compuesto de reserva (usualmente 100 mM en DMF o DMSO) (concentración final 0,2-2 μmol/ml de perlas) así como 15 μl de trietilamina (SIGMA, T-0886, puro al 99 %). Las perlas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad en un agitador de extremo a extremo (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.) durante 16-20 horas. La eficacia de acoplamiento se determinó por HPLC. Los grupos NHS no reaccionados se bloquearon en incubación con aminoetanol a temperatura ambiente en el agitador de extremo a extremo durante toda una noche. Se almacenaron perlas lavadas en isopropanol o se usaron inmediatamente para reacciones de unión.

## 3. Inmovilización de ligandos que contienen grupos carboxilo

Los compuestos se acoplaron en condiciones básicas a perlas de NHS-sefarosa invertidas (química de PyBroP) como se resume más adelante.

### 15 Lavado de perlas

Etapa 1: Usar 1 ml (volumen sedimentado) de perlas de NHS-sefarosa para una reacción de acoplamiento estándar (NHS-sefarosa activada 4 por NHS de Flujo Rápido proporcionada en isopropanol, Amersham Biosciences, 17-0906-01).

20 Etapa 2: Lavar las perlas 3 veces con 10 ml de DMSO y una vez con 10 ml de DMSO anhidro (dimetilsulfóxido, Fluka, 41648, H<sub>2</sub>O <= 0,005 %); etapas de centrifugación: 1 min, 1.200 rpm, temperatura ambiente; descartar sobrenadante en desechos de disolventes no halógenos.

Etapa 3: Después de la última etapa de lavado las perlas se resuspenden en un volumen de DMSO anhidro.

### Inversión de las perlas NHS

25 Esta etapa se diseña para 1 ml de perlas, ajustar de acuerdo con ello para otros volúmenes de perlas. Las perlas NHS tienen una capacidad de 20 μmol/ml. Por lo tanto, las perlas invertidas al 20 % tendrían una capacidad de 4 μmol/ml.

## ES 2 412 380 T3

Elaborar una mezcla de proporción 4:1 de aminoetanol y etilendiamina, después añadir trietilamina a la mezcla. (200  $\mu\text{mol}$  totales) (10 x capacidad de 1 ml de perlas NHS).

1: 9,66  $\mu\text{l}$  de aminoetanol 16,56 M (2-aminoetanol, Aldrich, 11.016-7) (total 160  $\mu\text{mol}$ ).

2: 2,68  $\mu\text{l}$  etilendiamina 14,92 M (Fluka, 03350) (40  $\mu\text{mol}$  totales).

5 3: 15  $\mu\text{l}$  trietilamina 7,2 M (TEA) (SIGMA, T-0886, puro al 99 %). La mezcla se dividirá en dos fases, pero todo va bien.

Añadir mezcla a perlas NHS lavadas/resuspendidas e incubar 16 horas (durante toda una noche) a temperatura ambiente en el agitador de extremo a extremo.

**Acoplamiento de PyProB.** Este procedimiento no requiere una etapa de preactivación, la activación y el acoplamiento tienen lugar in situ.

10 1. Disolver PyBroP (hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio; suministrador: NOVABIOCHEM) en dimetilformamida libre de agua (DMF) a una concentración final de 100 mM (46,62 mg/ml), la solución se puede usar durante hasta un día.

2. Disolver 35  $\mu\text{l}$  de diisopropiletilamina (DIEA) en 1 ml de DMF libre de agua, concentración final 200 mM.

15 3. Lavar 1 ml de perlas invertidas 3 veces con 15 ml de DMSO. Etapa de centrifugación: 1 minuto a 1.200 rpm a temperatura ambiente. Descartar sobrenadante.

4. Lavar perlas invertidas 3 veces con 15 ml de DMF libre de agua. Etapa de centrifugación 1 minuto, 1.200 rpm a temperatura ambiente. Descartar sobrenadante.

5. Suspender perlas de sefarosa invertidas en 1 ml de DMF libre de agua.

6. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de solución de diisopropiletilamina (DIEA).

20 7. Añadir compuesto (1 mmol/ml de perlas de sefarosa invertidas; corresponde a 10  $\mu\text{l}$  de compuesto 100 mM/ml de perlas de sefarosa) de solución de DMF en la cantidad requerida a las perlas.

8. Mezclar hasta que se obtiene una suspensión homogénea.

9. Centrifugar 1 minuto a 1200 rpm a temperatura ambiente, retirar 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y diluir en 30  $\mu\text{l}$  de metanol (MeOH) para el valor de partida para análisis de HPLC.

25 10. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de solución PyBroP a la suspensión y mezclar de nuevo.

11. Incubar durante toda una noche en el mezclador de extremo a extremo a temperatura ambiente.

12. Centrifugar 1 minuto a 1200 rpm a temperatura ambiente, retirar 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y diluir en 30  $\mu\text{l}$  de metanol (MeOH) para el valor asociado para análisis de HPLC.

### Bloqueo de las perlas

30 1. Bloquear las perlas añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de NHS-acetato 100 mM (véase más adelante como elaborar reactivo bloqueante).

2. Incubar durante toda una noche a temperatura ambiente en el agitador de extremo a extremo.

Reactivo bloqueante (ácido acético activado NHS):

1. Preparar soluciones 200 mM de DCCD y NHS en acetonitrilo (~ 5 ml de cada una).

35 2. Mezclar volúmenes iguales de NHS 200 mM y DCCD en un vial de cristal transparente de 20 ml.

3. Por 1 ml de volumen total de mezcla de NHS/DCCD, añadir 11,4  $\mu\text{l}$  de ácido acético 17,49 M (exceso molar 2x) (Merck, 1.00063.1000).

4. Mezclar cuidadosamente. Se formará un precipitado después de aproximadamente 2 minutos (derivado de cristales de urea).

40 5. Dejar reposar la reacción a temperatura ambiente al menos durante toda una noche antes de usar adicionalmente.

### Lavado de perlas

1. Lavar las perlas 2 veces con 14 ml de DMSO (por ejemplo FLUKA, 34869 o equivalente), después con 2 x 14 ml de isopropanol (Merck, 1.00983.1000, pro-análisis). Etapas de centrifuga: 1 minuto a 1200 rpm a temperatura ambiente.

Retirar sobrenadante entre lavados.

2. Resuspender las perlas con 1 ml de isopropanol haciendo una suspensión al 50 % para almacenamiento a -20 °C o usar inmediatamente uniendo reacciones con lisados celulares.

**Tabla 3: Abreviaturas usadas en protocolos de acoplamiento**

DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DIEA	Disopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
NHS	N-hidroxisuccinimida
PyBroP	Hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio
TEA	Trietilamina

5

### Ejemplo 2: Signaloquinoma

Este ejemplo ilustra el tratamiento de células con compuestos (véase particularmente el segundo aspecto de la invención). Las células HeLa se trataron con factor de crecimiento epidérmico (EGF), se preparó un lisado celular y se analizó usando Kinobeads (protocolo experimental en sección 2.1) y espectrometría de masas. La preparación de Kinobeads se describe en el Ejemplo 1.

10

En paralelo el lisado celular se sometió a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-fosfotirosina (protocolo experimental en sección 2.2) y se analizó por espectrometría de masas.

El resultado (Figura 2) muestra que las Kinobeads identifican significativamente más cinasas (Tabla 8) comparadas con el procedimiento de inmunoprecipitación (Tabla 6).

15

### 1. Preparación de la muestra biológica (lisado celular)

#### 1.1 Cultivo celular y tratamiento de células

**Cultivo celular.** Las células HeLa (American Type Culture Collection-N.º: CCL-2) se cultivaron en medio MEM (sin L-arginina y sin L-glutamina; Promocell C-75280), suero fetal bobino dializado al 10 % (Gibco, 26400-044), aminoácidos no esenciales 100x al 1 % (Cambrex, BE13-114E), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-039), L-glutamina 2 mM (Gibco, 25030-032), L-arginina 12C o 13C a 40 mg/l (12C Arginina-Sigma, A6969) (13C Arginina-Cambridge Isotope Laboratories Inc., CLM-2265) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

20

**Propagación celular.** Después de que las células han alcanzado confluencia en una placa de 15 cm, las células se dividieron 1 a 10 para crecimiento adicional. Las células se dividieron retirando primero los medios sobrenadantes, lavando después brevemente las células con 15 ml de tampón de PBS (Gibco, 14190-094). Después de la retirada del PBS, las células se desprendieron de la placa añadiendo 2 ml de solución de tripsina-EDTA (Gibco, 25300-054) por placa de 15 cm e incubando la placa durante 10 minutos a 37 °C. Después del desprendimiento de las células, se añadieron 8 ml de medio de cultivo MEM (véase anteriormente) por placa de 15 cm. Se puso 1 ml de esta solución en placas de 15 cm recién preparadas y se añadieron medios de MEM de 24 ml (véase anteriormente). Las placas se incubaron de nuevo en CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C hasta que las células fueron confluentes (3-4 días).

25

**Tratamiento con EGF de células.** Un día antes del tratamiento de las células con Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el medio de cultivo celular se retiró por aspiración y se añadieron 20 ml de medio MEM recién preparado (véase anteriormente) salvo porque el medio estaba suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS) al 0,1 % en lugar de con FBS al 10 %. Las células se incubaron en este medio de inanición durante toda una noche a 37 °C, en CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de la inanición de las células, se añadieron 3 µl de EGF humano recombinante 1 mg/ml (Biomol, 50349-1) a cada placa de 15 cm (concentración de EGF final = 150 ng/ml de medio). Las placas se incubaron a 37 °C, en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 10 minutos antes de recoger.

30

35

**Recogida de células.** Las células se recogieron por vertido aparte del medio que contiene EGF, lavado de cada placa de 15 cm una vez con 10 ml de tampón de PBS enfriado en hielo y raspando la placa con una espátula de goma con el fin de desprender las células. Las células se transfirieron dentro de tubos Falcon de 50 ml (Becton Dickinson, 352070) y se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm en un Heraeus Multifuge 3SR. El sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 50 ml de tampón de PBS enfriado en hielo. Después de centrifugación y de aspiración del sobrenadante los sedimentos celulares se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se

40

almacenaron después a -80 °C.

### 1.2 Preparación de lisados celulares

El lisado celular de HeLa se preparó por interrupción mecánica en solución tampón en condiciones suaves que mantienen la estructura y función de las proteínas.

- 5 Se llevaron a cabo las siguientes etapas:
- Descongelar el tejido rápidamente a temperatura ambiente o a 37 °C, después transferir tejido a una botella de vidrio que contiene el tampón de lisis 1x (uso de un vial lo suficientemente grande para usarse con homogeneizador Polytron PT 3100)
  - Lisar el órgano/tejido con 4 pulsos de 10 segundos a 5000-7000 rpm a 4 °C en la cámara fría
- 10
- Transferir el homogenado en tubos Falcon de 50 ml pre-enfriados
  - Incubar homogenado en hielo durante 30 minutos
  - Centrifugar células durante 10 minutos a 6.000 g a 4 °C (6.000 rpm en Sorvall SLA600, preenfriada)
  - Transferir sobrenadante a un tubo de UZ-policarbonato (Beckmann, 355654)
  - Centrifugar sobrenadante durante 1 hora a 145.000 g a 4 °C (40.000 rpm en Ti50.2, pre-enfriado)
- 15
- Guardar sobrenadante (retirar y descartar la mayoría de la fase lipídica si es posible), transferir sobrenadante dentro de una botella de vidrio y almacenar en hielo
  - Determinar concentración de proteínas por ensayo de Bradford (BioRad). Concentraciones de proteínas típicas están en el intervalo de 5-10 mg/ml.
  - Preparar alícuotas en tubos Falcon de 15 a 50 ml
- 20
- Congelar alícuotas en nitrógeno líquido y almacenarlas a -80 °C

#### Preparación de 100 ml de tampón de lisis 1x con NP40 al 0,8 %:

Combinar las siguientes soluciones de reactivos y añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 ml: 20 ml de tampón de lisis 5x (véase más adelante), 100 µl de DTT 1 M, 5 ml de NaF 0,5 M, 4 ml de NP40 al 20 %, 4 comprimidos libres de EGTA completos (cóctel inhibidor de proteasas, Roche Diagnostics, 1 873 580), añadir agua destilada hasta 100 ml.

25

**Tabla 4: Preparación de tampón de lisis 5x**

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

Estas soluciones se obtuvieron a partir de los siguientes suministradores:

- 30 Tris 1 M/HCl pH 7,5: Sigma, T-2663; glicerol al 87 %: Merck, n.º de cat.: 04091.2500; MgCl<sub>2</sub> 1 M: Sigma, M-1028; NaCl 5 M: Sigma, S-5150.

El tampón de lisis concentrado 5x se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó en alícuotas de 40 ml a -80 °C.

#### Preparación de soluciones de reserva usadas en este protocolo:

##### Preparación de una solución de reserva de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM:

Disolver 9,2 g de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> en 400 ml de agua destilada.

1) Ajustar el pH a 10,0 usando bien NaOH 1 N o bien HCl 1 N. El pH de partida de la solución de ortovanadato de sodio puede variar con lote. A pH 10,0 la solución será amarilla.

2) Hervir la solución hasta que se vuelve incolora (aproximadamente 10 minutos).

3) Enfriar a temperatura ambiente.

5 4) Reajustar el pH a 10,0 y repetir etapas 2 y 3 hasta que la solución permanezca incolora y el pH se establezca a 10,0.

5) Ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada.

6) Congelar alícuotas a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

**Preparación de solución de reserva de NaF 500 mM:**

10 Disolver 21,0 g de NaF (Sigma, S7920) en 500 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de un filtro de 0,22 µm y almacenar a 4 °C.

**Preparación de solución de NP40 al 20 %:**

Pesar 40,0 g de NP40 (Sigma, Igepal-CA630, número de catálogo: 13021). Añadir agua destilada hasta 200 g. Mezclar completamente y almacenar solución a temperatura ambiente.

**Preparación de solución de DTT 1 M:**

15 Disolver 7,7 g de DTT (Biomol, número de catálogo: 04010) en 50 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 µm y congelar alícuotas de 400 µl a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

**2. Reacciones de unión**

**2.1 Puesta en contacto de las "Kinobeads" (ligandos capturadores inmovilizados) con el lisado celular**

20 Las Kinobeads (ligandos capturadores inmovilizados) se pusieron en contacto con el lisado celular preparado a partir de células HeLa en condiciones que permiten la unión de las proteínas en el lisado a los ligandos. Las condiciones de unión estaban cerca de las fisiológicas eligiendo condiciones tampón adecuadas que conservan la función de las proteínas. Después de retirar proteínas no capturadas a través de un procedimiento de lavado suave las proteínas unidas se pusieron en contacto con un compuesto de prueba que condujo a la elución de las proteínas.

**2.1.1 Preparación de tampones de DP**

25

**Tabla 5: Preparación de tampón 5x-DP**

Sustancia:	Solución madre	Concentración final en tampón de lisis 1x	Añadir por 1 l tampón de lisis 5x
Tris/HCl a pH 7,5	1 M	50 mM	250 ml
Glicerol	87 %	5 %	288 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 M	1,5 mM	7,5 ml
NaCl	5 M	150 mM	150 ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 mM	1 mM	50 ml

El tampón de DP 5x se filtró a través de filtro de 0,22 µm y se almacenó en alícuotas de 40 ml a -80 °C. Estas soluciones se obtuvieron a partir de los siguientes suministradores: Tris 1,0 M/HCl a pH 7,5 (Sigma, T-2663), glicerol al 87 % (Merck, número de catálogo: 04091.2500); MgCl<sub>2</sub> 1,0 M (Sigma, M-1028); NaCl 5,0 M (Sigma, S-5150).

30 **Se prepararon los siguientes tampones de DP 1x:**

- Tampón DP 1x (para equilibrio de perlas)
- Tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 % (para equilibrio de perlas y primera etapa de lavado de perlas)
- Tampón de DP 1x/NP40 al 0,2 % (para la segunda etapa de lavado de perlas y para elución de compuesto)

35 • Tampón de DP 1x/inhibidores de proteasa (para primera etapa de dilución de lisado); añadir un comprimido inhibidor de proteasa por tampón de lisis de 25 ml (comprimido libre de EDTA, cóctel inhibidor de proteasa, Roche)

Diagnostics, 1 873 580)

- Tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 %/inhibidores de proteasa (para la segunda etapa de dilución de lisado)

**Ejemplo para preparación de tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 % (100 ml):**

5 Combinar las siguientes soluciones y reactivos y añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 ml: 20 ml de tampón DP 5x, 5 ml de NaF 0,5 M, 2 ml de NP40 al 20 %, 100 µl de DTT 1 M y añadir agua destilada hasta 100 ml. Todos los tampones contienen concentración final de DTT 1 mM.

**2.1.2 Lavado y equilibrio de perlas**

Las Kinobeads (Ejemplo 1) se prepararon para la reacción de unión lavando con un tampón adecuado y por equilibrio en el tampón.

10 Se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. Usar tubos Falcon de 15 ml para todas las etapas de lavado.

2. Usar 100 µl de KinoBeads por experimento (volumen de perlas sedimentadas): cantidades iguales de mezcla (25 ml) de cada tipo de perla acoplado con los siguientes 4 ligandos (densidad de acoplamiento de 1 µmol/ml): Bis VIII (CZC00001056), Purvalanol B (CZC00007097), derivado de PD173955 (CZC00007324) y CZC00008004.

15 3. Lavar perlas dos veces con 3 ml de DP 1x y una vez con 3 ml de tampón DP 1x/NP40 al 0,4 %. Durante cada etapa de lavado invertir tubos 3-5 veces, centrifugar 2 minutos a 1200 rpm a 4 °C en una centrifuga Heraeus. Los sobrenadantes son sobrenadantes aspirados y descartados.

Después de la última etapa de lavado preparar una suspensión 1:1 (volumen/volumen) con tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 %.

20 **2.1.3 Preparación de lisado celular diluido**

El lisado celular según se describe en la sección (1.2) se preparó para la reacción de unión por dilución en un tampón adecuado y limpiando por medio de una etapa de centrifugación. Se llevaron a cabo las siguientes etapas:

1. Usar un volumen de lisado celular correspondiente a 50 mg de proteína por experimento.

2. Descongelar el lisado rápidamente en un baño de agua a 37 °C, después limpiar la muestra en hielo.

25 3. Diluir el lisado de la siguiente manera:

1) diluir lisado con tampón de DP 1x/inhibidores de proteasa reduciendo concentración de detergente desde NP-40 al 0,8 % hasta NP-40 al 0,4 %.

2) diluir lisado adicionalmente con tampón 1x DP/NP40 al 0,4 %/inhibidores de proteasa alcanzando una concentración de proteína final de 5 mg/ml.

30 4. Transferir lisado diluido dentro de tubo UZ-policarbonato (Beckmann, 355654).

5. Limpiar lisado diluido por ultracentrifugación (20 minutos, 4 °C, 100.000 g, rotor T150.2, ultracentrifuga pre-enfriada).

6. Guardar sobrenadante y mantenerlo en hielo.

**2.1.4 Reacción de unión y lavado**

35 Las perlas lavadas y equilibradas de la sección (2.1.2) se pusieron en contacto con el lisado celular diluido a partir de la etapa (2.1.3) con el fin de permitir unión de proteínas a los ligandos. Se retiraron proteínas no específicamente unidas por lavado suave con el fin de reducir la unión precedente.

