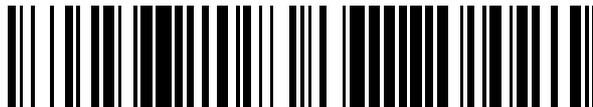


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 637**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2012 E 12717826 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2699910**

54 Título: **Métodos para determinar la unión de un ligando a una proteína diana utilizando un ensayo de cambio térmico**

30 Prioridad:

**18.04.2011 GB 201106548**

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

**14.04.2016**

73 Titular/es:

**BIOTARGET ENGAGEMENT INTEREST GROUP  
AB (100.0%)  
c/o Pelago Bioscience AB, Nobels Väg 3  
171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**NORDLUND, PÄR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 566 637 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**

Métodos para determinar la unión de un ligando a una proteína diana utilizando un ensayo de cambio térmico

5 La presente invención se refiere a métodos de investigación de las interacciones de unión de un ligando a una proteína mediante el uso de un análisis de cambio térmico.

Más particularmente, la invención se refiere a métodos para determinar la unión de un ligando a una proteína diana no purificada que comprende las etapas de calentar la proteína diana no purificada y el ligando y analizar el producto para detectar la proteína diana soluble. Los métodos de la invención utilizan una etapa de separación para separar las proteínas solubles de las insolubles después del tratamiento térmico que puede estimar la cantidad de proteína diana soluble y así la proteína diana unida al ligando térmicamente estable. También se describe un instrumento para uso en los métodos que comprende un medio de calentamiento, un medio para separar la proteína soluble de la insoluble y un medio para analizar la proteína soluble o insoluble en cuanto a la presencia de la proteína diana. Se describe además el uso de un kit que comprende un anticuerpo o una etiqueta de fusión no proteica en los métodos de la invención.

La detección de la unión de un ligando a las proteínas es importante en muchas áreas diferentes de la biología y la medicina. En particular, durante el desarrollo de compuestos químicos en fármacos, es importante saber si el compuesto interactúa con la diana farmacológica. Por consiguiente, la monitorización de las interacciones proteína diana-ligando se puede utilizar en el cribado inicial de ligandos que interactúan a partir de grandes bibliotecas químicas, así como durante la optimización de un ligando inicial en un fármaco candidato. Además, es importante conocer la interacción de un fármaco con otras proteínas (las llamadas "interacciones en lugares diferentes a la diana") donde dichas interacciones pueden dar lugar a efectos secundarios de los tratamientos.

En otras aplicaciones médicas, es importante determinar si un fármaco en particular puede unirse a su proteína diana en un paciente o en un modelo animal (para la enfermedad). Para que un medicamento sea eficaz, tiene que ser absorbido en el estómago/intestino (o si se inyecta, debe entrar en la sangre) y ser transportado a la ubicación correcta en el cuerpo. Si el fármaco no está dirigido a una proteína extracelular o receptor, el fármaco también necesita ser transportado a la célula con el fin de permitir que acceda a la proteína diana. Durante todos estos procesos de transporte, el fármaco tiene que ser estable y evitar la excreción desde el riñón y la degradación, por ejemplo, en el hígado o por las enzimas metabólicas celulares. El fármaco necesita además sobrevivir a los procesos de resistencia celulares a los fármacos, tales como la degradación por las enzimas P450 o la translocación de los canales de flujo de salida multifármaco. Por último, el fármaco tiene que ser capaz de unirse a la proteína diana del fármaco. La resistencia a fármacos en el cáncer y en la terapia antiinfecciosa es a veces debida a mutaciones sutiles en la región del sitio de unión del fármaco a las proteínas diana. Sin embargo, a lo largo del camino que recorre el fármaco hasta la diana, los fármacos se enfrentarán a muchos entornos diferentes del cuerpo y potencialmente pueden interactuar con muchas proteínas diferentes a lo largo del camino.

La alta complejidad de la ruta que tiene que recorrer el fármaco hasta llegar al sitio de unión a la proteína diana es probablemente una de las razones por las que los métodos de predicción actuales basados en diagnósticos clínicos, la determinación del perfil de expresión y la secuenciación sólo tienen un éxito limitado en la predicción de la eficacia terapéutica. Un posible medio para medir si un fármaco ha alcanzado su objetivo es llevar a cabo la medición directa de la interacción fármaco-proteína diana en las células diana del cuerpo. Aunque esto no mediría acontecimientos posteriores a la unión a la diana del fármaco, integraría todas las etapas que van desde el fármaco hasta la diana como se ha descrito anteriormente. Por tanto, tales medidas pueden abarcar muchas de las etapas críticas de la eficacia terapéutica y sería un valioso predictor de la eficacia de muchos fármacos y, por lo tanto, una herramienta de diagnóstico clínico. Por lo tanto, es deseable poder detectar las interacciones ligando-proteína en muestras no purificadas, por ejemplo, las de los pacientes, para estudiar las interacciones farmacológicas y las eficiencias.