1. Combinar lisado aclarado diluido con 100 µl de KinoBeads lavadas en tubos Falcon de 15 ml o de 50 ml.

2. Incubar durante 2 horas a 4 °C, rotar en ROTO SHAKE GENIE (Scientific Industries, Inc.) en cámara fría.

40 3. Después de incubación centrifugar durante 3 minutos a 1.200 rpm en una centrifuga Heraeus o equivalente a 4 °C.

4. Retirar sobrenadante cuidadosamente sin perder las perlas.

5. Transferir las perlas a columnas Mobicol con filtro de 90 µm (MoBiTec, Goettingen, n.º de catálogo: M1002-90).

6. Lavar perlas con 10 ml de tampón de DP 1x/NP-40 al 0,4 % y los 5 ml del tampón de DP 1x/NP-40 al 0,2 %.

7. Dejar que el tampón de lavado corra a través de la columna completamente antes de proceder con la etapa siguiente.

8. Situar la columna en tubo Eppendorf y centrifugarlos durante 1 minuto a 800 rpm a 4 °C.

Cerrar columnas con tapa inferior.

## 5 2.1.5. Elución de proteínas

1. Añadir 60 µl de tampón de muestra SDS NuPAGE 2x (Invitrogen, NP0007; diluir tampón 4x 1:1 con agua destilada antes de usar).

2. Incubar muestras durante 30 minutos a 50 °C.

3. Abrir la tapa interior de columna y centrifugar columnas MobiTec 1 minuto a 2000 rpm separando eluato de perlas.

10 4. Añadir 1/10 de volumen de yodoacetamida a 200 mg/ml, incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, proteger de luz. Esta reacción conduce a la alquilación de cisteínas para análisis de espectrometría de masas.

5. Antes de cargar muestras en el gel, centrifugar muestras durante 5 minutos a 15.000 rpm con el fin de retirar precipitados.

6. Para separación de proteínas aplicar 60 µl a gel Bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE (Invitrogen, NP0335).

## 15 2.1.6 Preparación de soluciones de reserva usadas en este protocolo

### Preparación de una solución de reserva de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM:

1. Disolver 9,2 g de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> en 400 ml de agua destilada.

2. Ajustar el pH a 10,0 usando bien NaOH 1 N o bien HCl 1 N. El pH de partida de la solución de ortovanadato de sodio puede variar con lote. A pH 10,0 la solución será amarilla.

20 3. Hervir la solución hasta que se vuelve incolora (aproximadamente 10 minutos).

4. Enfriar a temperatura ambiente.

5. Reajustar el pH a 10,0 y repetir etapas 2 y 3 hasta que la solución permanezca incolora y el pH se estabilice a 10,0.

6. Ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada.

7. Congelar alícuotas a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

### 25 Preparación de una solución de reserva de NaF 500 mM:

Disolver 21,0 g de NaF (Sigma, S7920) en 500 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de un filtro de 0,22 µm y almacenar a 4 °C.

### Preparación de una solución de NP40 al 20 %:

30 Pesar 40,0 g de NP40 (Sigma, Igepal-CA630, número de catálogo: 13021). Añadir agua destilada hasta 200 g. Mezclar completamente y almacenar solución a temperatura ambiente.

### Preparación de una solución de DTT 1 M:

Disolver 7,7 g de DTT (Biomol, número de catálogo: 04010) en 50 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 µm y congelar alícuotas de 400 µl a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

### Preparación de solución de reserva de yodoacetamida (200 mg/ml):

35 Disolver 2,0 g de yodoacetamida (Sigma, S7920) en 10 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 µm y congelar alícuotas de 400 µl a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

## 2.2 Inmunoprecipitación usando perlas de anticuerpos anti-fosfotirosina

### 2.2.1 Tampones y perlas de anticuerpos antifosfotirosina

40 Todos los tampones usados en el experimento de inmunoprecipitación con anticuerpos antifosfotirosina eran idénticos a aquellos usados para el experimento de Kinobeads (véase anteriormente) salvo porque no se añadió ningún DTT y se añadieron 50 µl de ácido okadaico 1 mM (Biomol, E1-181; inhibidor de fosfatasa) de tal manera que se alcanzó una concentración final de ácido okadaico de 500 nM. Se obtuvieron perlas de anticuerpos antifosfotirosina (perlas de

agarosa con anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 recombinante acoplado covalentemente) a partir de Biomol (numero de catálogo: 16-199).

### 2.2.2 Lavado y equilibrio de perlas anti-fosfotirosina

5 Las perlas antifosfotirosina se prepararon para la reacción de unión lavando con un tampón adecuado y por equilibrio en un tampón.

1. Usar tubos Falcon de 15 ml para todas las etapas de lavado.

2. Usar 100 µl de perlas de anti-fosfotirosina por experimento.

10 3. Lavar perlas dos veces con 3 ml de tampón de DP 1x (-DTT) y una vez con 3 ml de tampón DP 1x/NP40 al 0,4 % (-DTT). Durante cada etapa de lavado invertir tubos 3-5 veces, centrifugar 2 minutos a 1200 rpm a 4 °C en una centrífuga Heraeus. Los sobrenadantes se aspiran y se descartan.

Después de la última etapa de lavado preparar una suspensión 1:1 (volumen/volumen) con tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 %.

### 2.2.3 Preparación de lisado celular diluido

15 El lisado celular se preparó para la reacción de unión por dilución en un tampón adecuado y limpiando por medio de una etapa de centrifugación.

1. Uso de un volumen de lisado celular correspondiente a 50 mg de proteína por experimento.

2. Descongelar el lisado rápidamente en un baño de agua a 37 °C, después limpiar la muestra en hielo.

3. Diluir el lisado en la siguiente manera:

20 Primera etapa de dilución: diluir lisado con tampón DP 1x/inhibidores de proteasas/ácido okadaico/sin DTT reduciendo concentración de detergente desde NP-40 al 0,8 % hasta NP-40 al 0,4 %.

Segunda etapa de dilución: diluir lisado adicionalmente con tampón DP 1x/NP40 al 0,4 %/inhibidores de proteasas/ácido okadaico/sin DTT alcanzando una concentración de proteína final de 5 mg/ml.

(Nota: La segunda etapa de dilución solamente se requiere si la concentración de proteínas del lisado después de la primera etapa de dilución es más alta de 5 mg/ml).

25 4. Transferir lisado diluido en tubo UZ-policarbonato (Beckmann, 355654).

5. Limpiar lisado diluido por ultracentrifugación (20 minutos, 4 °C, 100.000 g, rotor T150.2, ultracentrifuga pre-enfriada).

6. Guardar sobrenadante y mantenerlo en hielo.

### 2.2.4 Reacción de unión y etapas de lavado

30 Las perlas antifosfotirosina lavadas y equilibradas se pusieron en contacto con el lisado celular diluido de la sección 2.2.3 con el fin de permitir la unión de las proteínas a las perlas antifosfotirosina. Se retiraron proteínas no específicamente unidas por lavado suave con el fin de reducir la unión precedente.

1. Combinar lisado aclarado diluido con 100 µl de perlas anti-fosfotirosina lavadas en un tubo Falcon de 15 ml o 50 ml.

2. Incubar durante 4 horas a 4 °C, rotar en ROTO SHAKE GENIE (Scientific Industries, Inc.) en la cámara fría.

35 3. Después de incubación, centrifugar durante 3 minutos a 1.200 rpm en una centrífuga Heraeus o equivalente a 4 °C.

4. Retirar sobrenadante cuidadosamente sin perder las perlas.

5. Transferir las perlas a una columna Mobicol con filtro de 90 µm (MoBiTec, Goettingen, n.º de catálogo: M1002-90).

6. Lavar perlas con 10 ml de tampón de DP 1x/NP-40 al 0,4 %/sin DTT y 5 ml del tampón de DP 1x/NP-40 al 0,2 %/sin DTT.

40 7. Dejar que el tampón de lavado corra a través de la columna completamente antes de proceder con la etapa siguiente.

8. Situar la columna en tubo Eppendorf y centrifugarlos durante 1 minuto a 800 rpm a 4 °C.

Cerrar columnas con tapa inferior.



### 2.2.5 Elución de proteínas unidas

1. Añadir 60 µl de tampón de muestra SDS NuPAGE 2x (Invitrogen, NP0007; diluir tampón 4x 1:1 con agua destilada antes de usar).
2. Incubar muestras durante 30 minutos a 50 °C.
- 5 3. Abrir tapa inferior de columna y centrifugar columnas MobiTec 1 minuto a 2000 rpm separando el eluato de las perlas.
4. Añadir 1/10 de volumen de yodoacetamida a 200 mg/ml, incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, proteger de luz. Esta reacción conduce a la alquilación de cisteínas para análisis de espectrometría de masas.
- 10 5. Antes de cargar muestras en el gel, centrifugar muestras durante 5 minutos a 15.000 rpm con el fin de retirar precipitados.
6. Para separación de proteínas aplicar 60 µl a gel Bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE (Invitrogen, NP0335).

### 3. Análisis espectrométrico de masas de enzimas eluidas (por ejemplo cinasas)

#### Descripción de péptidos proteotípicos

15 La digestión trípica de una mezcla de proteína separada de SDS-PAGE genera para cada proteína numerosos fragmentos peptídicos distintos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Estos péptidos difieren en compatibilidad con la plataforma analítica basada en espectrometría de masas usada para identificación de proteínas (ID), aquí espectrometría de masas en tándem de ionización de electropulverización de cromatografía líquida en fase reversa (RP-CL-EM/EM). Como un resultado, las frecuencias peptídicas para péptidos de la misma proteína fuente difieren en un gran grado, llamándose los péptidos más frecuentemente observados que contribuyen "típicamente" a la

20 identificación de esta proteína péptidos "proteotípicos". Así, un "péptido proteotípico" es un péptido bien observable experimentalmente que identifica únicamente una proteína específica o una isoforma de proteína.

#### Ventajas de péptidos proteotípicos

25 El uso de péptidos proteotípicos para identificación de proteínas permite la identificación rápida y centrada y la cuantificación de múltiples proteínas objetivo conocidas centrando el procedimiento de identificación de proteínas en un rastreo para la presencia de péptidos de firma ricos en información.

#### Identificación experimental de péptidos proteotípicos

Una estrategia generando una lista de péptidos proteotípicos es recoger datos de identificación de péptidos empíricamente y buscar el conjunto de datos para péptidos observados comúnmente que identifican únicamente una proteína.

30 Para cada entrada de proteína de base de datos IPI con al menos 10 identificaciones inequívocas en el conjunto de datos CZ (ID de multipéptidos o ID de péptidos individuales verificados manualmente), se calculan las frecuencias peptídicas para los péptidos que contribuyen. Solamente se consideran los mejores apareamientos péptido-a-espectro, específicos de acuerdo con el motor de búsqueda en bases de datos Mascot™ (Matrix Science).

35 Para definición de los péptidos proteotípicos para una proteína específica, los péptidos se ordenan descendiendo la frecuencia peptídica y se calcula una presencia peptídica acumulativa: Este valor da para cada péptido la proporción de identificaciones donde este péptido o cualquiera de los péptidos con una frecuencia peptídica más alta estaba presente. Los péptidos proteotípicos se definen usando un corte para presencia acumulativa del 95 %, es decir al menos el 95 % de los eventos de identificación para esta proteína se basaron en al menos un péptido proteotípico.

### 3.1 Digestión de proteínas y preparación de muestras anteriores a análisis espectrométricos de masas

40 Las proteínas se concentraron, se separaron en geles NuPAGE® Novex al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal. Los carriles del gel se cortaron sistemáticamente a través del intervalo de separación completo en < 48 láminas (bandas y regiones interbanda) y se sometieron a digestión trípica en gel esencialmente como se describe por Shevchenko y cols., 1996, Analytical Chemistry 68: 850-858. Brevemente, las

45 almohadillas de gel se destiñeron durante toda una noche en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 5 mM en EtOH al 50 %, se digirieron durante 4 horas con tripsina a 12,5 ng/µl en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 5 mM. Los péptidos se extrajeron con ácido fórmico al 1 %, se transfirieron en una segunda placa de 96 pocillos y se secaron al vacío. Los péptidos secos se resuspendieron en 10 µl de ácido fórmico al 0,1 % y se inyectaron 5 µl en el sistema LC-EM/EM para identificación de proteínas.

### 3.2 Adquisición de datos de espectrometría de masas

50 Las muestras peptídicas se inyectaron en un sistema de nano-CL (CapLC, Waters o Ultimate, Dionex) que se acopló directamente bien a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro,

Micromass o QSTAR Pulsar, Sciex) o bien a un espectrómetro de masas de atrapamiento iónico (LCQ Deca XP, LTQ, Thermo-Finnigan). Los péptidos se separan en el sistema de CL usando un gradiente de disolventes acuosos y orgánicos con un tiempo de gradiente típico de entre 15 y 45 minutos. El disolvente A era acetonitrilo al 5 % en ácido fórmico al 0,1 % y el disolvente B era acetonitrilo al 70 % en ácido fórmico al 0,1 %.

### 5 3.3 Identificación de proteínas

La masa de los péptidos y los datos de fragmentación generados en los experimentos de CL-EM/EM se usaron consultando una versión curada de forma interna de la base de datos de secuencia de proteínas (EBI) del Índice Internacional de Proteínas (IPI). Las proteínas se identificaron correlacionando la masa de péptidos medida y los datos de fragmentación con los mismos datos computados a partir de las entradas en la base de datos usando la herramienta de software Mascot (Matrix Science; Perkins y cols., 1999, Electrophoresis 20: 3551-3567). Los criterios de búsqueda variaron dependiendo de qué espectrómetro de masas se usó para el análisis.

### 4. Resultados

Los resultados del experimento de Signaloquinoma se muestran en la Figura 2. Esta figura muestra una comparación de fármacos expuestos consecutivamente usando Kinobeads (círculo central) e inmunoprecipitaciones convencionales con perlas de anticuerpos antifosfotirosinas (círculo derecho). En el experimento de Kinobeads se identificaron un total de 626 proteínas, de estas 100 eran cinasas. En el experimento de inmunoprecipitación (IP) se identificaron un total de 503 proteínas, 12 de estas eran cinasas. Las cinasas identificadas con ambos experimentos (cinasas comunes) se enumeran en el área que se superpone. El resultado muestra que con las Kinobeads se identificaron significativamente más cinasas (100 cinasas) comparado con las perlas de anticuerpos anti-fosfotirosinas (12 cinasas).

Las cinasas identificadas para ambas aproximaciones experimentales se enumeran en las tablas siguientes. Además, las secuencias de péptidos proteotípicos para las cinasas se enumeran en tablas separadas.

**Tabla 6:** Las cinasas se identificaron después de inmunoprecipitación (IP). Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario).

Identificación de cinasas	Nombre de cinasa	Puntuación	Número de péptidos identificados	Péptido proteotípico experimental disponible e identificado
1	DNAPK	606	20	X
2	TIF1b	202	6	X
3	p38a	343	11	X
4	CDK2	196	4	X
5	TYK2	77	3	X
6	LYN	67	2	X
7	EGFR	2463	162	X
8	FAK	1203	51	X
9	ACK	160	6	
10	KHS2	65	2	

**Tabla 7:** Secuencias peptídicas para cinasas identificadas después de inmunoprecipitación (IP, véase Tabla 6). Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y con Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario).

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
IP	CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
IP	CDK2	IGEGTYGVVYK
IP	CDK2	FMDASALTGIIPLLIK
IP	DNAPK	HGDLDPDIQIK
IP	DNAPK	LACDVDQVTR
IP	DNAPK	AALSALLESFLK
IP	DNAPK	DQNILLGTTYR
IP	DNAPK	FMNAVFFLLPK
IP	DNAPK	VTELALTASDR
IP	DNAPK	LGASLAFNNIYR
IP	DNAPK	LNESTFDTQITK
IP	DNAPK	QLFSSSLFSGILK
IP	DNAPK	NILEESLCELVAK
IP	DNAPK	TVSLLDENNVSSYLSK
IP	DNAPK	TVGALQVLGTEAQSSLLK
IP	EGFR	VLGSGAFGTVYK
IP	EGFR	IPLNLQIIR
IP	EGFR	GDSFTHTPPLDPQELDILK
IP	FAK	LGDFGLSR
IP	FAK	FLQEALTMR
IP	FAK	FFEILSPVYR
IP	FAK	LLNSDLGELINK
IP	FAK	TLLATVDETIPLLPASTHR
IP	HER2/ErbB2	VLGSGAFGTVYK
IP	LYN	EEPIYIITEYMAK
IP	p38a	LTDDHVQFLIYQILR
IP	p38a	NYIQSLTQMPK
IP	p38a	LTGTPPAYLINR
IP	TIF1b	IVAERPGTNSTGPAPMAPPR
IP	TYK2	HGIPLEEVAK
IP	TYK2	LSDPGVGLGALSR

**Tabla 8:** Cinasas identificadas después de la exposición consecutiva de fármacos con Kinobeads. Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y con Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario).

Identificación de cinasa	Nombre de cinasa	Puntuación	Número de péptidos identificados	Péptido proteotípico experimental disponible e identificado	Identificado también en IP (véase tabla 1)
1	DNAPK	6592	263	X	IP
2	FRAP	356	9	X	
3	ATM	113	3	X	
4	ATR	91	2	X	
5	CDC2	309	11	X	
6	YES	1747	100	X	
7	CaMK2d	1003	41	X	
8	JNK1	1011	45	X	
9	JNK2	317	11	X	
10	CaMK2g	811	21	X	
11	p38a	1145	90	X	IP
12	TNK1	81	4	X	
13	GSK3B	1408	81	X	
14	FYN	1845	115	X	
15	SRC	1780	91	X	
16	Erk2	1677	200	X	
17	CaMK2b	122	3	X	
18	JNK3	590	26	X	
19	Coal	316	11	X	
20	GSK3A	1390	117	X	
21	AurA	198	8	X	
22	RIPK2	634	19	X	
23	CDK2	1172	50	X	IP
24	ADCK1	88	4		
25	CK1a	566	21	X	
26	GAK	1995	61	X	
27	AAK1	123	3	X	
28	CDK9	379	13	X	
29	CK1d	206	7	X	

(continuación)

Identificación de cinasa	Nombre de cinasa	Puntuación	Número de péptidos identificados	Péptido proteotípico experimental disponible e identificado	Identificado también en IP (véase tabla 1)
30	Erk1	566	26	X	
31	NEK9	1947	102	X	
32	TYK2	222	6	X	IP
33	AMPKa1	93	3	X	
34	LYN	1783	67	X	IP
35	AurB	287	10	X	
36	CK1e	314	10	X	
37	EGFR	165	3	X	IP
38	EphB2	1165	43	X	
39	ALK2	299	11	X	
40	DDR1	759	28	X	
41	TBK1	2042	72	X	
42	CSK	1584	102	X	
43	TEC	50	2		
44	ZAK	499	16	X	
45	ALK4	472	9	X	
46	ADCK3	309	8	X	
47	MAP2K5	795	32		
48	EphB4	2237	165	X	
49	ARG	2128	69	X	
50	FER	2762	130	X	
51	RSK2	2100	99	X	
52	CK2a2	930	32	X	
53	BMPR1A	676	19	X	
54	TGFBR1	478	15	X	
55	EphA5	114	4	X	
56	BRK	107	3		
57	FAK	1933	95	X	IP
58	ILK	209	6	X	
59	CDK5	699	27	X	
60	DDR2	1073	44	X	

(continuación)

Identificación de cinasa	Nombre de cinasa	Puntuación	Número de péptidos identificados	Péptido proteotípico experimental disponible e identificado	Identificado también en IP (véase tabla 1)
61	JAK1	1083	31		
62	MYT1	152	5		
63	PKCd	53	4		
64	RSK3	2227	117	X	
65	Weel	550	18	X	
66	ACTR2	193	5		
67	MAP3K2	383	15		
68	ACTR2B	82	2		
69	WeelB	550	18	X	
70	ABL	1133	35	X	
71	MET	503	12	X	
72	BRAF	361	7		
73	INSR	1807	64	X	
74	KHS1	393	12		
75	PAK4	448	15	X	
76	PKD1	58	2		
77	PKD2	58	2	X	
78	IGF1R	935	28	X	
79	PHKg2	519	16	X	
80	CaMKK2	199	5	X	
81	MAP2K2	294	6	X	
82	TGFbR2	49	2		
83	Fusionada	42	2		
84	EphA2	2099	90	X	
85	ACK	169	4		IP
86	NLK	46	2		
87	CDK7	623	20	X	
88	CHK2	58	2	X	
89	KHS2	60	4		IP
90	MLK3	59	1	X	
91	PKCe	53	4	X	

(continuación)

Identificación de cinasa	Nombre de cinasa	Puntuación	Número de péptidos identificados	Péptido proteotípico experimental disponible e identificado	Identificado también en IP (véase tabla 1)
92	PKCh	53	4	X	
93	PYK2	106	3	X	
94	TA02	120	3		
95	CK1g1	45	2	X	
96	LIMK1	271	6		
97	MAP2K1	480	14		
98	HRI	52	1		
99	SIK	36	1		
100	Erk7	67	1		
101	NEK2	145	4		
102	NEK7	175	5		
103	BMPR1B	179	5	X	
104	MAP2K3	133	5		
105	FGFR2	514	17		

**Tabla 9: Secuencias de péptidos proteotípicos para cinasas identificadas después de exposiciones consecutivas de fármacos con Kinobeads (véase Tabla 8)**

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	AAK1	ADIWALGCLLYK
KinobeadDP	ABL	GQGESDPLDHEPAVSPLLPR
KinobeadDP	ABL	WTAPESLAYNK
KinobeadDP	ABL	VADFGLSR
KinobeadDP	ABL	NGQGWVPSNYITPVNSLEK
KinobeadDP	ADCK3	DKLEYFEERPFAAASIGQVHLAR
KinobeadDP	ADCK3	SFTDLYIQIIR
KinobeadDP	ADCK3	VALLDFGATR
KinobeadDP	ADCK3	AVLGSSPFLSEANAER
KinobeadDP	ALK2	WFSDPTLTSLAK
KinobeadDP	ALK4	TIVLQEIIK
KinobeadDP	ALK4	EAEIYQTVMLR
KinobeadDP	AMPKa1	IGHYILGDTLGVGTFGK
KinobeadDP	ARG	AASSSSVVPYLPR
KinobeadDP	ARG	ESESSPGQLSISLR
KinobeadDP	ARG	GAQASSGSPALPR
KinobeadDP	ARG	VLGYNQNGEWSEVR
KinobeadDP	ARG	VPVLISPTLK
KinobeadDP	ARG	WTAPESLAYNTFSIK
KinobeadDP	ARG	VADFGLSR
KinobeadDP	ARG	NGQGWVPSNYITPVNSLEK
KinobeadDP	ATM	LVVNLLQLSK
KinobeadDP	ATR	APLNETGEVVNEK
KinobeadDP	AurA	SKQPLPSAPENNP EEELASK
KinobeadDP	AurA	VEFTFPDFVTEGAR
KinobeadDP	AurB	IYLILEYAPR
KinobeadDP	AurB	SNVQPTAAPGQK
KinobeadDP	BMPR1A	FNSDTNEVDVPLNTR
KinobeadDP	BMPR1A	WNSDECLR
KinobeadDP	BMPR1A	YEGSDFQCK
KinobeadDP	BMPR1A	YMAPEVLDESLNK
KinobeadDP	BMPR1A	ETEIYQTVLMR
KinobeadDP	BMPR1A	HENILGFIAADIK



(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	BMPR1A	VFFTTEEASWFR
KinobeadDP	BMPR1A	YGEVWMGK
KinobeadDP	BMPR1B	ETEIYQTVLMR
KinobeadDP	BMPR1B	HENILGFIAADIK
KinobeadDP	BMPR1B	VFFTTEEASWFR
KinobeadDP	BMPR1B	YGEVWMGK
KinobeadDP	CaMK2b	LTQYIDGQGRPR
KinobeadDP	CaMK2b	NLINQMLTINPAK
KinobeadDP	CaMK2b	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK
KinobeadDP	CaMK2b	DLKPENLLLASK
KinobeadDP	CaMK2d	FYFENALSK
KinobeadDP	CaMK2d	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK
KinobeadDP	CaMK2d	DLKPENLLLASK
KinobeadDP	CaMK2g	FYFENLLSK
KinobeadDP	CaMK2g	LTQYIDGQGRPR
KinobeadDP	CaMK2g	NLINQMLTINPAK
KinobeadDP	CaMK2g	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK
KinobeadDP	CaMK2g	DLKPENLLLASK
KinobeadDP	CaMKK2	GPIEQVYQEIAILK
KinobeadDP	CaMKK2	LAYNENDNTYYAMK
KinobeadDP	CDC2	DLKPQNLLIDDKGTIK
KinobeadDP	CDC2	NLDENGLDLLSK
KinobeadDP	CDC2	SPEVLLGSAR
KinobeadDP	CDC2	IGEGTYGVVYK
KinobeadDP	CDK2	APELLGCK
KinobeadDP	CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
KinobeadDP	CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
KinobeadDP	CDK2	IGEGTYGVVYK
KinobeadDP	CDK5	IGEGTYGTVFK
KinobeadDP	CDK5	SFLFQLLK
KinobeadDP	CDK7	APELLFGAR
KinobeadDP	CDK7	VPFLPGDSDLQLTR
KinobeadDP	CDK9	GSQITQQSTNQSR

(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	CDK9	IGQGTFGGEVFK
KinobeadDP	CK1e	HPQLLYESK
KinobeadDP	CK1a	LFLIDFGLAK
KinobeadDP	CK1d	FDDKPDYSYLR
KinobeadDP	CK1d	GNLVYIIDFGLAK
KinobeadDP	CK1d	TVLLLADQMISR
KinobeadDP	CK1e	FDDKPDYSYLR
KinobeadDP	CK1e	GNLVYIIDFGLAK
KinobeadDP	CK1e	TVLLLADQMISR
KinobeadDP	CK1g1	TLFTDLFEK
KinobeadDP	CK2a1	GGPNIITLADIVKDPVSR
KinobeadDP	CK2a1	QLYQTLTDYDIR
KinobeadDP	CK2a1	TPALVFEHVNNTDFK
KinobeadDP	CK2a2	HLVSPEALDLLDKLLR
KinobeadDP	CK2a2	LIDWGLAEFYHPAQEYNVR
KinobeadDP	CK2a2	QLYQILTDFDIR
KinobeadDP	CK2a2	TPALVFEYINNTDFK
KinobeadDP	CK2a2	VLGTEELYGYLK
KinobeadDP	CSK	HSNLVQLLGVIVEEK
KinobeadDP	CSK	LLYPPETGLFLVR
KinobeadDP	CSK	VMEGTVAQAQDEFYR
KinobeadDP	DDR1	AQPFGQLTDEQVIENAGEFFR
KinobeadDP	DDR1	NCLVGENFTIK
KinobeadDP	DDR1	NLYAGDYR
KinobeadDP	DDR1	QVYLSRPPACPQGLYELMLR
KinobeadDP	DDR1	WMAWECILMGK
KinobeadDP	DDR1	YLATLNFVHR
KinobeadDP	DDR2	DVAVEEFPR
KinobeadDP	DDR2	FMATQIASGMK
KinobeadDP	DDR2	HEPPNSSSSDVR
KinobeadDP	DDR2	IFPLRPDYQEPSR
KinobeadDP	DDR2	NLYSGDYR
KinobeadDP	DDR2	QTYLPQAICPDSVYK

(continuación)

<b>EXPERIMENTO</b>	<b>NOMBRE DE CINASA</b>	<b>PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO</b>
KinobeadDP	DDR2	WMSWESILLGK
KinobeadDP	DDR2	YLSSLNFVHR
KinobeadDP	DNAPK	AALSALLESFLK
KinobeadDP	DNAPK	DQNILLGTTYR
KinobeadDP	DNAPK	FMNAVFFLLPK
KinobeadDP	DNAPK	FVPLLPGNR
KinobeadDP	DNAPK	GLSSLLCNFTK
KinobeadDP	DNAPK	HGDLPDIIQIK
KinobeadDP	DNAPK	INQVFHGCITEGNELTK
KinobeadDP	DNAPK	IPALDLLIK
KinobeadDP	DNAPK	LACDVDQVTR
KinobeadDP	DNAPK	LAGANPAVITCDELLLGHEK
KinobeadDP	DNAPK	LGASLAFNNIYR
KinobeadDP	DNAPK	LGNPIVPLNIR
KinobeadDP	DNAPK	LLEEALLR
KinobeadDP	DNAPK	LNESTFDTQITK
KinobeadDP	DNAPK	LPLISGFYK
KinobeadDP	DNAPK	LPSNTLDR
KinobeadDP	DNAPK	LQETLSAADR
KinobeadDP	DNAPK	MSTSPEAFLALR
KinobeadDP	DNAPK	NILEESLCELVAK
KinobeadDP	DNAPK	NLLIFENLIDLK
KinobeadDP	DNAPK	NLSSNEAISLEEIR
KinobeadDP	DNAPK	QITQSALLAEAR
KinobeadDP	DNAPK	QLFSSLFSGILK
KinobeadDP	DNAPK	SLGPPQGEEDSVPR
KinobeadDP	DNAPK	SQGCSEQVLTVLK
KinobeadDP	DNAPK	TVGALQVLGTEAQSSLLK
KinobeadDP	DNAPK	TVSLLDENNVSYSLSK
KinobeadDP	DNAPK	VCLDIYK
KinobeadDP	DNAPK	VTELALTASDR
KinobeadDP	DNAPK	VVQMLGSLGGQINK
KinobeadDP	EGFR	GDSFTHTPPLDPQELDILK

(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	EphA2	DGEFSVLQLVGMLR
KinobeadDP	EphA2	FADIVSILDK
KinobeadDP	EphA2	LPSTSGSEGVPFR
KinobeadDP	EphA2	NILVNSNLVCK
KinobeadDP	EphA2	VSDFGLSR
KinobeadDP	EphA5	WTAPEAIAFR
KinobeadDP	EphA5	VSDFGLSR
KinobeadDP	EphB2	AGAIYVFQVR
KinobeadDP	EphB2	FGQIVNTLDK
KinobeadDP	EphB2	TFPNWMENPWVK
KinobeadDP	EphB2	VDTIAADESFSQVDLGGGR
KinobeadDP	EphB2	NILVNSNLVCK
KinobeadDP	EphB2	VSDFGLSR
KinobeadDP	EphB4	APSGAVLDYEVK
KinobeadDP	EphB4	FPQVVSALDK
KinobeadDP	EphB4	LNDGQFTVIQLVGMLR
KinobeadDP	EphB4	WTAPEAIAFR
KinobeadDP	EphB4	NILVNSNLVCK
KinobeadDP	EphB4	VSDFGLSR
KinobeadDP	Erk1	NYLQSLPSK
KinobeadDP	Erk1	APEIMLNSK
KinobeadDP	Erk1	YIHSANVLHR
KinobeadDP	Erk1	ICDFGLAR
KinobeadDP	Erk2	FRHENIIGINDIIR
KinobeadDP	Erk2	GQVFDVGPR
KinobeadDP	Erk2	LKELIFEETAR
KinobeadDP	Erk2	NYLLSLPHK
KinobeadDP	Erk2	VADPDHDHTGFLTEYVATR
KinobeadDP	Erk2	APEIMLNSK
KinobeadDP	Erk2	YIHSANVLHR
KinobeadDP	Erk2	ICDFGLAR
KinobeadDP	FAK	FFEILSPVYR
KinobeadDP	FAK	FLQEALTMR

(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	FAK	LLNSDLGELINK
KinobeadDP	FAK	TLLATVDETIPLLPASTHR
KinobeadDP	FAK	LGDFGLSR
KinobeadDP	FER	LQDWELR
KinobeadDP	FER	QEDGGVYSSSGLK
KinobeadDP	FER	SGVLLNPIPK
KinobeadDP	FER	WTAPEALNYGR
KinobeadDP	FRAP	GPTPAILESLSINNK
KinobeadDP	FRAP	VLGLLGALDPYK
KinobeadDP	FYN	EVLEQVER
KinobeadDP	FYN	WTAPEAALYGR
KinobeadDP	FYN	LIEDNEYTAR
KinobeadDP	FYN	GSLLDFLK
KinobeadDP	FYN	IADFLAR
KinobeadDP	GAK	ALVEEEITR
KinobeadDP	GAK	AMLQVNPEER
KinobeadDP	GAK	AVVMTPVPLFSK
KinobeadDP	GAK	IAVMSFPAEGVESALK
KinobeadDP	GAK	TPEIIDLYSNFPIGEK
KinobeadDP	GSK3A	VINGSGFGVVYQAR
KinobeadDP	GSK3A	VTTVATLGQGP
KinobeadDP	GSK3A	YFFYSSGEK
KinobeadDP	GSK3B	LLEYTPTAR
KinobeadDP	GSK3B	LYMYQLFR
KinobeadDP	GSK3B	VINGSGFGVVYQAK
KinobeadDP	GSK3B	YFFYSSGEK
KinobeadDP	IGF1R	AENGP
KinobeadDP	IGF1R	HSHALVLSFLK
KinobeadDP	IGF1R	MYFAFNP
KinobeadDP	IGF1R	TTINNEYNYR
KinobeadDP	IF1R	VAGLESGLDFPNLTVIR
KinobeadDP	IGF1R	DIYETDYR
KinobeadDP	IGF1R	IEFLNEASVMK

(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	IGFIR	IGDFGMTR
KinobeadDP	ILK	MYAPAWVAPEALQK
KinobeadDP	INSR	DLLGFMLFYK
KinobeadDP	INSR	ELGQGSFGMVEGNAR
KinobeadDP	INSR	ESLVISGLR
KinobeadDP	INSR	TIDSVTSAQELR
KinobeadDP	INSR	TVNESASLR
KinobeadDP	INSR	WEPYWPPDFR
KinobeadDP	INSR	DIYETDYR
KinobeadDP	INSR	IEFLNEASVMK
KinobeadDP	INSR	WMAPESLK
KinobeadDP	INSR	IGDFGMTR
KinobeadDP	JNK1	NIIGLLNVFTPQK
KinobeadDP	JNK1	APEVILGMGYK
KinobeadDP	J-NK1	ILDFGLAR
KinobeadDP	JNK2	NIISLLNVFTPQK
KinobeadDP	JNK2	APEVILGMGYK
KinobeadDP	JNK2	ILDFGLAR
KinobeadDP	JNK3	NIISLLNVFTPQK
KinobeadDP	JNK3	APEVILGMGYK
KinobeadDP	JNK3	ILDFGLAR
KinobeadDP	LYN	EEPIYIITEYMAK
KinobeadDP	LYN	GSLLDFLK
KinobeadDP	LYN	IADFGLAR
KinobeadDP	MAP2K2	ISELGAGNGGVVTK
KinobeadDP	MAP2K2	YPIPPDAK
KinobeadDP	MET	AFFMLDGILSK
KinobeadDP	MET	DLIGFGLQVAK
KinobeadDP	MLK3	ITVQASPLDR
KinobeadDP	NEK9	AGGGAAEQEELHYIPIR
KinobeadDP	NEK9	LGINLLGGPLGK
KinobeadDP	NEK9	LQQENLQIFTQLQK
KinobeadDP	NEK9	SSTVTEAPIAVVTSR

(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	NEK9	TSEVYVWGGGK
KinobeadDP	p38a	LTGTPPAYLINR
KinobeadDP	p38a	NYIQSLTQMPK
KinobeadDP	p38a	SLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVK
KinobeadDP	p38a	LTDDHVQFLIYQILR
KinobeadDP	p38a	ILDFGLAR
KinobeadDP	PAK4	AALQLVVDPGDPR
KinobeadDP	PHKg2	LTAEQALQHPPFER
KinobeadDP	PHKg2	SLLEAVSFLHANNIVHR
KinobeadDP	PHKg2	VAVWTVLAAGR
KinobeadDP	PHKg2	LSPEQLEEVR
KinobeadDP	PYK2	EIITSILLSGR
KinobeadDP	PYK2	EVGLDLFFPK
KinobeadDP	PYK2	VLANLAHPPAE
KinobeadDP	PYK2	LGDFGLSR
KinobeadDP	RIPK2	CLIELEPVLR
KinobeadDP	RIPK2	SLPAPQDNDFLSR
KinobeadDP	RIPK2	SPSLNLLQNK
KinobeadDP	RIPK2	TQNILLDNEFHVK
KinobeadDP	RSK2	EASAVLFTITK
KinobeadDP	RSK2	LGMPQFLSPEAQSLLR
KinobeadDP	RSK2	NQSPVLEPVGR
KinobeadDP	RSK2	LYLILDFLR
KinobeadDP	RSK3	APQAPLHSVQQQLHGK
KinobeadDP	RSK3	EASFVLHTIGK
KinobeadDP	RSK3	LGMPQFLSTEFAQSLLR
KinobeadDP	RSK3	LYLILDFLR
KinobeadDP	SRC	AANILVGENLVCK
KinobeadDP	SRC	WTAPEAALYGR
KinobeadDP	SRC	LIEDNEYTAR
KinobeadDP	SRC	GSLLDLFLK
KinobeadDP	TBK1	EPLNTIGLIYEK
KinobeadDP	TBK1	FGSLTMDGGLR

(continuación)

EXPERIMENTO	NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO IDENTIFICADO
KinobeadDP	TBK1	IISNQELIYEGR
KinobeadDP	TBK1	LFAIEEETTTR
KinobeadDP	TBK1	TTEENPIFVVS
KinobeadDP	TBK1	VIGEDGQSVYK
KinobeadDP	TGFbR1	HDSATDTIDIAPNHR
KinobeadDP	TGFbR1	TIVLQESIGK
KinobeadDP	TGFbR1	TLSQLSQQEGIK
KinobeadDP	TGFbR1	VPNEEDPSLDRPFISEGTTLK
KinobeadDP	TGFBR1	EAEIYQTVMLR
KinobeadDP	TNK1	MLPEAGSLWLLK
KinobeadDP	TYK2	LGLAEGTSPFIK
KinobeadDP	Weel B	IPQVLSQEFTELLK
KinobeadDP	Weel B	ISSPQVEEGDSR
KinobeadDP	YES	LLLNPQNQR
KinobeadDP	YES	LPQLVDMAAQIADGMAYIER
KinobeadDP	YES	SDVWSFGILQTELVTK
KinobeadDP	YES	AANILVGENLVCK
KinobeadDP	YES	EVLEQVER
KinobeadDP	YES	FQIINTEGDWWEAR
KinobeadDP	YES	WTAPEAALYGR
KinobeadDP	YES	LIEDNEYTAR
KinobeadDP	YES	GSLLDFLK
KinobeadDP	YES	IADFGAR
KinobeadDP	ZAK	CEIEATLER
KinobeadDP	ZAK	GLEGLQVAWLVEK
KinobeadDP	ZAK	LTIPSSCPR
KinobeadDP	ZAK	NVVIAADGVLK

### Ejemplo 3: Ensayo de rastreo usando compuestos de prueba para elución de proteínas

Este ejemplo ilustra la elución competitiva de proteínas unidas a Kinobeads con compuestos de ensayo no modificados (véase en particular el cuarto aspecto de la invención). Las Kinobeads (según se describen en el Ejemplo 1) se pusieron en contacto con lisado de cerebros de ratón, las proteínas unidas se eluyeron con diversos compuestos de prueba y las proteínas liberadas se analizaron por espectrometría de masas.