En la técnica se han desarrollado ensayos de cambio térmico que pueden evaluar la unión proteína-ligando, donde la proteína está en forma purificada. Estos ensayos se han desarrollado sobre la base de dos principios, concretamente, que una proteína purificada se fundirá y se desplegará a una temperatura particular y que la unión de un ligando a una proteína estabilizará térmicamente la proteína. Por lo tanto, la unión de un ligando a una proteína se puede detectar en base a que la proteína purificada mostrará un aumento de la estabilidad térmica una vez que un ligando se une y, por tanto, la proteína se fundirá a una temperatura superior una vez que el ligando está unido a la de una proteína purificada sola. Vedadi et al (PNAS, 103(43), 15835-15840, 2006) evaluaron los métodos de detección química para identificar ligandos que promueven la estabilidad de la proteína, la cristalización y la determinación de la estructura. En estos métodos, la estabilidad térmica de proteínas purificadas recombinantes se evaluó después del cribado contra las bibliotecas de moléculas pequeñas. El aumento de la estabilidad térmica de la proteína y, por lo tanto, la unión del ligando se midió usando fluorimetría (donde se utilizaron sondas fluorescentes) o dispersión de luz estática. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, este método utilizaba proteínas purificadas que se fundían a una temperatura particular (como se determina por una muestra de referencia que utiliza la proteína no ligada) que permite un aumento de la estabilidad a la temperatura de fusión a medir.

65

Moreau et al (Mol. Bio Syst., 6, 1285-1292, 2010), utilizaron recientemente la GFP como un sistema indicador para determinar la estabilidad de una proteína diana y su estabilización asociada al ligando, donde la GFP se fusionó a la proteína diana. Sin embargo, este método no es ideal. En primer lugar, el método requiere la construcción y las expresiones de una proteína de fusión y, por tanto, no puede utilizarse en las células y tejidos naturales, sino sólo en las células transformadas. Además, el método sólo se puede utilizar para detectar la unión del ligando a las proteínas que son menos estables que la GFP. Finalmente, el uso de aditivos o sales afecta a la estabilidad de la GFP y, por lo tanto, debe usarse una GFP de control para cada experimento.

Por lo tanto, los ensayos de cambio térmico descritos en la técnica anterior solamente se utilizaron en relación con la proteína purificada, o en un caso (Moreau et al, *supra*) en relación con una proteína purificada mezclada con otra proteína después de la purificación, donde la proteína está fusionada con la GFP. Por el contrario, los inventores han desarrollado un ensayo que puede utilizarse para determinar la unión de un ligando a una proteína no purificada en donde la proteína no purificada no se detecta basándose en la actividad enzimática de cualquier etiqueta o péptido, polipéptido o proteína fusionado al mismo. Por lo tanto, los inventores han demostrado que es posible que una proteína no purificada, por ejemplo, en una célula, lisado celular u otro líquido complejo que contiene muchas biomoléculas diferentes, se despliegue y precipite con una dependencia de la temperatura característica, de una manera similar a una proteína purificada. Este descubrimiento fue inesperado puesto que las condiciones que están presentes en las células y en las muestras no purificadas son bastante diferentes a las de una muestra purificada. Por lo tanto, en una muestra no purificada o en una célula, se podría esperar que los diferentes procesos afectasen a la solubilidad de una proteína, que actuaría en paralelo, tales como los diferentes efectos de hacinamiento de la proteína o las diferentes chaperonas o las interacciones con la membrana de proteínas parcialmente desplegadas. Los inventores han usado este hallazgo como se ha descrito anteriormente para desarrollar un ensayo de cambio térmico, que puede detectar la unión del ligando a las proteínas en muestras no purificadas, basado en la capacidad de las proteínas no purificadas de fundirse a temperaturas características. El método es genérico y puede ser utilizado para la mayoría de las combinaciones entre proteína diana y ligando, a diferencia de los métodos de la técnica anterior. El ensayo investiga la estabilidad térmica de la proteína diana en forma no purificada a una temperatura particular, donde un aumento de la estabilidad térmica es indicativo de la unión al ligando. Por lo tanto, la estabilidad térmica de la proteína diana no purificada con el ligando añadido se compara con la estabilidad térmica de la proteína diana no purificada sin ligando. Cualquier aumento de la estabilidad térmica de la proteína diana no purificada más el ligando en comparación con la proteína diana no purificada sin ligando indica que el ligando se ha unido a la proteína diana no purificada. En particular, cualquier aumento de la estabilidad térmica se determina detectando si la proteína diana es soluble o no después del tratamiento térmico. El ensayo de la invención, por lo tanto, emplea una etapa simple de separación de las proteínas solubles de las insolubles para identificar cualquier proteína diana soluble. Como se ha descrito anteriormente, dichas proteínas solubles están asociadas con una estabilidad térmica a la temperatura aplicada a la muestra y, por lo tanto, de tener un ligando unido. La etapa de separación para discriminar entre las proteínas solubles e insolubles permite, por lo tanto, que el ensayo de la invención sea utilizado para detectar cualquier proteína diana y, por lo tanto, proporciona un método genérico.

En la presente memoria se divulga un método para identificar un ligando que puede unirse a una proteína diana en el que dicha proteína diana es no purificada que comprende las etapas de

- (a) exponer una muestra que comprende dicha proteína diana no purificada y una molécula de ensayo, a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de dicha proteína diana
- (b) procesar el producto de la etapa (a) con el fin de separar la proteína soluble de la insoluble y
- (c) analizar las proteínas solubles de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

Como se ha descrito anteriormente, los métodos divulgados en la presente memoria se refieren a la detección de la unión de un ligando a una proteína diana en una muestra no purificada donde sorprendentemente una proteína diana en dicha muestra puede fundirse o desplegarse con una temperatura característica. Cuando una proteína diana se une a un ligando, la estabilidad térmica de la proteína diana generalmente aumenta y, por lo tanto, la proteína diana se puede fundir a una temperatura más alta cuando el ligando se une que cuando no el ligando no está presente. La aplicación de una temperatura a una muestra en la que habitualmente se funde/se despliega la proteína diana no unida puede, por lo tanto, provocar que la proteína diana no unida se despliegue y que la proteína diana a la que se un ligando, permanezca en gran medida plegada. La detección de niveles superiores de proteína diana plegada es indicativa, por lo tanto, de la unión del ligando. Las proteínas diana plegadas son generalmente solubles mientras que las proteínas no plegadas son generalmente insolubles. Por lo tanto, la solubilidad de una proteína está ligada a su estabilidad térmica. Por lo tanto, la detección de niveles superiores de proteína diana soluble después del tratamiento térmico usando una temperatura a la cual la proteína diana por lo general comienza a precipitar y a convertirse en insoluble, indica la presencia de proteína diana plegada con un aumento de la estabilidad térmica y, por lo tanto, la unión del ligando.

La invención se refiere a análisis de muestras impuras. Esto permite la utilización de tecnología en un método del tipo "biosensor". Las muestras no purificadas, en particular las muestras clínicas o ambientales, que pueden contener un ligando de interés se pueden analizar mediante la adición de la proteína diana a la muestra, ya sea

como una proteína purificada o en una muestra no purificada (por ejemplo como un lisado celular). Tales métodos permiten la cuantificación de la presencia de un fármaco u otro analito en una muestra de suero, aunque la proteína diana no esté originalmente presente en el suero. A la muestra clínica puede añadirse un lisado celular que contiene la proteína diana, por ejemplo, de las células diana del fármaco.

5 También se divulga un método más general de determinación de si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés comprende las etapas de:

- 10 (a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando;
- (b) procesar el producto de la etapa a) con el fin de separar la proteína soluble de la insoluble y
- 15 (c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

Sin embargo, en particular, la invención proporciona un método para determinar si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés que comprende las etapas de:

- 20 (a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando;
- (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa (a) y
- 25 (c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana se detecta mediante la unión por afinidad de un resto de detección o por espectrometría de masas.

Además, la invención proporciona un método para identificar un ligando capaz de unirse a una proteína diana que comprende las etapas de:

- 30 (a) exponer una muestra no purificada que comprende dicha proteína diana y una molécula de ensayo a una serie de diferentes temperaturas, que incluyen una temperatura que es igual a o mayor que la temperatura de fusión inicial de la proteína diana;
- (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa (a) y
- 35 (c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana se detecta mediante la unión por afinidad de un resto de detección o por espectrometría de masas.