#### 1. Preparación de la muestra biológica (lisado tisular)

##### 1.1 Preparación de lisados



Se preparó un lisado cerebral de ratones por disrupción mecánica en tampón de lisis (5 ml de tampón por cerebro de ratón) en condiciones suaves que mantienen la estructura y función de las proteínas. Se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- 5 • Descongelar el tejido rápidamente a temperatura ambiente o a 37 °C, después transferir tejido a una botella de vidrio que contiene el tampón de lisis 1x (uso de un vial lo suficientemente grande para usarse con homogeneizador Polytron PT 3100)
- Lisar el órgano/tejido con 4 pulsos de 10 segundos a 5000-7000 rpm a 4 °C en la cámara fría
- Transferir el homogenado en tubos Falcon de 50 ml pre-enfriados
- Incubar homogenado en hielo durante 30 minutos
- 10 • Centrifugar células durante 10 minutos a 6000 g a 4 °C (6.000 rpm en Sorvall SLA600, preenfriado)
- Transferir sobrenadante a un tubo de UZ-policarbonato (Beckmann, 355654)
- Centrifugar sobrenadante durante 1 hora a 145.000 g a 4 °C (40.000 rpm en Ti50.2, pre-enfriado)
- Guardar sobrenadante (retirar y descartar la mayoría de la fase lipídica si es posible), transferir sobrenadante dentro de una botella de vidrio y almacenar en hielo
- 15 • Determinar concentración de proteínas por ensayo de Bradford (BioRad). Concentraciones de proteínas típicas están en el intervalo de 5-10 mg/ml.
- Preparar alícuotas en tubos Falcon de 1 a 50 ml
- Congelar alícuotas en nitrógeno líquido y almacenarlas a -80 °C

### 1.2 Preparación de tampón de lisis y soluciones madre

#### 20 Preparación de 100 ml de tampón de lisis 1x con NP40 al 0,8 %

Combinar las siguientes soluciones de reactivos y añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 ml: 20 ml de tampón de lisis 5x (véase más adelante), 100 µl de DTT 1 M, 5 ml de NaF 0,5 M, 4 ml de NP40 al 20 %, 4 comprimidos libres de EGTA completos (cóctel inhibidor de proteasas, Roche Diagnostics, 1 873 580), añadir agua destilada hasta 100 ml.

25

**Tabla 10: Preparación de tampón de lisis 5x**

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

Estas soluciones se obtuvieron a partir de los siguientes suministradores:

- 30 Tris 1 M/HCl pH 7,5: Sigma, T-2663; glicerol al 87 %: Merck, n.º de cat.: 04091.2500; MgCl<sub>2</sub> 1 M: Sigma, M-1028; NaCl 5 M: Sigma, S-5150.

El tampón de lisis concentrado 5x se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenó en alícuotas de 40 ml a -80 °C.

#### Preparación de soluciones madre

Preparación de una solución de reserva de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM:

Disolver 9,2 g de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> en 400 ml de agua destilada.

- 1) Ajustar el pH a 10,0 usando bien NaOH 1 N o HCl 1 N. El pH de partida de la solución de ortovanadato de sodio puede variar con lote. A pH 10,0 la solución será amarilla.
- 2) Hervir la solución hasta que se vuelve incolora (aproximadamente 10 minutos).
- 3) Enfriar a temperatura ambiente.
- 5 4) Reajustar el pH a 10,0 y repetir etapas 2 y 3 hasta que la solución permanezca incolora y el pH se establezca a 10,0.
- 5) Ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada.
- 6) Congelar alícuotas a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

Preparación de solución de reserva de NaF 500 mM:

10 Disolver 21,0 g de NaF (Sigma, S7920) en 500 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 µm y almacenar a 4 °C.

Preparación de solución de NP40 al 20 %:

Pesar 40,0 g de NP40 (Sigma, Igepal-CA630, número de catálogo: 13021). Añadir agua destilada hasta 200 g. Mezclar completamente y almacenar solución a temperatura ambiente.

Preparación de solución de DTT 1 M:

15 Disolver 7,7 g de DTT (Biomol, número de catálogo: 04010) en 50 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 mm y congelar alícuotas de 400 µl a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

## 2. Puesta en contacto de las Kinobeads con el lisado celular y elución de proteínas unidas por compuestos de prueba

20 Las Kinobeads se pusieron en contacto con el lisado cerebral de ratones en condiciones que permiten la unión de las proteínas en el lisado a los ligandos. Las condiciones de unión estaban cerca de las fisiológicas eligiendo condiciones tampón adecuadas que conservan la función de las proteínas. Después de retirar las proteínas no capturadas por un procedimiento de lavado suave las proteínas unidas se pusieron en contacto con un compuesto de prueba para elución de proteínas.

### 2.1 Preparación de tampones de DP

25

Tabla 11: Preparación de tampón 5x-DP

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

30 El tampón DP 5x se filtra a través de filtro de 0,22 µm y se almacena en alícuotas de 40 ml a -80 °C (nota: el mismo tampón se usa también para la preparación de lisados celulares totales). Estas soluciones se obtuvieron a partir de los siguientes suministradores: Tris 1,0 M/HCl pH 7,5 (Sigma, T-2663), glicerol al 87 % (Merck, número de catálogo: 04091.2500); MgCl<sub>2</sub> 1,0 M (Sigma, M-1028); Nad 5,0 M (Sigma, S-5150).

#### Se prepararon los siguientes tampones de DP 1x

- Tampón DP 1x (para equilibrio de perlas)
- Tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 % (para equilibrio de perlas y primera etapa de lavado de perlas)
- Tampón de DP 1x/NP40 al 0,2 % (para la segunda etapa de lavado de perlas y para elución de compuesto)
- 35 • Tampón de DP 1x/inhibidores de proteasa (para primera etapa de dilución de lisado); añadir un comprimido inhibidor de proteasa por tampón de lisis de 25 ml (comprimido libre de EDTA, cóctel inhibidor de proteasa, Roche)

Diagnostics, 1 873 580)

- Tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 %/inhibidores de proteasa (para la segunda etapa de dilución de lisado)

### **Ejemplo de preparación de tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 % (100 ml)**

5 Combinar las siguientes soluciones y reactivos y añadir agua destilada hasta un volumen final de 100 ml: 20 ml de tampón DP 5x, 5 ml de NaF 0,5 M, 2 ml de NP40 al 20 %, 100 µl de DTT al 1 M y añadir agua destilada hasta 100 ml. Todos los tampones contienen concentración final de DTT 1 mM.

### **2.2 Lavado y equilibrio de perlas**

Las Kinobeads (Ejemplo 1) se prepararon para la reacción de unión lavando con un tampón adecuado y por equilibrio en un tampón.

10 1. Usar tubos Falcon de 15 ml para todas las etapas de lavado.

2. Usar 100 µl de KinoBeads por experimento (volumen de perlas sedimentadas): cantidades iguales de mezcla (25 ml) de cada tipo de perla acoplado con los siguientes 4 ligandos (densidad de acoplamiento de 1 µmol/ml):

Bis VIII (CZC00001056), Purvalanol B (CZC00007097), derivado de PD173955 (CZC00007324) y CZC00008004.

15 3. Lavar perlas dos veces con 3 ml de DP 1x y una vez con 3 ml de tampón DP 1x/NP40 al 0,4 %. Durante cada etapa de lavado invertir tubos 3-5 veces, centrifugar 2 minutos a 1200 rpm a 4 °C en una centrifuga Heraeus. Los sobrenadantes son sobrenadantes aspirados y descartados.

Después de la última etapa de lavado preparar una suspensión 1:1 (volumen/volumen) con tampón de DP 1x/NP40 al 0,4 %.

### **2.3 Preparación de lisado celular diluido**

20 El lisado cerebral de ratones se preparó para la reacción de unión por dilución en un tampón adecuado y limpiando por medio de una etapa de centrifugación.

1. Uso de un volumen de lisado celular correspondiente a 50 mg de proteína por experimento.

2. Descongelar el lisado rápidamente en un baño de agua a 37 °C, después mantener la muestra en hielo.

3. Diluir el lisado en la siguiente manera:

25 3) diluir lisado con tampón de DP 1x/inhibidores de proteasa reduciendo concentración de detergente desde NP-40 al 0,8 % hasta NP-40 al 0,4 %.

4) diluir lisado adicionalmente con tampón 1x DP/NP40 al 0,4 %/inhibidores de proteasa alcanzando una concentración de proteína final de 5 mg/ml.

30 (Nota: La segunda etapa de dilución solamente se requiere si la concentración de proteínas del lisado después de la primera etapa de dilución es más alta de 5 mg/ml).

4. Transferir lisado diluido en tubo UZ-policarbonato (Beckmann, 355654).

5. Limpiar lisado diluido por ultracentrifugación (20 minutos, 4 °C, 100.000 g, rotor T150.2, ultracentrifuga pre-enfriada).

6. Guardar sobrenadante y mantenerlo en hielo.

### **35 2.4 Reacción de unión y lavado**

Las perlas lavadas y equilibradas (sección 2.2) se pusieron en contacto con el lisado celular diluido (sección 2.3) con el fin de permitir unión de las proteínas a los ligandos. Se retiraron proteínas no específicamente unidas por lavado suave con el fin de reducir la unión precedente.

1. Combinar lisado aclarado diluido con 100ml de KinoBeads lavadas en tubo Falcon de 15 ml o de 50 ml.

40 2. Incubar durante 2 horas a 4 °C, rotar en ROTO SHAKE GENIE (Scientific Industries, Inc.) en cámara fría.

3. Después de incubación, centrifugar durante 3 minutos a 1.200 rpm en una centrifuga Heraeus o equivalente a 4 °C.

4. Retirar sobrenadante cuidadosamente sin perder las perlas.

5. Transferir las perlas a columnas Mobicol con filtro de 90 µm (MoBiTec, Goettingen, n.º de catálogo: M1002-90).

6. Lavar perlas con 10 ml de tampón de DP 1x/NP-40 al 0,4 % y 5 ml del tampón de DP 1x/NP-40 al 0,2 %.

7. Dejar que el tampón de lavado corra a través de la columna completamente antes de proceder con la etapa siguiente.

8. Situar la columna en tubo Eppendorf y centrifugarlos durante 1 minuto a 800 rpm a 4 °C.

5 Cerrar columnas con tapa inferior.

### 2.5 Elución de proteínas unidas con compuestos de prueba

Se usaron diversos compuestos de prueba (véase sección 2.7) liberando proteínas unidas siguiendo estas etapas:

1. Resuspender perlas con proteínas unidas (sección 2.4) en tampón de DP 1x/NP-40 al 0,2 % como suspensión 1:3 (volumen/volumen).

10 2. Transferir 20 µl a la suspensión 1:3 en columnas MoBiTech (equivalentes a 5 µl de perlas).

3. Situar la columna dentro de un tubo Eppendorf y centrifugarla durante 15 segundos a 800 rpm a 4 °C. Cerrar columnas con tapa inferior.

15 4. Añadir 10 µl de tampón de elución conteniendo 1,0 mM del compuesto de prueba (son adecuados intervalos de concentración de 0,1 a 1,0 mM). Usar como un control tampón de elución que contiene DMSO al 2 % o DMF al 2 % dependiente del disolvente usado disolviendo el compuesto de prueba.

Cerrar columnas con tapa superior.

5. Incubar durante 30 minutos a 4 °C en un incubador de Eppendorf a 700 rpm.

20 6. Abrir columna (primero arriba, después abajo), poner columna de nuevo en tubo siliconado (SafeSeal Microcentrifuge Tubes, número de catálogo: 11270, Sorenson BioScience, Inc.). Centrifugar 2 minutos a 2.000 rpm en centrífuga de sobremesa a temperatura ambiente recogiendo el eluato. El volumen típico del eluato es aproximadamente 15 µl.

7. Añadir 5 µl de tampón de muestra NuPAGE SDS 4x (Invitrogen, NP0007) conteniendo DTT 100 mM (DTT se ha añadido justo antes de usar).

8. Incubar durante 30 minutos a 50 °C.

25 9. Añadir 1/10 de volumen de yodoacetamida a 200 mg/ml, incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, proteger de luz. Esta reacción conduce a la alquilación de cisteínas para espectrometría de masas.

10. Antes de cargar muestras en el gel, centrifugar muestras durante 5 minutos a 15.000 rpm con el fin de retirar precipitados.

11. Para separación de proteínas aplicar 10 ml a gel Bis-Tris al 4-12 % de NuPAGE (Invitrogen, NP0335).

### 30 2.6 Preparación de soluciones de reserva usadas en este protocolo

#### Preparación de una solución de reserva de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM

1) Disolver 9,2 g de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> en 400 ml de agua destilada.

2) Ajustar el pH a 10,0 usando bien NaOH 1 N o HCl 1 N. El pH de partida de la solución de ortovanadato de sodio puede variar con lote. A pH 10,0 la solución será amarilla.

35 3) Hervir la solución hasta que se vuelve incolora (aproximadamente 10 minutos).

4) Enfriar a temperatura ambiente.

5) Reajustar el pH a 10,0 y repetir etapas 2 y 3 hasta que la solución permanezca incolora y el pH se estabilice a 10,0.

6) Ajustar el volumen a 500 ml con agua destilada.

7) Congelar alícuotas a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

#### 40 Preparación de una solución de reserva de NaF 500 mM

Disolver 21,0 g de NaF (Sigma, S7920) en 500 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de un filtro de 0,22 µm y almacenar a 4 °C.

**Preparación de una solución de NP40 al 20 %**

Pesar 40,0 g de NP40 (Sigma, Igepal-CA630, número de catálogo: 13021). Añadir agua destilada hasta 200 g. Mezclar completamente y almacenar solución a temperatura ambiente.

**Preparación de una solución de DTT 1 M**

- 5 Disolver 7,7 g de DTT (Biomol, número de catálogo: 04010) en 50 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 µm y congelar alícuotas de 400 µl a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

**Preparación de solución de reserva de yodoacetamida (200 mg/ml)**

Disolver 2,0 g de yodoacetamida (Sigma, S7920) en 10 ml de agua destilada. Filtrar solución a través de filtro de 0,22 µm y congelar alícuotas de 400 µl a -20 °C. Las alícuotas pueden almacenarse durante varios meses.

**10 2.7 Compuestos de ensayo para elución**

Los compuestos de prueba enumerados más adelante se usaron para experimentos de elución después de dilución como se describe más adelante.

**Preparación de reservas de compuesto de prueba:**

- 15 Típicamente todos los compuestos se disuelven en DMSO al 100 % (Fluka, número de catálogo: 41647) a una concentración de 100 mM. Alternativamente, se puede usar DMF al 100 % (Fluka, número de catálogo: 40228) para aquellos compuestos que no pueden disolverse en DMSO. Los compuestos se almacenan a -20 °C.

**Dilución de compuesto de prueba para experimentos de elución:**

Preparar reserva de 50 mM diluyendo la reserva 100 mM 1:1 con DMSO al 100 %. Para experimentos de elución diluir adicionalmente el compuesto 1:50 con tampón de elución (= 1 x DP-tampón/NP40 al 0,2 %).

- 20 **CZC1038: Bisindolilmaleimida III** (suministrador: Alexis Biochemicals; número de catálogo 270-051-M005; fórmula química-C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>; P.M.: 384,4).

**CZC7097: Purvalanol B** (suministrador: Tocris Biochemicals, número de catálogo 1581; composición química C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>; P.M.: 441,92; número CAS 212844-54-7).

**CZC00007324** (derivado PD173955; la síntesis se describe en el Ejemplo 1).

- 25 **CZC00008004:** Este es un análogo de CZC00004919 (la síntesis se describe en el Ejemplo 1).

**CZC00007098: SB202190** (suministrador: TOCRIS 1264 1A/46297; fórmula química C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>F; P.M.: 331,34).

**CZC00009280: Estaurosporina** (suministrador: SIGMA-ALDRICH: S4400; inhibidor de cinasa de intervalo amplio; fórmula química C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>; P.M.: 466,53).

- 30 **CZC00007449: SP600125** (suministrador: Merck Biosciences número 420119, inhibidor de JNK1/2; fórmula química C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O; P.M.: 220,2).

**3. Análisis espectrométrico de masas de enzimas eluidas (por ejemplo cinasas)****Descripción de péptidos proteotípicos**

- 35 La digestión trípica de una mezcla de proteína separada de SDS-PAGE genera para cada proteína numerosos fragmentos peptídicos distintos con diferentes propiedades fisicoquímicas. Estos péptidos difieren en compatibilidad con la plataforma analítica basada en espectrometría de masas usada para identificación de proteínas (ID), aquí espectrometría de masas en tándem de ionización de electropulverización de cromatografía líquida en fase reversa (RP-CL-EM/EM). Como un resultado, las frecuencias peptídicas para péptidos de la misma proteína fuente difieren en un gran grado, llamándose los péptidos más frecuentemente observados que contribuyen "típicamente" a la identificación de esta proteína péptidos "proteotípicos". Así, un "péptido proteotípico" es un péptido bien observable experimentalmente que identifica únicamente una proteína específica o una isoforma de proteína.

**Ventajas de péptidos proteotípicos**

El uso de péptidos proteotípicos para identificación de proteínas permite la identificación rápida y centrada y la cuantificación de múltiples proteínas objetivo conocidas centrando el procedimiento de identificación de proteínas en un rastreo para la presencia de péptidos de firma ricos en información.

- 45 **Identificación experimental de péptidos proteotípicos**

Una estrategia generando una lista de péptidos proteotípicos es recoger datos de identificación de péptidos empíricamente y buscar el conjunto de datos para péptidos observados comúnmente que identifican únicamente una proteína.

5 Para cada entrada de proteína de base de datos IPI con al menos 10 identificaciones inequívocas en el conjunto de datos CZ (ID de multipéptidos o ID de péptidos individuales verificados manualmente), se calculan las frecuencias péptídicas para los péptidos que contribuyen. Solamente se consideran los mejores apareamientos péptido-a-espectro, específicos de acuerdo con el motor de búsqueda en bases de datos Mascot™ (Matrix Science).

10 Para definición de los péptidos proteotípicos para una proteína específica, los péptidos se ordenan descendiendo la frecuencia peptídica y se calcula una presencia peptídica acumulativa: este valor da para cada péptido la proporción de identificaciones donde este péptido o cualquiera de los péptidos con una frecuencia peptídica más alta estaba presente. Los péptidos proteotípicos se definen usando un corte para presencia acumulativa del 95 %, es decir al menos el 95 % de los eventos de identificación para esta proteína se basaron en al menos un péptido proteotípico.

### 3.1 Digestión de proteínas y preparación de muestras anteriores a análisis espectrométricos de masas

15 Las proteínas se concentraron, se separaron en geles NuPAGE® Novex al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal. Los carriles del gel se cortaron sistemáticamente a través del intervalo de separación completo en < 48 láminas (bandas y regiones interbanda) y se sometieron a digestión triptica en gel esencialmente como se describe por Shevchenko y cols., 1996, Analytical Chemistry 68: 850-858. Brevemente, las almohadillas de gel se destiñeron durante toda una noche en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM en EtOH al 50 %, se digirieron durante 4 horas con tripsina a 12,5 ng/ml en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM. Los péptidos se extrajeron con ácido fórmico al 1 %, se transfirieron en una segunda placa de 96 pocillos y se secaron al vacío. Los péptidos secos se resuspendieron en 10 ml de ácido fórmico al 0,1 % y se inyectaron 5 ml en el sistema LC-EM/EM para identificación de proteínas.

### 3.2 Adquisición de datos de espectrometría de masas

25 Las muestras peptídicas se inyectaron en un sistema de nano-CL (CapLC, Waters o Ultimate, Dionex) que se acopló directamente bien a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, Micromass o QSTAR Pulsar, Sciex) o bien a un espectrómetro de masas de atrapamiento iónico (LCQ Deca XP, LTQ, Thermo-Finnigan). Los péptidos se separan en el sistema de CL usando un gradiente de disolventes acuosos y orgánicos con un tiempo de gradiente típico de entre 15 y 45 minutos. El disolvente A era acetonitrilo al 5 % en ácido fórmico al 0,1% y el disolvente B era acetonitrilo al 70 % en ácido fórmico al 0,1 %.

### 3.3 Identificación de proteínas

30 La masa de los péptidos y los datos de fragmentación generados en los experimentos de CL-EM/EM se usaron consultando una versión curada de forma interna de la base de datos de secuencia de proteínas (EBI) del Índice Internacional de Proteínas (IPI). Las proteínas se identificaron correlacionando la masa de péptidos medida y los datos de fragmentación con los mismos datos computados a partir de las entradas en la base de datos usando la herramienta de software Mascot (Matrix Science; Perkins y cols., 1999, Electrophoresis 20: 3551-3567). Los criterios de búsqueda variaron dependiendo de qué espectrómetro de masas se usó para el análisis.

## 4. Resultados

40 El procedimiento permite establecer un perfil de las cinasas eluidas para cualquier compuesto de prueba dado permitiendo de este modo evaluar la selectividad del compuesto de prueba. Una limitación es que solamente las cinasas capturadas en las Kinobeads durante la primera etapa se pueden evaluar, lo que podría representar una subfracción de todas las cinasas contenidas en el lisado celular.

**Tabla 12:** Cinasas liberadas identificadas por análisis de espectrometría de masas después de elución específica con compuestos de ensayo (los números representan valor de espectrometría de masas/número de péptidos identificados). Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y con Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario). Los cuatro primeros compuestos en la tabla 12 son la versiones no inmovilizadas de los ligandos de Kinobeads 1-4.

Cinasa	DMSO al 2 %	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
AAK1	130/5	562/38	1036/51	582/35	718/35	638/27	198/4	593/32	777/44	240/32
ALK2										65/2
AMPKal					64/2					
ARG				59/2						452/28
BRAFps				70/4						
Cinasa	DMSO al 2 %	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
CaMK2a		911/53	978/27	513/11	966/43	288/9		509/11	1027/69	786/74
CaMK2b		834/52	679/16	499/14	685/30	572/19		143/5	1182/72	615/75
CaMK2d		702/17	473/12	328/7	444/11	260/8			822/40	434/36
CaMK2g		550/18			527/27				809/25	379/42
CaMKK2		314/6	465/9	101/3	522/12	93/2			282/10	338/10
CDK5	3037	831/19	1086/41	462/11	794/27	856/28	166/4	504/11	861/43	604/21
CDKL5			48/1							
CK1e										
CRIK		90/5								
CSK			492/12	809/19					307/8	365/15
EphA4			1702/37	1233/32	138/3				332/11	727/33
EphA5			330/14	144/3						246/9
EphA7										
EphB1			366/10							180/10

(continuación)

Cinasa	DMSO al 2 %	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
EphB2			1334/30	1004/22	149/5				114/4	437/19
Erk1ps5		418/14	749/48	557/77	386/26	270/13			71/2	239/8
Erk2	751/25	754/50	1437/115	1179/235	810/46	1036/82	506/20	641/24	955/50	1023/102
FAK			269/6	322/10	257/8				379/19	160/6
FER		237/6	322/8	388/11	100/2				818/21	275/11
FYN			268/6	279/6					314/6	407/17
GAK				278/7	733/16			90/3	255/6	166/8
GSK3Aps	166/6	1232/60	357/6	154/3	635/27	393/21	406/8	132/4	868/47	585/77
GSK3B		1176/54	1037/30	789/19	881/26	536/14	743/34	345/8	824/59	763/72
JNK1			311/10	448/17	590/48	559/18	540/19	678/28	457/16	389/47
Cinasa	DMSO al 2 %	CZC 1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
JNK2		287/11	277/7	702/21	662/18	405/12	170/5	429/30		369/20
JNK3			284/7	782/49	642/23	620/37	542/30	578/39	363/10	447/27
LIMK1ps					186/4					
LYN										134/6
MAP2K1		208/6	78/2					74/2	49/2	90/4
MARK2		49/1								
NEK9					61/2					
p38a				127/6			295/10			104/7
p38b				60/1			80/2			95/3
PAK5									64/1	
PKCa									64/1	



(continuación)

Cinasa	DMSO al 2 %	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
PKCg		107/2							53/1	
Cinasa	DMSO al 2 %	CZC1038	CZC7097	CZC7324	CZC8004	CZC1355	CZC7098	CZC7479	CZC9280	SDS
PYK2	159/4	291/7	1909/48	1401/42	1228/58	88/2		422/10	1978/82	809/39
GSK										153/7
RSK1		292/7	1177/32	626/19	312/9	435/11			1634/47	825/45
RSK3			401/11	312/12					721/21	107/6
SRC			544/13	351/9					546/13	419/25
TBK1									48/1	
TRKB			207/4						165/4	
TRKC										
YESps			304/7		110/3				480/12	236/13

**Tabla 13:** Cinasas liberadas identificadas por análisis de espectrometría de masas después de elución específica con compuestos de ensayo (valor de espectrometría de masas/número de péptidos identificados). Los compuestos de ensayo se seleccionan a partir de una biblioteca de moléculas pequeñas orgánicas (compuestos de armazón de cinasas). Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y con Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario).

Cinasa	CZC9413	CZC9414	CZC9459	CZC9482	CZC9493	CZC9494	CZC9489	CZC9488	CZC9484	CZC9490
AAK1	1110/54	1138/69	1288/69	1459/75	823/35	777/44	989/48	1032/57	663/36	352/16
ALK2	85/2		80/2	100/2				49/1	106/3	
AMPKα1										
ARG										
BRAFps		96/4						78/2		
CaMK2a	909/33	357/8	1294/57	417/25	1023/49	1002/32	1430/69	1307/78	1187/83	71/2
CaMK2b	1128/71	151/5	1315/99	626/18	1077/77	806/21	939/67	1251/72	969/65	
CaMK2d	736/21		760/42	414/10	752/24	376/9	712/39	720/35	716/24	
CaMK2g	970/25		812/32		709/27		741/17	929/26	620/26	
CaMKK2	242/8		178/4	287/10	225/7		140/4	187/6	237/6	
CDK5	677/33	513/12	525/14	773/20	906/44	580/13	838/38	907/24	951/30	204/5
CDKL5										
CK1ε								80/2		
CRIK			50/1							
CSK					73/2	66/2	121/2		73/2	
EphA4				123/4						
EphA5										
EphA7		88/2								
EphB1										
EphB2			74/2						247/7	

(continuación)

Cinasa	CZC9413	CZC9414	CZC9459	CZC9482	CZC9493	CZC9494	CZC9489	CZC9488	CZC9484	CZC9490
Erk1ps5	121/4	144/5	282/8	469/15	176/5	333/10	89/3	597/19	513/14	
Erk2	913/36	852/37		837/51	676/40	837/44	822/24	896/30	994/51	759/28
FAK				302/8		81/2	193/6	153/6		
FER				118/3			154/6	344/9	149/4	
FYN								53/1		
GAK	234/6	663/20	388/10	63/1	187/5	732/21	161/4	530/14	201/6	
GSK3Aps	586/18	891/23	335/7	230/5		201/5	630/14	745/15	1030/55	78/2
GSK3B	663/32	471/23	294/14	143/5	282/8	257/7	343/8	567/29	908/60	
JNK1				595/36			553/17	964/34	703/23	
JNK2		394/23		469/15	84/3		523/17	562/30	494/33	
JNK3	371/10	555/33	610/30	662/44	346/10	164/5	635/37	968/45	789/47	
LIMK1ps							46/1			
LYN										
MAP2K1	95/4		253/8	93/3	234/8	152/5	105/4	481/12	338/10	48/1
MARK2										
NEK9	122/3							46/1		
p38a										
p38b										
PAK5										
PKCa										
PKCg						210/6		145/4	167/5	
PYK2	133/3	292/7	430/12	833/21	219/6	47/1	1712/42	1769/51	703/17	51/1

(continuación)

Cinasa	CZC9413	CZC9414	CZC9459	CZC9482	CZC9493	CZC9494	CZC9489	CZC9488	CZC9484	CZC9490
QSK										
RSK1	445/11	100/3		193/4	207/4	511/12	466/14	1471/38	634/17	
RSK3	272/8		94/2	211/5		354/11		437/14	301/10	
SRC									135/3	
TBK1										
TRKB					139/4			111/3		
TRKC				97/3						
YESps										

**Ejemplo 4: Comparación de ligandos co-inmovilizados frente a ligandos acoplados por separado**

El propósito de este experimento era evaluar si una mezcla de perlas conteniendo un tipo de ligando (ligandos acoplados por separado) produce resultados similares en términos de cinasas identificadas en comparación con con ligandos co-inmovilizados (acoplamiento simultáneo).

- 5 El resultado muestra que hay un amplio solapamiento de bases identificadas en ambos experimentos demostrando que ambos enfoques son factibles.

10 Se acoplaron dos ligandos bien individualmente o bien simultáneamente a perlas de sefarosa y después se usaron en los experimentos expuestos más adelante usando lisados de células HeLa (ligando 1: BisVIII; ligando 2: CZC00008004; detalles como en el Ejemplo 1: Preparación de Kinobeads). El acoplamiento de los compuestos individualmente se llevó a cabo como se detalla en el Ejemplo 1. El acoplamiento simultáneo de los dos ligandos se llevó a cabo también como en el Ejemplo 1 salvo porque los compuestos se acoplaron sobre las mismas perlas a una concentración de 0,5 mmol/ml en vez de las perlas a 1 µmol/ml estándar. El éxito del acoplamiento de los compuestos inmovilizados individualmente o simultáneamente se controló por medio de análisis de HPLC. Las perlas se lavaron y almacenaron según se describe en el Ejemplo 1.

- 15 La preparación de los lisados celulares HeLa, el lavado de perlas, la puesta en contacto de las perlas con el lisado, el lavado y análisis de las proteínas liberadas por espectrometría de masas se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2 (experimento de Signaloquinoma).

20 **Tabla 14:** Cinasas identificadas por análisis de espectrometría de masas. Comparación del experimento con dos ligandos acoplados simultáneamente (parte izquierda) frente a compuestos acoplados individualmente (perlas mezcladas; parte derecha). Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y con Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario).

Acoplamiento simultáneo (premezclados Bis VIII y CZC8004)					Perlas mezcladas post-acoplamiento (Bis VIII y CZC8004)				
Identificación	Cinasa	Puntuación de EM	Número de péptidos	También en post-mezcla	Identificación	Cinasa	Puntuación de EM	Número de péptidos	También en premezcla
1	TBK1	1531	63	X	1	TBK1	1365	57	X
2	GSK3B	932	52	X	2	NEK9	1113	36	X
3	AurA	895	40	X	3	TNK1	921	44	X
4	TYK2	841	29	X	4	TYK2	917	34	X
5	TNK1	771	46	X	5	AurA	910	46	X
6	CDK2	741	34	X	6	GSK3A	814	47	X
7	NEK9	736	22	X	7	CaMK2g	781	38	X
8	GSK3A	707	43	X	8	GSK3B	745	33	X
9	JNK2	654	24	X	9	JAK1	731	27	X
10	JNK1	548	23	X	10	CaMK2d	641	26	X
11	CaMK2g	494	24	X	11	AurB	631	28	X
12	CaMK2d	456	21	X	12	DNAPK	610	24	X
13	AAK1	450	17	X	13	JNK2	578	23	X
14	AurB	424	15	X	14	JNK1	499	21	X
15	JAK1	187	6	X	15	CDK2	485	19	X
16	CDK9	160	6	0	16	FER	423	17	X
17	YES	108	5	X	17	AAK1	368	17	X
18	FER	106	3	X	18	TEC	159	7	0
19	MPSK1	80	3	0	19	BIKE	124	4	0
20	DNAPK	72	4	X	20	YES	108	6	X
21	ULK3	64	1	0	21	FRAP	59	3	0

**Tabla 15: Cinasas y secuencias de péptidos proteotípicos identificadas en el experimento de acoplamiento simultáneo**

<b>NOMBRE DE CINASA</b>	<b>PÉPTIDO PROTEOTÍPICO</b>
AAK1	APEMVNLYSGK
AURKB	IYLILEYAPR
AURKB	LPLAQVSAHPWVR
AURKB	SNVQPTAAPGQK
CAMK2D	DLKPENLLLASK
CAMK2D	FTDEYQLFEELGK
CAMK2D	GAILTTMLATR
CAMK2D	IPTGQEYAAK
CAMK2G	LTQYIDGQGRPR
CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
CDK9	IGQGTFGEVFK
CDK9	LLVLDPAQR
CDK9	NPATTNQTEFER
GSK3A	SQEVAYTDIK
GSK3A	VINGSGFGVYQAR
GSK3A	VTTVVATLGQGP
GSK3A	YFFYSSGEK
GSK3B	DIKPQNLLLDPDTAVLK
GSK3B	LYMYQLFR
GSK3B	VINGSGFGVYQAK
JAK1	LIMEFLPSGSLK
JAK1	LSDPGIPITVLSR
MAPK8	APEVILGMGYK
MAPK9	ILDFGLAR
MAPK9	NIISLLNVFTPQK
MAPK9	VIEQLGTPSAEFMK
NEK9	LGINLLGGPLGGK
NEK9	LNPAVTCAGK
NEK9	LQQENLQIFTQLQK
NEK9	SSTVTEAPIAVVTSR
NEK9	VLACGLNEFNK
PRKDC	INQVFHGCITEGNELTK

(continuación)

<b>NOMBRE DE CINASA</b>	<b>PÉPTIDO PROTEOTÍPICO</b>
PRKDC	NELEIPGQYDGR
PRKDC	QLFSSLFSGILK
PRKDC	YPEETLSLMTK
STK16	APELFSVQSHCVIDER
STK16	GTLWNEIER
STK6	SKQPLPSAPENNPEEELASK
STK6	VEFTFPDFVTEGAR
TBK1	IATLLLYQELMR
TBK1	LFAIEEETTTR
TBK1	TTEENPIFVVSRR
TBK1	VIGEDGQSVYK
TNK1	AAALSGLLSDPELQR
TNK1	VADFGLVRPLGGAR
TYK2	LGLAEGTSPFIK
TYK2	LSDPGVGLGALSR
TYK2	MVVAQQLASALSYLENK
TYK2	SLQLVMEYVPLGSLR
TYK2	SQAPDGMQSLR
ULK3	ASVENLLTEIEILK
YES 1	AANILVGENLVCK
YES 1	EVLEQVER

**Tabla 16: Cinasas y secuencias de cinasas proteotípicas identificadas en el experimento de mezclas (perlas mezcladas tras acoplamiento)**

<b>NOMBRE DE CINASA</b>	<b>PÉPTIDO PROTEOTÍPICO</b>
AAK1	ADIWALGCLLYK
AURKB	HFTIDDFEIGRPLGK
AURKB	IYLILEYAPR
AURKB	LPLAQVSAHPWVR
AURKB	SNVQPTAAPGQK
BMP2K	ADIWALGCLLYK
BMP2K	ITDTIGPTETSIAPR
CAMK2D	AGAYDFPSPEWDTVTPKAK
CAMK2D	FTDEYQLFEELGK
CAMK2D	FYFENALSK

(continuación)

<b>NOMBRE DE CINASA</b>	<b>PÉPTIDO PROTEOTÍPICO</b>
CAMK2D	GAILTTMLATR
CAMK2G	AGAYDFPSPEWDTVTPEAK
CAMK2G	DLKPENLLLASK
CAMK2G	FTDDYQLFEELGK
CAMK2G	LTQYIDGQGRPR
CAMK2G	NLINQMLTINPAK
CDK2	ALFPGDSEIDQLFR
CDK2	FMDASALTGIPLPLIK
FER	HSIAGIIR
FER	THAEDLNSGPLHR
FRAP1	GPTPAILESISINNK
GSK3A	SQEVAYTDIK
GSK3A	VINGSGFVVYQAR
GSK3A	VTTVVATLGQGP
GSK3A	YFFYSSGEK
GSK3B	DIKPQNLLLDPDTAVLK
GSK3B	LLEYTPTAR
GSK3B	LYMYQLFR
GSK3B	VINGSGFVVYQAK
GSK3B	YFFYSSGEK
JAK1	LIMEFLPSGSLK
JAK1	LSDPGIPITVLSR
MAPK8	APEVILGMGYK
MAPK8	NIIGLLNVFTPQK
MAPK9	APEVILGMGYK
MAPK9	ILDFGLAR
MAPK9	NIISLLNVFTPQK
MAPK9	VIEQLGTPSAEFMK
NEK9	AGGGAAEQEELHYIPR
NEK9	LNPVAVTCAGK
NEK9	LQQENLQIFTQLQK
NEK9	SSTVTEAPIAVVTSR
NEK9	VLACGLNEFNK



(continuación)

NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO
PRKDC	AALSALESFLK
PRKDC	DFGLLVFVR
PRKDC	DILPCLDGYLK
PRKDC	DLLLNTMSQEEK
PRKDC	DQNILLGTTYR
PRKDC	FMNAVFFLLPK
PRKDC	FVPLLPGNR
PRKDC	GLSSLLCNFTK
PRKDC	HSSLITPLQAVAQR
PRKDC	INQVFHGSCITEGNELTK
PRKDC	LAGANPAVITCDELLLGHEK
PRKDC	LATTILQHWK
PRKDC	LSDFNDITNMLLLK
PRKDC	LYSLALHPNAFK
PRKDC	NELEIPGQYDGR
PRKDC	QCLPSLDLSCK
PRKDC	SDPGLLTNTMDVFK
PRKDC	SIGEYDVLK
PRKDC	SLGPPQGEEDSVPR
PRKDC	VTELALTASDR
STK6	QWALEDFEIGRPLGK
STK6	SKQPLPSAPENNPHEELASK
STK6	VEFTFPDFVTEGAR
TBK1	IASTLLLYQELMR
TBK1	LFAIEEETTR
TBK1	TTEENPIFVSR
TBK1	VIGEDGQSVYK
TEC	ELGSGFLGVVR
TEC	GQEYLILEK
TEC	HAFGSIPEIIIEYHK
TNK1	AAALSGLLSDPELQR
TNK1	ANLWDAPPAR
TNK1	MLPEAGSLWLLK

(continuación)

NOMBRE DE CINASA	PÉPTIDO PROTEOTÍPICO
TNK1	VADFGLVRPLGGAR
TYK2	AAALSFVSLVDGYFR
TYK2	HGIPLLEEVAK
TYK2	LGLAEGTSPFIK
TYK2	LSDPGVGLGALSR
TYK2	MVVAQQLASALSYLENK
TYK2	SLQLVMEYVPLGSLR
TYK2	SQAPDGMQSLR
YES1	EVLEQVER

**Ejemplo 5: Síntesis de ligando de Kinobeads 5 (ligando indol 91)****Síntesis de ligando indol 91: (3-amino-propil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico****5 Etapa 1:** 5-fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona

Una solución de 5-fluoroisatina (1 g) en hidrato de hidrazina (al 55 %, 10 ml) se calentó a 110 °C durante 30 minutos. Una vez la suspensión ha llegado a estar en solución, la reacción se calentó a 110 °C durante 4 horas, después se enfrió a 0 °C. El precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se suspendió en agua (10 ml), el pH se disminuyó a pH 2 por adición de HCl conc. y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El precipitado se recogió, el sólido se lavó con agua (2 x 15 ml) y se secó en el horno de vacío a 40 °C (0,26 g, al 30 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10,2 (s, 1H); 6,8-7,0 (dd, 2H); 6,6 (m, 1H); 3,2 (s, 2H). CLEM: procedimiento D, TR = 1,736 minutos, [MH+ = 152].