Además, la invención proporciona un método para determinar si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés, en el que dicho ligando no es una proteína de fusión, que comprende las etapas de:

- 45 (a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida;
- (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa (a) y
- (c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana se detecta mediante la unión por afinidad de un resto de detección o por espectrometría de masas.

50 El experto está familiarizado con el análisis de cambio térmico de las proteínas purificadas y las curvas de punto de fusión generadas de esta manera. El punto medio de la curva de punto de fusión puede ser tomado como el punto de fusión de la proteína y esta temperatura puede cambiar cuando se produce la unión del ligando. Se aprecia que dependiendo de la naturaleza del cambio causado por la unión al ligando, a ciertas temperaturas puede haber algo de fusión (precipitación) de ambas proteínas, unida y no unida, pero la precipitación se produce en mayor medida con la proteína no unida. Las temperaturas a las que el cambio es visible y la cantidad de proteína precipitada difiere son temperaturas discriminatorias y las temperaturas dentro de ese rango se pueden utilizar como una única temperatura discriminatoria según la etapa (a) anterior. Esto es particularmente cierto cuando se conoce el punto de fusión de las proteínas diana no unidas y unidas y el método se lleva a cabo como un ensayo para determinar la presencia de la proteína diana y/o el ligando en la muestra. Así, el ligando se puede añadir a una muestra para confirmar la presencia de la proteína diana.

65 El método de la invención es un método genérico para la determinación de la unión proteína ligando-proteína diana en una muestra no purificada. A menos que otra cosa quede clara por el contexto, la descripción en la presente memoria de "proteína no purificada" se aplica, con los cambios debidos, a 'muestras no purificadas'. Este método tiene muchas ventajas sobre los métodos de la técnica. En primer lugar, se elimina la necesidad de purificar las

5 proteínas con el fin de investigar la unión del ligando. Además, el método no requiere la expresión recombinante de la proteína diana ni la producción de una proteína que contiene una proteína de fusión indicadora (tal como en Moreau et al, *supra*). Además, permite la investigación de la unión del ligando en el cultivo celular y en las muestras de animales o pacientes con las que previamente no fue posible usar ensayos de unión de cambio térmico. Como se ha descrito anteriormente, esto es importante para analizar si un fármaco en particular se puede utilizar de manera eficiente para tratar la enfermedad en un paciente en particular y para facilitar la determinación de la dosis óptima del fármaco. Por ejemplo, esto tiene importantes implicaciones en el tratamiento del cáncer y las enfermedades infecciosas, donde a menudo se puede producir resistencia a los fármacos. En tales casos, poder detectar pacientes que no se pueden tratar eficazmente con el fármaco, permite iniciar otras terapias o ajustar la dosis del fármaco.

10 Además, las etapas de detección del método de la invención no requieren el uso de un equipo o maquinaria costosos; de hecho, la etapa de separación se puede lograr usando un filtro y detectando la proteína diana usando, por ejemplo, anticuerpos. El método se puede utilizar con cualquier proteína para detectar la unión de un ligando; no hay ningún requisito para diseñar sondas específicas etc. para cada proteína a detectar en el método. Por lo tanto, el método de la invención representa una forma eficiente y fiable de determinar la unión proteína-ligando en una muestra no purificada. Además, como se describe más adelante, el método puede ser fácilmente multiplexado y utilizado para seleccionar en cuanto a interacción bibliotecas de ligandos o proteínas.

15 La expresión "proteína diana" como se usa en la presente memoria, se refiere a una proteína que se está evaluando en el método de la invención para la unión del ligando. Por tanto, la proteína diana puede ser cualquier proteína que está presente en una muestra. La proteína diana puede ser de origen natural, por ejemplo, una célula o lisado celular o muestra de un animal o paciente o puede ser expresada de forma recombinante, por ejemplo, puede ser expresada a partir de un plásmido que se ha transformado en una célula. Como se mencionó anteriormente, la proteína diana puede no estar inicialmente presente en la muestra, pero puede añadirse a la misma para investigar la presencia de ligando en la muestra de partida. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la "muestra" es la muestra de ensayo que se trata en la etapa (a) y esta puede ser diferente de la muestra de partida, por ejemplo, la muestra clínica. Del mismo modo, el ligando se puede añadir a la muestra de partida. Las adiciones de cantidades conocidas de proteína diana o ligando pueden ayudar a obtener datos cuantitativos.