**Etapa 2:** éster terc-butílico de ácido {3-[(5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-propil}-carbámico

A una solución de ácido 5-formil-2,4-dimetil-1H-pirazol-3-carboxílico (0,300 g, 1,79 mmol), N-(3-dimetilamino-propil)-N'-etilcarbodiimida (0,516 g, 2,69 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,364 g, 2,69 mmol), trietilamina (0,502 ml, 3,56 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se añadió N-Boc-1,3-diaminopropano (0,375 ml, 2,15 mmol). Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 15 horas. Se añadió una mezcla de salmuera (1,5 ml), agua (1,5 ml) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (1,5 ml) y el pH de la solución se ajustó a 12 por adición de hidróxido sódico 10 N. La solución se extrajo 3 veces con una mezcla de diclorometano: metanol = 9/1). La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio anhidro. El disolvente se retiró y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (hexano: acetato de etilo (al 50 al 100 %)) produciendo el compuesto deseado como un sólido amarillo (0,30 g, al 52 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11,90 (s, 1H); 9,50 (s, 1H); 7,50 (m, 1H); 6,90 (m, 1H); 3,20 (c, 2H); 3,00 (c, 2H); 2,30 (s, 3H); 2,20 (s, 3H); 1,60 (m, 2H); 1,40 (s, 9H). CLEM: procedimiento D, TR = 2,103 minuto, [M+Na<sup>+</sup> = 346] y [M-Boc+Na<sup>+</sup> = 246].

**25 Etapa 3:** éster terc-butílico del ácido [3-[(5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-propil]-carbámico

Una solución de éster terc-butílico del ácido {3-[(5-formil-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil)-amino]-propil}-carbámico (0,200 g, 0,62 mmol) y 5-fluoro-1,3-dihidro-indol-2-ona (0,011 g, 0,62 mmol), pirrolidina (0,003 ml) en etanol (2 ml) se calentó a 78 °C durante 3 horas. La reacción se enfrió a 0 °C y el precipitado resultante se filtró, se lavó con etanol frío. El producto se suspendió en etanol (4 ml) y se agitó a 72 °C durante 30 minutos. La reacción se filtró, el precipitado se secó en un horno al vacío a 40 °C proporcionando el compuesto deseado como un sólido (0,265 g, al 94 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13,8 (s, 1H); 11,00 (s, 1H); 7,80 (m, 2H); 7,70 (m, 1H); 7,0 (m, 1H); 6,9 (m, 2H); 3,30 (c, 2H); 3,10 (c, 2H); 2,50 (dd, 6H) 1,60 (m, 2H); 1,40 (s, 9H). CLEM: procedimiento D, TR = 2,86 minuto, [M+Na<sup>+</sup> = 479] y [M-Boc+Na<sup>+</sup> = 379].

**35 Etapa 4:** (3-amino-propil)-amida de ácido 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(3Z)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxílico

Se suspendió en metanol éster terc-butílico de ácido

[3-({5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihidro-indol-(32)-ilidenometil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carbonil]-amino)-propil]-carbámico. Se añadieron 2 ml de HCl (4 N) en dioxano y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda una noche. Se retiró el disolvente produciendo el compuesto del título (0,098 g, al 91 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13,8 (s, 1H); 11,00 (s, 1H); 7,90-7,70 (m, 5H); 6,9 (m, 2H); 3,30 (c, 2H); 2,80 (c, 2H); 2,50 (dd, 6H) 1,80 (m, 2H). CLEM: inconclusa debido a fluorescencia.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte. Se obtuvieron espectros de RMN en un dpx400 de Bruker. CLEM se llevó a cabo en un Agilent 1100 usando una columna Zorbax SBC-18, de 4,6 mm x 150 mm-5 m o una columna pequeña: ZORBAX® SB-C18, 4,6 x 75 mm, 3,5 micrometros ("columna corta"). El flujo en columna fue 1 ml/minuto y los disolventes usados fueron agua y acetonitrilo (TFA al 0,1 %) con un volumen de inyección de 10 µl. Las longitudes de onda fueron de 254 y 210 nm. A continuación se describen los procedimientos.

Tabla 17: Procedimientos analíticos

Procedimiento	Nombre de Procedimiento de Acceso Fácil	Nombre de Procedimiento de ChemStation	Caudal	Disolvente	Tiempo de recorrido
A	Analítica positiva de 7 minutos	ANL_POS7.M	1 ml/minuto	MeCN al 5-95 % durante 0-2,5 minutos	7 minutos
				MeCN al 95 % durante 2,5-6 minutos	
B	Analítica positiva iónica	ANAL_POS.M	1ml/minuto	MeCN al 5-95 % durante 0-11 minutos MeCN al 95 % durante 11-13 minutos	15 min
C	Inyección de bucle, positiva		1 ml/minuto	MeCN al 95 %	1 minuto
D	Analítica positiva iónica	ANL en columna corta positiva	1 ml/minuto	MeCN al 30-95 % durante 0-4,5 minutos	5 minutos
E	pH alto analítico	pH alto analítico	3 ml/minuto	MeCN al 5-95 % durante 0 a 8 minutos MeCN al 95 % durante 8 a 9 minutos	10 minutos

Tabla 18: Abreviaturas usadas en protocolos de química

ac.	acuoso
D	doblete
DMSO	dimetilsulfóxido
G	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
CLEM	cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
M	multiplete
min	minuto
mmol	milimol
N	Normal
RMN	resonancia magnética nuclear
Q	cuadrupele
TR	Tiempo de retención
S	singlete
sat	saturado
T	triplete

**Ejemplo 6: Síntesis de ligando de Kinobeads 6 (ligando quinazolina 32)****Síntesis de ligando quinazolina 32: 7-(4-amino)-butiloxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina****Etapas 1: 7-benciloxi-4-(2-fluoro-4-bromofenil)-amino-6-metoxiquinazolina**

5 A una solución de 7-benciloxi-4-cloro-6-metoxiquinazolina (0,250 g, 0,83 mmol) y 4-bromo-2-fluoroanilina (190 mg, 1 mmol) en isopropanol (10 ml) se añadió ácido clorhídrico (4 M en dioxano, 0,230 ml, 0,92 mmol). La mezcla se agitó a 90 °C durante 2 horas. Se dejó que la mezcla de reacción se enfriara hasta temperatura ambiente. El sólido se filtró aparte, se lavó con isopropanol frío y éter y finalmente se secó durante toda una noche a 50 °C, proporcionando el compuesto del título (0,297 g-al 79 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) δ 8,65 (s, 1H); 7,96 (s, 1H); 7,55 (m, 5H); 7,40 (t, 3H); 7,30 (s, 1H); 5,37 (s, 2H); 4,89 (s, 1H); 4,08 (s, 1H). CLEM: procedimiento C, [M<sup>+</sup> = 454].

**Etapas 2: 7-hidroxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina**

10 Se disolvió 7-benciloxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina (297 mg, 0,654 mmol) en ácido trifluoroacético (5 ml) y la solución se agitó a reflujo durante una hora. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió en hielo. El sólido se filtró aparte y se tomó en metanol. La solución se basificó usando amonio acuoso (a pH 11) y se redujo al vacío. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua fría y éter y finalmente se secó durante toda una noche al vacío a 50 °C, proporcionando el compuesto del título (0,165 g-al 69 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) δ 8,55 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 7,52 (m, 3H); 7,13 (s, 1H); 4,08 (s, 3H). CLEM: procedimiento C, [M<sup>+</sup> = 364].

**Etapas 3: 7-(4-amino-ftalimida)-butiloxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina**

20 La N-(4-bromobutil)-ftalimida (0,355 g, 0,1187 mmol) se añadió en una parte a una mezcla de 7-hidroxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina (360 mg, 0,989 mmol) y carbonato de potasio (410 mg, 2,967 mmol) en dimetilformamida (7 ml). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadió agua (10 ml) y el precipitado se filtró aparte. El sólido se lavó con agua fría y metanol y finalmente se secó durante toda una noche a 50 °C al vacío, proporcionando el compuesto del título (0,317 mg-al 57 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD-*d*<sub>4</sub>) δ 9,49 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 7,82 (m, 4H); 7,71 (s, 1H); 7,61 (m, 1H); 7,47 (t, 1H, J = 8,3 Hz); 7,413 (m, 1H); 7,11 (s, 1H); 4,09 (m, 2H); 3,87 (s, 3H); 3,62 (m, 2H); 1,75 (s ancho, 4H). CLEM: procedimiento B, TR = 9,20 minutos, [MH<sup>+</sup> = 410].

**Etapas 4: 7-(4-amino)-butiloxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina**

30 Una suspensión de 7-(4-amino-ftalimida)-butiloxi-4-(2-fluoro-4-bromo-fenil)-amino-6-metoxiquinazolina (150 mg, 0,265 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se trató con monohidrato de hidrazina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días (la solubilización tuvo lugar después de cinco minutos y se observó consumo total del material de partida) y se redujo a vacío. El aceite amarillo espeso se purificó usando el procedimiento de "cogida y liberación" (cartucho SCX-2 de Isolute con procedimiento de liberación optimizado) proporcionando el compuesto del título (63 mg, al 51 %). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*<sub>6</sub>) δ 8,68 (s, 1H); 8,48 (t, 1H, J = 8,5 Hz); 7,36 (m, 1H); 7,33 (m, 1H); 7,32 (s ancho, 1H); 7,25 (s, 1H); 7,00 (s, 1H); 4,19 (m, 2H); 4,02 (s, 3H); 2,80 (m, 2H); 1,98 (m, 2H); 1,67 (m, 2H); 1,49 (s ancho, 2H). HPLC: procedimiento D, TR = 3,52 minutos.

40 Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte. Se obtuvieron espectros de RMN en un dpx400 de Bruker. CLEM se llevó a cabo en un Agilent 1100 usando una columna Zorbax SBC-18, de 4,6 mm x 150 mm-5 μ o una columna pequeña: ZORBAX® SB-C18, 4,6 x 75 mm, 3,5 micrometros ("columna corta"). El flujo en columna fue 1 ml/minuto y los disolventes usados fueron agua y acetonitrilo (TFA al 0,1 %) con un volumen de inyección de 10 μl. Las longitudes de onda fueron de 254 y 210 nm. A continuación se describen los procedimientos.

**Tabla 19: Procedimientos analíticos**

Procedimiento	Nombre de Procedimiento de Acceso Fácil	Nombre de Procedimiento de ChemStation	Caudal	Disolvente	Tiempo de recorrido
A	Análítica positiva de 7 minutos	ANL_POS7.M	1 ml/min	MeCN al 5-95 % durante 0-2,5 minutos MeCN al 95 % durante 2,5-6 minutos	7 minutos
B	Análítica positiva iónica	ANAL_POS.M	1 ml/min	MeCN al 5-95 % durante 0-11 minutos MeCN al 95 % durante 11-13 minutos	15 minutos
C	Inyección de bucle, positiva		1 ml/min	MeCN al 95 %	1 minutos

(continuación)

Procedimiento	Nombre de Procedimiento de Acceso Fácil	Nombre de Procedimiento de ChemStation	Caudal	Disolvente	Tiempo de recorrido
D	Analítica positiva iónica	ANL en columna corta positiva	1 ml/minuto	MeCN al 30-95 % durante 0-4,5 minutos	5 minutos
E	Analítica en pH alto	Analítica en pH alto	3 ml/minuto	MeCN al 5-95 % durante 0 a 8 minutos MeCN al 95 % durante 8 a 9 minutos	10 minutos

Tabla 20: Abreviaturas usadas en protocolos de química

ac.	acuoso
D	doblete
DMSO	dimetilsulfóxido
G	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
CLEM	cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
M	multiplete
min	minuto
mmol	milimol
N	Normal
RMN	resonancia magnética nuclear
Q	cuadrupele
TR	tiempo de retención
s	singlete
sat	saturado
T	triplete

5 **Ejemplo 7:** Síntesis del ligando de Kinobeads 7 (estaurosporina modificada)

El ligando de Kinobeads 7 en base a estaurosporina se sintetizó de acuerdo con el protocolo siguiente.

**Etapas 1: Modificación de estaurosporina con anhídrido del ácido diglicólico**

10 Disolver estaurosporina (típicamente 10 mg, IRIS-Biotech, Alemania) en 1 ml de DMF libre de agua, añadir 5 µl de TEA, enfriar a 0 °C. De esta solución, se toman 5 µl y se mezclan con 50 µl de ACN para determinación de la cantidad de partida relativa usando un sistema CL-EM (AGILENT, Alemania). Para el análisis de CL-EM se diluyen 5 µl de la mezcla de reacción en 50 ml de ACN al 100 %. Después de mezclar cuidadosamente se aplican 5 µl a análisis de HPLC usando un automuestreador. Se llevó a cabo separación a una velocidad de flujo de 450 µl/minuto con ácido fórmico al 0,1 % en agua como un disolvente A y ácido fórmico al 0,1 % en ACN al 100 % como un disolvente B usando una columna C18 de 3 x 50 mm (ZORBAX-Extended C 18, AGILENT, Alemania). Se usa un gradiente desde A al 10 % hasta B al 95 % en 75 minutos. Se observó absorbancia de UV a 254 nm, la masa molecular del compuesto se determinó en línea por un sistema de EM con cuadrupolo de fase individual (MSD, AGILENT, Alemania). Los datos

15

registrados se comprueban manualmente. El primer análisis sirve como el estándar para el cálculo de los rendimientos de los productos de reacción. El área del pico de la señal de UV se ajusta al 100 % como cantidad de partida, en base a la estaurosporina pura.

5 A la solución de estaurosporina fría se añadió un exceso de 10 veces de anhídrido de ácido diglicólico (Merck Alemania) en DMF. La reacción con rendimiento cerca del 100 % se terminó en 10 minutos, se comprobó por HPLC mezclando 5 ml de la mezcla de reacción con 50  $\mu$ l de ACN y se analizó por CL-EM como se describe anteriormente. La masa molecular cambió desde 467,5 Da (estaurosporina no modificada) hasta 545,6 Da (estaurosporina modificada) para la molécula cargada de forma única. Si la reacción no se completó se añade otro exceso de diez veces del anhídrido de ácido glicólico y la mezcla se mantuvo durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La  
10 mezcla de reacción se analiza por CL-EM como se describe anteriormente.

Después de que la reacción se completa, no se detecta ninguna estaurosporina modificada. Se añaden 5 ml de agua a la mezcla de reacción, primero desactivando el anhídrido de ácido, en segundo lugar diluyendo para extracción en fase sólida. Preparar un cartucho de extracción en fase sólida C18 de 500 mg (Phenomenex, Alemania) por activación con  
15 10 ml de metanol y equilibrio con TFA al 0,1 % en agua. Los disolventes se hacen pasar a través del cartucho con un caudal de aproximadamente 2 a 3 ml/minuto usando una bomba de vacío de membrana. La mezcla de reacción acuosa se aplica al cartucho y se hace pasar a través de él con el mismo caudal que anteriormente. Después de que la solución ha pasado completamente por el cartucho y que la estaurosporina modificada está unida al material C18, ello se lava primero con ACN al 5 % TFA al 0,1 %, después con ACN al 10 % y finalmente con CN al 20 %, todo ello con TFA al 0,1 % en agua. La estaurosporina modificada se eluye después con ACN al 70 %, TFA al 0,1 % en agua,  
20 seguido por ACN al 80 %, TFA al 0,1 % en agua. Los eluatos se combinan y secan al vacío.

### **Etapas 2: Acoplamiento de la estaurosporina modificada a la diamina unida a fase sólida usando química de PyBroP**

Disolver la estaurosporina modificada en DMF libre de agua y añadir a la resina de bis-(aminoetil)etilenglicol-tritilo pre-hinchada en DMF (IRIS Biotech, Alemania). La diamina unida a fase sólida se añade en exceso de 2 a 3 veces. A  
25 la suspensión añadir 10 ml de diisopropiltilamina (DIEA, FLUKA, Alemania) y un exceso de cinco veces de PyBroP por encima de la estaurosporina modificada. La reacción se llevó a cabo durante 16 horas a temperatura ambiente en mezcla permanente sobre un mezclador de extremo a extremo. Comprobar el sobrenadante para estaurosporina no modificada por HPLC usando el sistema CL-EM como se describe anteriormente. Esta etapa es no cuantitativa, solamente se mide la desaparición de la estaurosporina modificada no unida. Después de que se completa la reacción  
30 (no se puede detectar más estaurosporina modificada no unida) la resina se lava con 10 volúmenes de DMF libre de agua y dos veces con 10 volúmenes de DCM.