20 La proteína diana puede estar en forma de tipo silvestre, es decir, como normalmente existe en la naturaleza o puede comprender una o más mutaciones. Por lo tanto los genes/ADNc/regiones de codificación que codifican una proteína se puede mutar para producir variantes de esa proteína, por ejemplo, mutantes con diferentes capacidades para unir el ligando. Como se describe más adelante, estos mutantes se pueden producir en un sistema de expresión en el que en las variantes, por ejemplo, se ha incrementado la unión al ligando, y se pueden seleccionar utilizando los métodos de la invención.

25 Por lo general, la proteína diana tendrá una conformación nativa o de tipo nativa y será soluble. Proteínas nativas o de tipo nativo como se expresan en forma soluble y/o correctamente plegadas. Las proteínas de la membrana de tipo nativo no tienen que estar presentes libres en solución, pero pueden estar presentes en las membranas celulares o vesículas de membrana en lugar de cuerpos de inclusión. Por lo tanto, las proteínas nativas, generalmente no son insolubles, y están presentes en los cuerpos de inclusión, agregadas o mal plegadas.

30 La proteína diana puede existir en la forma de numerosas variantes en una población animal. Estas variantes pueden existir dentro de una población de animales sanos, o la variación de la proteína puede conducir a enfermedad o resistencia a los fármacos dentro de una población. Los métodos de la invención proporcionan un medio de selección de un ligando de entre una gama de diferentes variantes de proteína diana. Dicha información puede ser útil para el desarrollo de ligandos que se unen específicamente a ciertas variantes de proteínas o para determinar qué tipo de terapia puede ser la más adecuada para un paciente en función de la variante de proteína que expresan naturalmente. Por lo tanto, el método puede ser repetido con dos o más proteínas diana, siendo las proteínas diana variantes de la misma proteína.

35 Una "proteína soluble" se puede definir en referencia a la posesión de una conformación nativa o de tipo nativa. Además, una proteína soluble se puede describir como una proteína que permanece en el sobrenadante después de la centrifugación de una muestra (con una etapa de lisis previa si dicha proteína está dentro de una célula. La centrifugación generalmente puede llevarse a cabo entre 100 g y 20.000 g. La duración de la centrifugación puede ser desde 1 minuto (generalmente por lo menos 10 minutos) a por lo menos 1 hora, donde la duración requerida generalmente disminuye a medida que aumenta la fuerza centrífuga. Condiciones particularmente adecuadas para proporcionar solamente proteínas solubles en el sobrenadante resultante incluyen 30 minutos a 3.000 g o 15 minutos a 20.000 g.

40 La expresión "proteína diana no purificada" se refiere a la proteína diana cuando no está en forma aislada o, como alternativa, cuando está presente con otros compuestos, por ejemplo, proteínas. La proteína diana no purificada para utilizar en los métodos de la invención están en forma no purificada antes de la adición de la molécula de ensayo (ligando potencial) o en ausencia de la molécula de ensayo. Por lo tanto, la proteína diana no purificada está presente con compuestos distintos de la molécula de ensayo (ligando potencial), que se ensaya para determinar si es o no es un ligando para la proteína diana. Así pues, la proteína diana no purificada incluye la proteína diana

cuando está comprendida dentro o sobre las células, lisados celulares y muestras obtenidas directamente de los pacientes (pacientes humanos o pacientes animales o modelos de enfermedades, por ejemplo, perro, gato, mono, conejo, ratón, rata, etc.), tales como muestras de tejido, sangre, suero, plasma, linfa, etc. La proteína diana no purificada incluye la proteína diana cuando está comprendida en una o más colonias de células, donde una colonia de células se define como un grupo circunscrito de células, normalmente derivadas de una única célula o un pequeño grupo de células que crecen en un medio sólido o semi-sólido (es decir, medios de cultivo con la adición de 0,1 % o más de agar). La proteína diana no purificada también puede estar comprendida en un cultivo líquido de las células. Un cultivo líquido de células puede comprender células que tienen todo su origen en una sola célula, es decir, las células dentro del cultivo líquido pueden ser clonales o el cultivo líquido puede comprender una suspensión de células diferentes. Las células de las colonias o en cultivo líquido pueden ser células procariotas, es decir, bacterias, o células eucariotas, por ejemplo, levaduras, eucariotas unicelulares tales como *Leishmania*, células de insecto o células de mamífero o líneas celulares. Las células en cultivo líquido o cultivadas como colonias se pueden formar como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus lividens*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*. Todo lo anterior son ejemplos de una muestra que comprende una proteína diana.

Como se mencionó anteriormente, la clave para la presente invención es el hallazgo de que las muestras "sucias" pueden proporcionar información fiable cuando se someten a análisis de cambio térmico. De este modo, la muestra en (a) no está purificada, pero puede haber circunstancias en las que una proteína diana purificada ha sido añadida a una muestra de partida sucia. La muestra no está purificada y contiene componentes tales como otras proteínas, restos celulares, ácidos nucleicos, etc., como se describe en la presente memoria en el contexto de "proteína diana no purificada".

Generalmente, una proteína diana no purificada no ha sido sometida a un proceso de purificación que daría lugar a la purificación de la proteína diana. Dicho proceso de purificación puede comprender varias etapas y, por lo tanto, la proteína diana no purificada utilizada en la presente invención no ha sido sometida a todas las etapas necesarias para producir una proteína purificada. Por ejemplo, cuando la proteína está presente en un tejido, se pueden usar las etapas de extracción, precipitación y separación, por ejemplo, por centrifugación o cromatografía, para purificar la proteína. La proteína diana no purificada de la presente invención no se sometería a todas estas etapas y, por lo tanto, no se aislaría una proteína diana purificada. Es posible que la proteína diana no purificada pudiera haber sido sometida a una o más etapas, por ejemplo, la etapa de extracción de un proceso de purificación, siempre y cuando el proceso de purificación no se completase y no se aislase una proteína purificada. Por tanto, la proteína diana no purificada está presente generalmente con otros compuestos o proteínas y, por tanto, la proteína diana no está presente en forma aislada.

La expresión "molécula de ensayo" como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier molécula o compuesto, que se ensaya en los métodos de la invención para determinar si es o no es un ligando para la proteína diana. Como alternativa, la molécula de ensayo es un ligando potencial de la proteína diana. Por lo tanto, la molécula de ensayo o el ligando puede ser una proteína, polipéptido, péptido, ARN o una molécula de ADN. En una realización particular, la molécula/ligando puede ser un fármaco o producto farmacéutico, un metabolito celular o una hormona, por ejemplo, en el suero. La molécula de ensayo o el ligando pueden ser de origen natural o pueden producirse sintéticamente o recombinantemente, utilizando cualquiera de los métodos ya descritos o descritos más adelante.

La molécula de ensayo utilizada puede o no puede unirse a la proteína diana; en un aspecto el método de la invención determina o evalúa si una molécula o compuesto particular puede unirse a la proteína diana, es decir, si una molécula de ensayo o compuesto es un ligando. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para cribar una biblioteca de moléculas pequeñas para seleccionar moléculas que son capaces de unirse a la proteína diana. Algunas de las moléculas ensayadas pueden no unirse, mientras que otras pueden unirse a la proteína diana. Además, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para identificar las variantes de moléculas pequeñas que sabe que se unen a la proteína diana, que pueden unir la proteína diana con mayor afinidad (o, alternativamente, con menor afinidad) donde esto se refleja a menudo en el grado de estabilización térmica. Por lo tanto, las moléculas de ensayo pueden ser ligandos mutados o parejas de unión a la proteína diana conocidos (o desconocidos). La producción de tales moléculas mutadas se consigue utilizando cualquiera de los procesos de mutación descritos en la presente memoria.

Por lo tanto, en la presente memoria se divulga un método para identificar un ligando capaz de unirse a una proteína diana que comprende las etapas de:

- (a) exponer una muestra no purificada que comprende dicha proteína diana y una molécula de ensayo a una serie de diferentes temperaturas, que incluyen una temperatura que es igual a o mayor que la temperatura de fusión inicial de la proteína diana;
- (b) procesar los productos de la etapa a) con el fin de separar la proteína soluble de la insoluble y
- (c) analizar cualquiera o ambas de las fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

El término "ligando" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de ensayo o más generalmente a un compuesto que puede unirse a la proteína diana. Una proteína diana puede tener un co-factor o sustrato fisiológico unido a la misma, pero los métodos descritos en la presente memoria investigan el punto de fusión de una proteína diana unida a un ligando de interés de fusión en comparación con la proteína diana cuando no está unida al ligando (proteína diana no unida). El ligando de interés se puede unir a otra parte de la proteína o puede competir por la unión, por ejemplo, con un ligando fisiológico. Los ligandos de interés pueden ser fármacos o candidatos a fármacos o pueden ser parejas de unión de origen natural, sustratos fisiológicos etc. Por lo tanto, el ligando puede unirse a la proteína diana para formar un complejo más grande. El ligando puede unirse a la proteína diana con cualquier afinidad es decir, con afinidad alta o baja. En general, un ligando que se une a la proteína diana con alta afinidad puede tener como resultado una proteína diana térmicamente más estable en comparación con un ligando que se une a las proteínas diana con una afinidad más baja. Generalmente, un ligando capaz de unirse a una proteína diana puede tener como resultado la estabilización térmica de que esa proteína diana en por lo menos 0,25 o 0,5 °C y preferiblemente al menos 1, 1,5 o 2 °C.