### **Etapas 3: Reacción de escisión**

La resina se resuspende después en 5 volúmenes de DCM, se enfría a 0 °C y se añade 1 ml de TFA. La resina amarilla clara anterior debería volverse ahora roja oscura indicando la reacción. La escisión se lleva a cabo durante 20 minutos  
35 a 0 °C y a 20 minutos a temperatura ambiente. La solución se recoge y la resina se lava dos veces con 10 volúmenes de DCM. Todos los eluatos se combinan y se secan usando un evaporador rotatorio. La película aceitosa que queda se disuelve en 0,5 ml de DMF y se añaden 5 ml de agua. La estaurosporina modificada se purifica por extracción en fase sólida según se describe anteriormente y se seca al vacío. El rendimiento se comprueba por HPLC con absorbancia de UV a 254 nm contra la solución de estaurosporina no modificada original como se describe anteriormente, en relación  
40 a la solución de la estaurosporina modificada después de disolver el producto de reacción en 1 ml de DMF. A partir de esta solución se mezclan 5  $\mu$ l con 50  $\mu$ l de ACN y 5  $\mu$ l se analizan por CL-EM. La masa molecular del producto esperado es 727,8 Da. El área de pico a 254 nm se refiere al área de pico de la estaurosporina modificada como analizada al 100 % según se describe.

La estaurosporina modificada se usa acoplando a la sefarosa activada por NHS como es usual por medio de su grupo amino. Antes de acoplar, se lava 1 ml de perlas tres veces con 12 ml de DMSO libre de agua y después se resuspenden en 1 ml de DMSO libre de agua. A esta suspensión se añaden 20  $\mu$ l de TEA y se añade un equivalente de  
45 1  $\mu$ mol de la estaurosporina modificada en DMF. Directamente después de añadir y mezclar bien y de centrifugación corta durante 1 minuto a 1200 rpm, se toman 20  $\mu$ l del sobrenadante y se analizan 5  $\mu$ l por CL-EM. Después de 16 horas sometida a mezclado continuo en un mezclador rotatorio, la suspensión se centrifuga de nuevo y se toman 20  $\mu$ l  
50 determinando la estaurosporina modificada no unida por análisis de 5  $\mu$ l por CL-EM como se describe anteriormente. Usualmente está unido el 100 % de la estaurosporina modificada. Las perlas se lavan después tres veces con 12 ml de DMSO, se resuspenden de nuevo con 1 ml de DMSO y se añaden 50  $\mu$ l de etanolamina (MERCK, Alemania) bloqueando los grupos activados por NHS que no han reaccionado. La reacción se lleva a cabo durante 16 horas en mezclado continuo. Después de la reacción de bloqueo, las perlas se lavaron tres veces con 12 ml de isopropanol  
55 (MERCK, Alemania) y se almacenaron como suspensión 1:1 a 4 °C hasta usar.

Se usaron los siguientes reactivos:

DMF: N,N-dimetilformamida (FLUKA, 40228);

TEA: Trietilamina (SIGMA-Aldrich, T0886);

ACN: Acetonitrilo para HPLC (Merck, 1.00030);

TFA: Ácido trifluoroacético (FLUKA, 09653);

PyBroP: Hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (Novabiochem, 01-62-0017);

DCM: Diclorometano (FLUKA, 66749);

5 DMSO: Dimetilsulfóxido (FLUKA, 41648).

### Ejemplo 8: Unión de competición en lisados y perfil de afinidad de proteína cuantitativa (PAP)

Este ejemplo ilustra la unión por competición en lisados celulares (véase particularmente el tercer aspecto de la invención). Un compuesto de prueba, bisindolilmaleimida VIII (Bis VIII, a well known kinase inhibitor; Davies y cols., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* 351 (Pt. 1): 95-105) se añadió a un lisado celular permitiendo de este modo que el compuesto de prueba se una a las proteínas objetivo en el lisado. Después el lisado se puso en contacto con la matriz de afinidad de Kinobeads capturando las proteínas diana libres que quedan. Las proteínas unidas a la matriz de Kinobeads se eluyeron después con tampón que contiene detergente, se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida y se analizaron por inmunodetección (pruebas de bandas de Western) o detección de espectrometría de masas.

15 Para proteínas de análisis de bandas de Western unidas a la matriz de afinidad se eluyeron a partir de la matriz de afinidad y se separaron subsiguientemente por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de realización de pruebas de bandas. Las cinasas individuales se detectaron con anticuerpos específicos contra GSK3alfa, GSK3beta y ITK (Figura 4A). El resultado muestra que la preincubación del lisado celular con Bis VIII impide la unión de las proteínas diana GSK3alfa y GSK3beta a la matriz de Kinobeads en una manera dosodependiente. Las concentraciones crecientes del inhibidor de cinasa Bis VIII impidieron específicamente unión de GSK3 alfa y GSK3beta a las Kinobeads pero no la unión de ITK. Para GSK3beta la señal se cuantificó y se representó frente a la concentración de Bis VIII añadido al lisado celular (Figura 4B).

25 Para la detección cuantitativa de proteínas por proteínas de espectrometría de masas se eluyeron a partir de la matriz de afinidad y se separaron subsiguientemente por electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida. Áreas de gel adecuadas se cortaron y se sometieron a digestión proteolítica en el gel con tripsina. Se marcaron cuatro muestras de digestión con tripsina (correspondientes a tres concentraciones de Bis VIII diferentes en el lisado y un control de DMSO) con reactivos de iTRAQ y las muestras combinadas se analizaron en un análisis de espectrometría de masas de CL-EM/EM individual seguido por cuantificación de picos en el espectro de EM/EM (Ross y cols., 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics* 3 (12): 1154-1169). El resultado muestra que se detectaron diferentes niveles de proteínas individuales y se calcularon valores de intensidad relativa (Tabla 21). Se muestran curvas de unión para cinasas individuales (Figura 5). Los valores de intensidad relativa 50 (IR<sub>50</sub>) que representan la afinidad de pares de cinasa-compuesto son similares a valores de Cl<sub>50</sub> comunicados por ensayos enzimáticos de cinasas (Davies y cols., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* 351 (Pt. 1): 95-105).

### 35 1. Cultivo celular

Se cultivaron células Jurkat (clon E6-1 de ATCC, número TIB-152) en matraces Spinner de 1 l (Integra Biosciences, n.º: 182101) en suspensión en medio RPMI 1640 (Invitrogen, n.º: 21875-034) suplementado con Suero Fetal Bovino al 10 % (Invitrogen) a una densidad entre  $0,15 \times 10^6$  y  $1,2 \times 10^6$  células/ml y se recogieron por centrifugación. Los sedimentos celulares se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron subsiguientemente a -80 °C.

### 40 2. Preparación de lisados celulares

Las células Jurkat se homogeneizaron en un homogeneizador Potter S en tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM, NP40 al 0,8 %, glicerol al 5 %, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, NaF 25 mM, vanadato de sodio 1 mM, DTT 1 mM, pH 7,5. Se añadió un comprimido libre de EDTA completo (cóctel inhibidor de proteasas, Roche Diagnostics, 1 873 580) por tampón de 25 ml. El material se sometió a homogeneización dounce 10 veces usando un POTTER S mecanizado, se transfirió a tubos Falcon de 50 ml, se incubó durante 30 minutos en hielo y se centrifugó durante 10 minutos a 20.000 g a 4 °C (10.000 rpm en Sorvall SLA600, preenfriada). El sobrenadante se transfirió a un tubo de (UZ)-policarbonato de ultracentrífuga (Beckmann, 355654) y se centrifugó durante 1 hora a 100.000 g a 4 °C (33.500 rpm en Ti50.2, preenfriado). El sobrenadante se transfirió de nuevo a un tubo Falcon de 50 ml, la concentración de proteínas se determinó por un ensayo de Bradford (BioRad) y se prepararon muestras conteniendo 50 mg de proteína por alícuota. Las muestras se usaron inmediatamente para experimentos o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron congelados a -80 °C.

### 50 3. Preincubación de lisado con compuesto de prueba

Se incubaron alícuotas de lisado de Jurkat (10 mg de proteína) con diferentes concentraciones de Bis VIII durante una hora a 4 °C (concentración final 0,025 µM, 0,074 µM, 0,22 µM, 0,67 µM, 2,0 µM y 6,0 µM de Bis VIII). Para dicho fin las

soluciones de Bis VIII se prepararon en DMSO al 100 % con disolvente que corresponde a 200 veces la concentración de Bis VIII final deseada (Bis VIII de Alexis Biochemicals número de catálogo: ALX 270-056). Se añadieron cinco  $\mu\text{l}$  de estas soluciones a 1 ml de lisado dando como resultado las concentraciones finales indicadas. Para un experimento de control se usaron 5  $\mu\text{l}$  de DMSO sin Bis VIII.

#### 5 4. Captura de proteínas con Kinobeads

[290] A cada muestra de lisado preincubada se añadieron 40 ml de Kinobeads (véase ejemplo 1) y se incubaron durante una hora a 4 °C. Durante la incubación los tubos se rotaron en un agitador de extremo a extremo (Roto Shake Genie, Scientific Industries Inc.). Las perlas se recogieron por centrifugación, se transfirieron a columnas Mobicol (MoBiTech 10055) y se lavaron con 10 ml de tampón de DP 1x conteniendo detergente NP40 al 0,4 %, seguido por un lavado con 5 ml de tampón de DP 1x con NP40 al 0,2 %. Eluyendo las proteínas unidas, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de tampón de muestra SDS 2x, la columna se calentó durante 30 minutos a 50 °C y el eluato se transfirió a un tubo de microfuga por centrifugación. Las proteínas se separaron después por electroforesis de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE). La composición y la preparación de tampones se describe en el Ejemplo 2.

#### 5. Detección de proteínas por análisis de bandas de Western

15 Se llevaron a cabo pruebas de bandas de Western de acuerdo con procedimientos estándar y se desarrollaron con sistema de detección de realización de pruebas de bandas de Western ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, n.º: RPN2106). El sistema de realización de prueba de bandas de Western ECL de Amersham es un procedimiento no radiactivo emisor de luz para la detección de antígenos específicos, directa o indirectamente con anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP).

20 El anticuerpo anti-glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK3beta) se usó en una dilución de 1:1000 (anti-GSK3 $\beta$  policlonal de conejo, Stressgen Bioreagents, Victoria, Canadá, número de producto: KAP-ST002). Este anticuerpo reconoce también GSK3alfa. El anticuerpo anti-ITK se usó también a una dilución de 1:1000 (anticuerpo anti-ITK policlonal de ratón, Upstate Lake Placid, NY, número de catálogo: 06-546).

#### 6. Detección de proteínas por espectrometría de masas

##### 25 6.1 Digestión de proteína anterior a análisis espectrométrico de masas

Proteínas separadas por gel se redujeron, se alquilaron y se digirieron en gel siguiendo esencialmente el procedimiento descrito por Shevchenko y cols., 1996, Anal. Chem. 68: 850-858. Brevemente, las proteínas separadas por gel se escindieron a partir del gel usando un escalpelo limpio, se redujeron usando DTT 10 mM (en bicarbonato de amonio 5 mM, 54 °C, 45 minutos) y se alquilaron subsiguientemente con yodoacetamida 55 mM (en bicarbonato de amonio 5 mM) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Se digirieron proteínas reducidas y alquiladas en gel con tripsina porcina (Promega) a una concentración de proteasas de 10 ng/ $\mu\text{l}$  en hidrogenocarbonato de trietilamonio 5 mM (TEAB). La digestión se dejó continuar durante 4 horas a 37 °C y la reacción se detuvo subsiguientemente usando 5  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 5 %.

##### 6.2 Preparación de muestras antes de análisis por espectrometría de masas

35 Las almohadillas de gel se extrajeron dos veces con 20  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 1 % en agua y una vez con 20  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 0,1 %, acetonitrilo al 60 % en agua y se almacenaron con sobrenadantes de digestión acidificados. Las muestras se secaron en un vacío.

##### 6.3 Marcado iTRAQ de extractos peptídicos

40 Los extractos peptídicos de muestras tratadas con concentraciones diferentes del compuesto de prueba (0,074  $\mu\text{M}$ , 0,22  $\mu\text{M}$  y 0,67  $\mu\text{M}$  Bis VIII) y el control de disolvente (DMSO al 0,5 %) se trataron con diferentes isómeros del reactivo de marcado isobárico (kit de iTRAQ Reagents Multiplex, número de parte: 4352135, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los reactivos iTRAQ son un grupo de reactivos multiplexados, específicos de aminas, de isótopos estables que pueden etiquetar todos los péptidos hasta en cuatro muestras biológicas diferentes permitiendo la identificación simultánea y la cuantificación de péptidos. Los reactivos de iTRAQ se usaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

45 Las muestras se resuspendieron en 10  $\mu\text{l}$  de solución de TEAB 50 mM, pH 8,5 y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de etanol. El reactivo iTRAQ se disolvió en 85  $\mu\text{l}$  de etanol y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de solución de reactivo a la muestra. La reacción de etiquetado se llevó a cabo a temperatura ambiente durante una hora en un agitador horizontal y se detuvo añadiendo 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 10 % en agua. Las cuatro muestras etiquetadas después se combinaron, se secaron en una centrífuga al vacío y se resuspendieron en 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 0,1 % en agua.

##### 6.4 Adquisición de datos de espectrometría de masas

Las muestras peptídicas se inyectaron en un sistema de nano-CL (CapLC, Waters o Ultimate, Dionex) que se acopló directamente bien a un TOF cuadrupolar (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro, Micromass) o bien a un espectrómetro de masas de atrapamiento iónico (LCQ Deca XP). Los péptidos se separaron en el sistema CL usando un gradiente de



disolventes acuosos y orgánicos (véase más adelante). El disolvente A era acetonitrilo al 5 % en ácido fórmico al 0,5 % y el disolvente B era acetonitrilo al 70 % en ácido fórmico al 0,5 %.

**Tabla 3: Péptidos que eluyen aparte del sistema de CL se secuenciaron particularmente en el espectrómetro de masas.**

<u>Tiempo (min)</u>	<u>% de disolvente A</u>	<u>% de disolvente B</u>
<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

### 6.5 Identificación de proteínas

Los datos de masa peptídica y fragmentación peptídica generados en los experimentos de CL-EM/EM se usaron curando rápidamente una proteína formateada y para bases de datos de secuencia de nucleótidos mantenidas y actualizadas regularmente en el NCBI (para los NBIr, dbEST y los genomas de ser humano y de ratón) y en el Instituto de Bioinformática Europeo (EBI, para las bases de datos de proteomas de ser humano, ratón, D. melanogaster y C. elegans). Las proteínas se identificaron correlacionando los datos de masa peptídica y fragmentación peptídica medidos con los mismos datos computados a a partir de las entradas en la base de datos usando la herramienta de software Mascot (Matrix Science; Perkins y cols., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis 20, 3551-3567). Los criterios de búsqueda variaron dependiendo de qué espectrómetro de masas se usó para el análisis.

15

### 6.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas relativas se llevó a cabo usando áreas de picos de señales iónicas comunicadoras de iTRAQ esencialmente según se describe por Ross y colegas (Ross y cols., 2004. Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol. Cell. Proteomics 3 (12): 1154-1169).

### 20 6.7 Curvas de unión y determinación de valores de IR<sub>50</sub>

Los valores de Intensidad Relativa (IR) para las cinasas identificadas se muestran en la Tabla 21. El compuesto de prueba Bis VIII se usó a tres concentraciones diferentes en el lisado celular y los valores de RI se normalizaron para el control de DMSO. Para las cinasas seleccionadas los valores de IR se representaron frente a la concentración de Bis VIII y el ajuste de la curva se llevó a cabo usando el programa Xlfit (ID Business Solutions Ltd.) usando un modelo de equilibrio hiperbólico (Figura 5). El valor de IR<sub>50</sub> corresponde a la concentración de compuesto de prueba (Bis VIII) a la que la intensidad relativa de la señal de EM para una cinasa dada es el 50 % comparada con el control de disolvente (DMSO).

25

Tabla 21:

Proteínas identificadas por análisis de espectrometría de masas. El compuesto de prueba Bis VIII se usó a tres concentraciones diferentes en el lisado y los valores de IR resultantes se normalizaron al control de DMSO que se ajustó a 1,0. Se enumeraron los valores de intensidad relativa. El Representante se refiere al número de acceso de la base de datos del Índice de Proteínas Internacional (IPI, Instituto de Bioinformática Europeo), una compilación de secuencias de proteínas derivadas de varias bases de datos de secuencias de alta calidad (incluyendo GenBank, EMBL, SwissProt, RefSeq, Ensembl). Los nombres de cinasas están de acuerdo con la nomenclatura de cinasas humanas (<http://kinase.com>) y con Manning y cols., 2002, Science 298, 1912-1934 según se especifica en el material suplementario).

Representante	nombre agrupamiento	Nombre cinasa	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
			DMSO	0,074CM	0,02CM	0,67CM
IPI00298977.4	AAK1	AAK1	1,00	0,82	0,90	0,75
IPI00329488.4	ABL2	ARG	1,00	0,96	0,97	0,91
IPI00176642.3	AURKB	AurB	1,00	0,95	1,04	0,97
CZB00000043.1	ABI1	Abi1	1,00	0,81	0,90	1,03
IPI00306217.1	BLK	BLK	1,00	0,90	0,96	0,83
IPI00430291.1	CAMK2D	CaMK2d	1,00	0,91	0,99	0,88
IPI00169392.3	CAMK2G	CaMK2g	1,00	0,83	0,98	0,88
IPI00031681.1	CDK2	CDK2	1,00	0,89	0,85	0,65
IPI00023530.4	CDK5	CDK5	1,00	0,92	1,02	0,95
IPI00000685.1	CDK7	CDK7	1,00	1,03	1,04	0,89
IPI00013212.1	CSK	CSK	1,00	0,84	0,94	0,89
IPI00183400.8	CSNK1A1	CK1a	1,00	0,97	1,04	1,02
IPI00465058.1	CSNK1G1	CK1g1	1,00	1,01	1,05	0,96
IPI00219012.2	FYN	FYN	1,00	0,91	1,04	0,93
IPI00298949.1	GAK	GAK	1,00	0,92	1,01	0,97
IPI00292228.1	GSK3A	GSK3A	1,00	0,50	0,29	0,20
IPI00216190.1	GSK3B	GSK3B	1,00	0,54	0,39	0,28
IPI00004566.1	ITK	ITK	1,00	0,80	0,94	0,91
IPI00515097.1	LCK	LCK	1,00	0,87	1,00	0,94
IPI00003479.1	MAPK1	Erk2	1,00	0,89	1,04	0,98
IPI00002857.1	MAPK14	p38a	1,00	0,82	0,95	0,93
IPI00024672.1	MAPK8	JNK1	1,00	0,91	1,02	0,83
IPI00024673.1	MAPK9	JNK2	1,00	0,97	1,08	1,04
IPI00012069.1	NQO1		1,00	0,84	0,99	0,87
IPI00219129.7	NQO2		1,00	0,87	0,95	0,78
IPI00410287.1	PRKAA1	AMPKa1	1,00	0,88	1,00	0,91

ES 2 412 380 T3

(continuación)

			<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>	<b>Muestra 4</b>
Representante	nombre agrupamiento	Nombre cinasa	DMSO	0,074CM	0,02CM	0,67CM
IPI00220409.2	PRKAB1		1,00	0,91	0,94	0,79
IPI00549328.2	PRKAG1		1,00	0,78	0,79	0,68
<b>IPI00385449.3</b>	<b>PRKCA</b>	PKCa	1,00	0,25	0,19	0,18
<b>IPI00219628.1</b>	<b>PRKCB1</b>	PKCb	1,00	0,29	0,23	0,17
IPI00029702.1	PTK2B	PYK2	1,00	0,82	0,90	0,74
IPI00465291.3	SNF1 LK2	QIK	1,00	0,93	1,11	0,98
IPI00479211.2	SRC	SRC	1,00	0,93	0,98	0,94
IPI00298940.2	STK6	AurA	1,00	0,90	1,03	0,87
IPI00293613.1	TBK1	TBK1	1,00	1,05	1,13	1,14
IPI00411818.3	ULK3	ULK3	1,00	0,95	0,97	1,15
IPI00025830.1	WEE1	Wee1	1,00	1,21	1,15	1,14
IPI00477734.1	YES1	YES	1,00	0,82	0,92	0,87

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de caracterización de al menos una enzima, que comprende las etapas de:
  - a) proporcionar dos alícuotas que comprende cada una al menos una célula que contiene la enzima,
  - b) incubar una alícuota con un compuesto dado diferente de los ligandos,
  - 5 c) recoger las células,
  - d) lisar las células,
  - e) poner en contacto los lisados celulares en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos de enzimas de amplio espectro diferentes, en los que los ligandos están inmovilizados en un soporte sólido en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro,
  - 10 f) eluir la enzima o las enzimas, y
  - g) caracterizar la enzima eluida o las enzimas eluidas por espectrometría de masas cuantitativa.
2. Un procedimiento de caracterización de al menos una enzima, comprendiendo las etapas de:
  - a) proporcionar dos alícuotas de una preparación proteica que contiene la enzima,
  - b) poner en contacto una alícuota en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos de enzimas de amplio espectro diferentes, en los que los ligandos están inmovilizados en soporte sólido en condiciones que permitan la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro,
  - 15 c) poner en contacto la otra alícuota en condiciones esencialmente fisiológicas con al menos dos ligandos enzimáticos de amplio espectro diferentes, en los que los ligandos están inmovilizados en un soporte sólido en condiciones que permiten la unión del enzima a dichos ligandos enzimáticos de amplio espectro y con un compuesto dado diferente de los ligandos,
  - 20 d) eluir la enzima o las enzimas y
  - e) caracterizar la enzima eluida o las enzimas eluidas por espectrometría de masas cuantitativa,

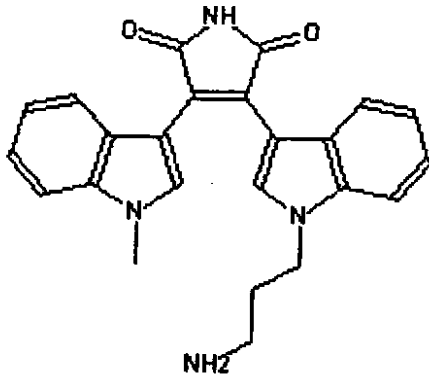
en el que una detección reducida de la enzima en la alícuota incubada con el compuesto indica que la enzima es una diana directa del compuesto.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la provisión de una preparación proteica en la etapa a) incluye las etapas de recoger al menos una célula que contenga el enzima y lisar la célula.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, llevadas a cabo como un rastreo de alto rendimiento.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho compuesto está seleccionado del grupo que consiste en compuestos sintéticos, o fármacos sintéticos orgánicos, más preferentemente fármacos orgánicos de moléculas pequeñas y compuestos de moléculas pequeñas naturales.
- 30 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enzima está seleccionada del grupo que consiste en una cinasa, una fosfatasa, una proteasa, una fosfodiesterasa, una hidrogenasa, una deshidrogenasa, una ligasa, una isomerasa, una transferasa, una acetilasa, una deacetilasa, una GTPasa, una polimerasa, una nucleasa y una helicasa.
- 35 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ligando une al 10 % al 50 %, preferentemente 30 % al 50 % de las enzimas de una clase dada de enzimas.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando es un inhibidor.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la enzima es una cinasa y el ligando está seleccionado del grupo que consiste en bisindolilmaleimida VIII, Purvalanol B, CZC00007324 (PD173955 enlazable) y CZC00008004.
- 40 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la caracterización del enzima se lleva a cabo caracterizando compañeros de unión co-eluidos de la enzima, subunidades de la enzima o modificaciones postraduccionales de la enzima.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la caracterización se lleva a cabo por identificación de péptidos proteotípicos de la enzima o del compañero de unión de la enzima.
- 45 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la caracterización se lleva a cabo comparando los péptidos

proteotípicos obtenidos para la enzima y el compañero de unión con péptidos proteotípicos conocidos.

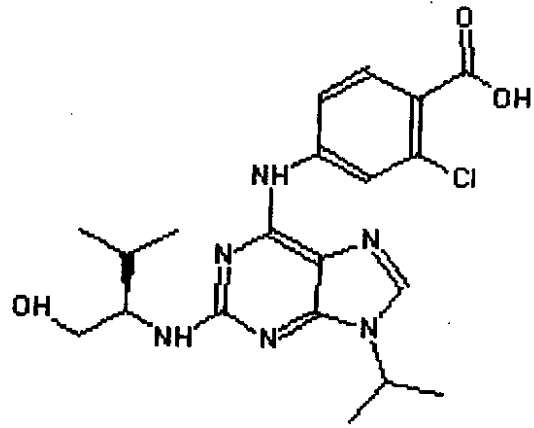
13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el soporte sólido está seleccionado del grupo que consiste en agarosa, agarosa modificada, perlas de sefarosa (por ejemplo sefarosa activada con NHS), látex, celulosa y partículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas.
- 5 14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que los ligandos de enzimas de amplio espectro están acoplados covalentemente al soporte sólido.
15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que se usan 2 a 10 ligandos diferentes, preferentemente 2 a 6, más preferentemente 2 a 4.
- 10 16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que mediante la caracterización de la enzima o el complejo-enzima-compuesto se determina la identidad de todos o de partes de los miembros de una clase enzimática en una célula.
17. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la unión entre ligandos y enzima es una unión no covalente.
- 15 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ligando de amplio espectro es capaz de unir algunas de, pero no todas, las enzimas presentes en la preparación de proteínas.

Figura 1:

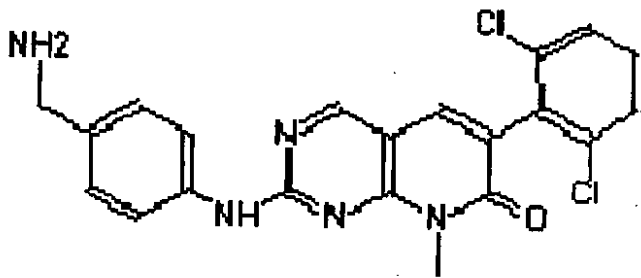
a)



b)



c)



d)

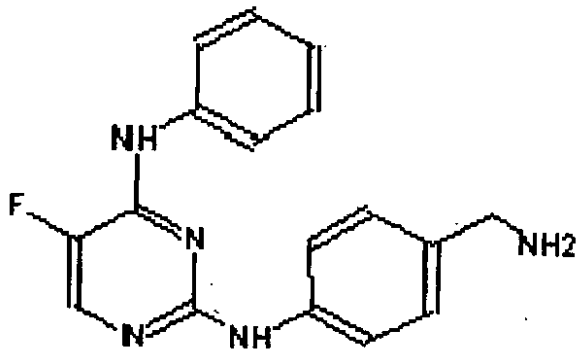


Figura 2:

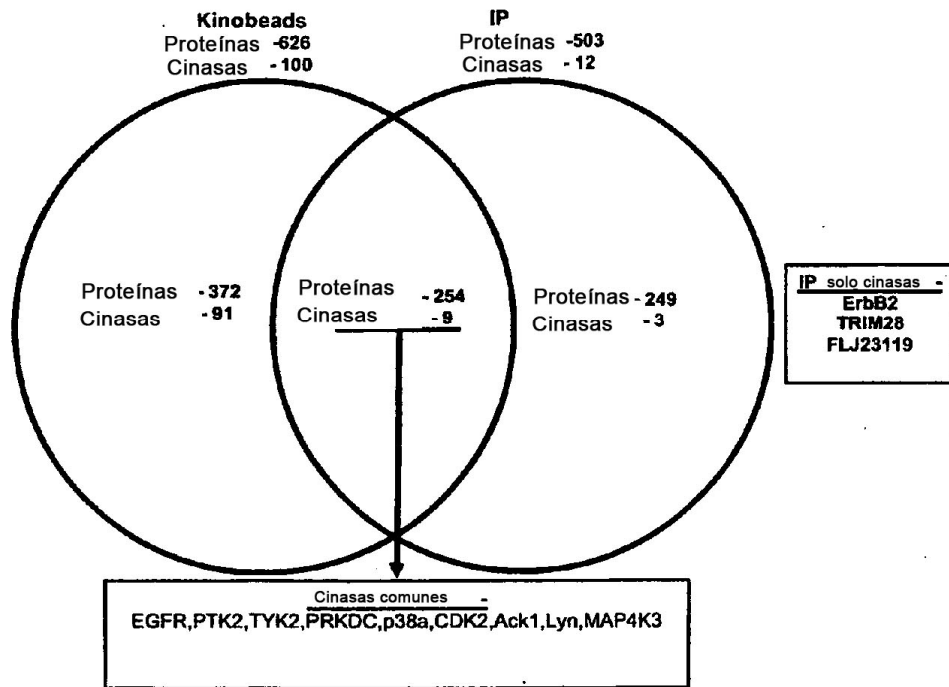
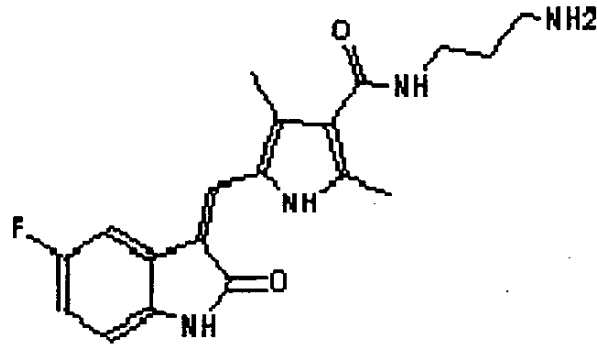
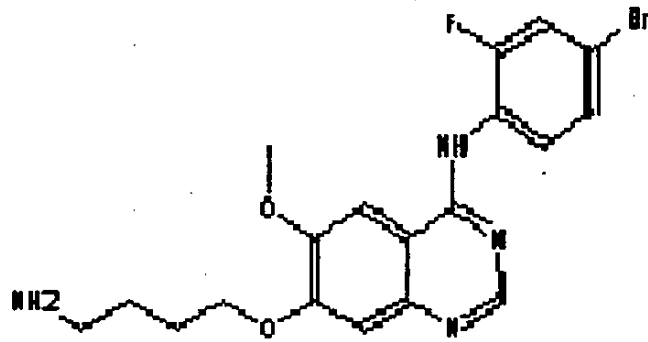


Figura 3:

a)



b)



c)

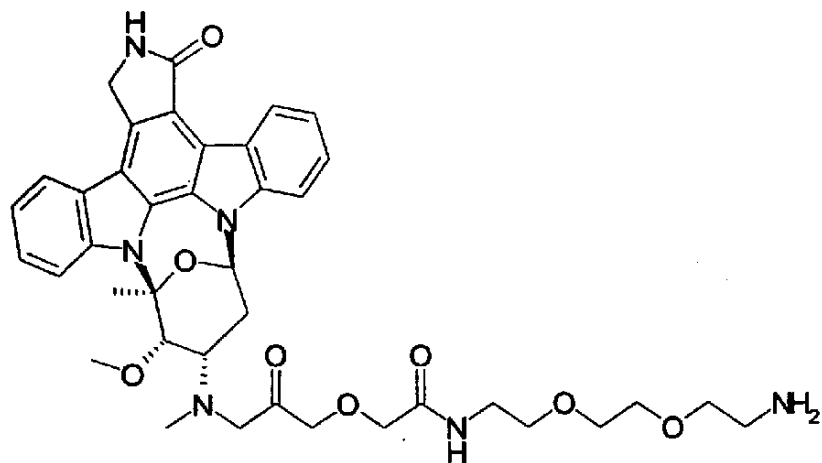




Figura 4:

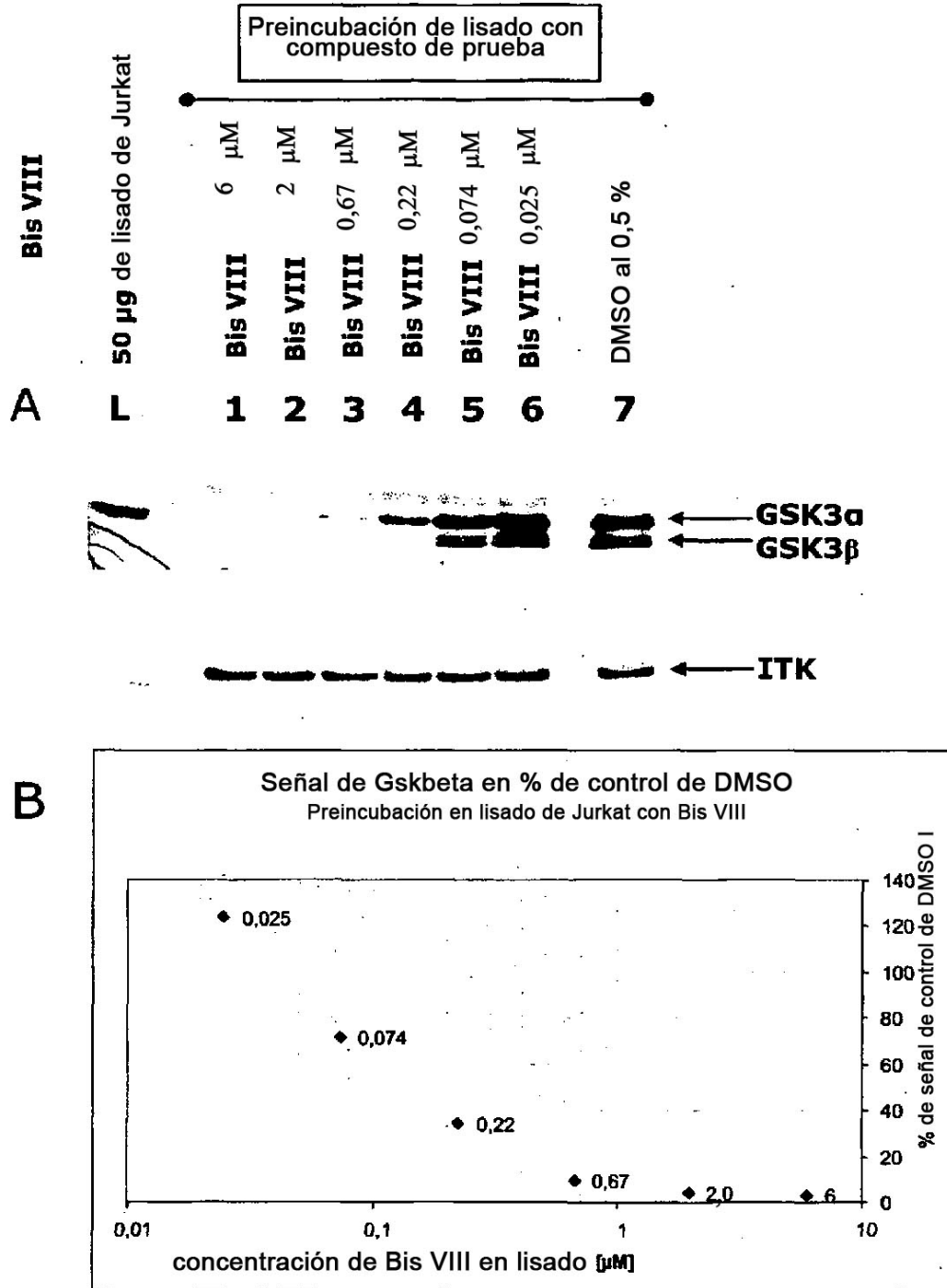


Figura 5 (1/2):

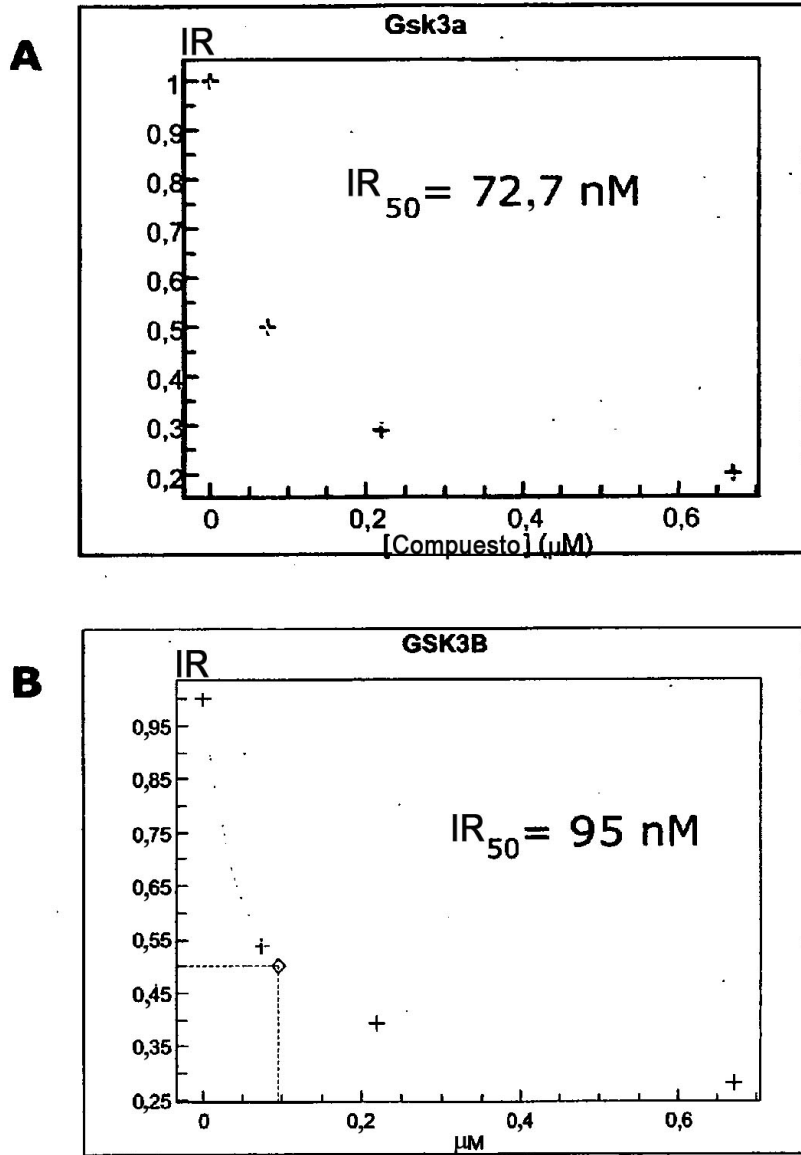


Figura 5 (2/2):