Por lo tanto, cuando ya se sabe que una molécula de ensayo se une a la proteína diana (y por lo tanto es un ligando para la proteína diana), los métodos divulgados en la presente memoria pueden usarse para evaluar la unión del ligando a la proteína diana, por ejemplo, para determinar la fuerza de la interacción. En este aspecto, se divulga un método para evaluar la unión del ligando a una proteína diana en el que dicha proteína diana no está purificada que comprende las etapas de a) exponer una muestra que comprende dicha proteína diana y dicho ligando, a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de dicha proteína diana, b) procesar el producto de la etapa a) con el fin de separar la proteína soluble de la insoluble y c) analizar las proteínas solubles de la etapa b) para detectar la presencia de la proteína diana en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

Con el fin de evaluar o determinar la unión de un ligando a una proteína diana no purificada o para identificar un ligando para una proteína diana no purificada, generalmente se añade a la muestra la molécula de ensayo o ligando. Sin embargo, es posible que la molécula de ensayo o ligando ya esté presente en una muestra que comprende la proteína diana no purificada, por ejemplo, si es de origen natural. Por lo tanto, se describe un método para identificar un ligando que puede unirse a una proteína diana en el que dicha proteína diana no está purificada que comprende las etapas de

(ai) añadir una molécula de ensayo a dicha proteína diana no purificada

(a) exponer el producto de la etapa (ai) a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de dicha proteína diana

(b) procesar el producto de la etapa (a) con el fin de separar las proteínas solubles de las proteínas insolubles y

(c) analizar las proteínas solubles de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana en el que la presencia de la proteína diana indica que dicha molécula se une a dicha proteína diana y es un ligando capaz de unirse a dicha proteína diana y en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

Generalmente, cuando la molécula de ensayo (ligando potencial) está presente extracelularmente, por ejemplo, en solución, esta puede ser simplemente añadida a la proteína diana no purificada, por ejemplo, mezclada junto con la proteína diana no purificada donde esta también está en solución o se deja gotear sobre la proteína diana, por ejemplo, donde la proteína diana está presente en una alícuota de células cosechadas. Como alternativa, la molécula de ensayo (potencial ligando) se puede expresar de forma recombinante de un vector que codifica la molécula de ensayo. La etapa de adición de la molécula de ensayo, por lo tanto, puede implicar transformar o transfectar de una muestra celular con el vector que codifica la molécula de ensayo y/o inducir la expresión de la molécula de ensayo a partir del vector en una muestra celular una vez que se ha realizado la transformación o transfección. La etapa de adición de la molécula de ensayo incluye, además, inducir la expresión de una molécula de ensayo codificada por un gen de origen natural en una muestra celular.

Además, cuando la proteína diana está presente en una célula, el método puede requerir el transporte de una molécula de ensayo extracelular o ligando a la célula para contactar con la proteína diana. Sin embargo, en el caso de moléculas de ensayo o ligandos que se unen a una proteína diana en la superficie celular, no hay necesidad de transporte en la célula. Como alternativa o adicionalmente, cuando la proteína diana está presente en una célula (o en la superficie celular), se puede llevar a cabo una etapa de lisis antes, simultáneamente o después de añadir la molécula de ensayo. Tal etapa de lisis permite el contacto entre la proteína diana y la molécula de ensayo o el ligando y/o la posterior evaluación de cualquier unión entre la molécula de ensayo o el ligando y proteína diana. Por lo tanto, cualquier etapa de lisis necesaria se lleva a cabo generalmente antes de la etapa de separación del método de la invención. Será evidente que sólo será necesario llevar a cabo una etapa de lisis en muestras en las que la proteína diana está comprendida dentro de una celda. La etapa de lisis puede ser térmicamente dependiente es decir, la lisis sólo se puede producir a una temperatura particular, por ejemplo, al final de un ciclo térmico.

La etapa de lisis descrita en la presente memoria tendrá diferentes requisitos dependiendo de si las células se someten a tratamiento térmico antes o después de cualquier etapa de lisis. Para las células sometidas a lisis antes del tratamiento térmico, preferiblemente, la etapa de lisis es no desnaturizante, permitiendo a las proteínas diana

retener una conformación nativa, es decir, correctamente plegada o similar a la nativa. Esto se denomina en la presente memoria lisis nativa. Esto puede llevarse a cabo químicamente o de otro modo usando los reactivos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, urea, tampones o detergentes que contienen lisozima. El grado de lisis debe ser suficiente para permitir que las proteínas de la célula pasen libremente fuera de la célula.

5 Generalmente, cuando se trata con proteínas unidas a la membrana, la lisis se lleva a cabo en presencia de detergentes o anfífilos, por ejemplo Triton X-100 o dodecilmaltósido, para liberar la proteína de la membrana. La etapa de lisis, alternativamente, puede llevarse a cabo mediante congelación-descongelación de las células o colonias. Más preferiblemente, la lisis se lleva a cabo utilizando tanto tampón de lisis nativo como congelación-descongelación de las células. Preferiblemente, el tampón de lisis contiene lisozima, por ejemplo, 50-750 µg/ml, más preferiblemente al 100-200 µg/ml. La ADNasa también se puede encontrar en el tampón de lisis nativo preferiblemente a 250-750 µg/ml. El tampón de lisis nativo puede contener, por ejemplo, Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, lisozima (200 µg/ml) y ADNasa I (750 µg/ml). Para las proteínas diana que se sabe que se insertan en las membranas celulares, los detergentes se añadirían al tampón de lisis a concentraciones típicas en las que se sabe que se solubilizan las proteínas insertadas en la membrana en una forma nativa, tal como n-dodecil-β-maltósido 1 %.  
10  
15 Generalmente, las células se expondrán al tampón de lisis durante 15-60 minutos, preferiblemente alrededor de 30 minutos. La etapa de congelación-descongelación preferiblemente se repite, es decir, dos o más ciclos, preferiblemente se realizan 3 o más ciclos de congelación-descongelación. En una realización preferida, la lisis se consigue mediante una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con tampón de lisis y tres ciclos de congelación- descongelación x 10 minutos.

20 Generalmente, el porcentaje de células lisadas en una muestra (por ejemplo, una colonia de células o cultivo de células) durante la etapa de lisis es 5-100 %. Por lo tanto, no es necesario cuando se realiza una etapa de lisis que todas las células de una muestra sean lisadas. Sólo se requiere que un pequeño porcentaje sea lisado para liberar suficiente proteína diana para cualquier contacto con el ligando y/o a para ser sometido a la etapa de separación.

25 Como se ha descrito brevemente más arriba, es posible que la molécula de ensayo o ligando ya esté presente en una muestra que comprende la proteína diana. En este ejemplo, puede ser posible investigar la unión del ligando natural a una proteína diana, por ejemplo, diluyendo la muestra con tampón y detectar cualquier cambio negativo en la estabilidad térmica de la proteína diana cuando se libera un ligando.

30 Los métodos de la invención requieren que la muestra no purificada se exponga a “una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de dicha proteína diana”. Esto se refiere a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana en ausencia de la molécula de ensayo (potencial ligando). Asimismo, la muestra no purificada se expone a “una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando”. “No unida” se refiere a la proteína diana cuando no está unida a, es decir, en ausencia de, el ligando de interés.

40 Por lo tanto, como se ha descrito previamente, los inventores han encontrado que las proteínas en forma no purificada generalmente precipitan con una dependencia de la temperatura particular (es decir, que tienen diferentes temperaturas de fusión) de forma similar a las proteínas purificadas, a pesar de las condiciones variables que se encuentran con las muestras no purificadas y en particular en las células. Por lo tanto, la proteína puede precipitar sobre un pequeño rango de temperatura. Ocasionalmente, algunas proteínas pueden someterse a varias transiciones en su estado durante el calentamiento en un intervalo de temperatura que indica que hay varias formas de la proteína presente en la muestra (por ejemplo, diferentes formas de corte y empalme, formas fosforiladas, o unida a otras proteínas). En esta situación, es posible que una molécula de ensayo o ligando no se una a todas las formas de la proteína en todos los estados de transición. Por lo tanto, una molécula de ensayo o ligando solamente se pueden unir a proteínas en una o más de sus estados de transición. Por lo tanto, es posible que una molécula de ensayo o ligando sólo sea capaz de estabilizar térmicamente ciertos estados de transición o formas de la proteína y los cambios térmicos de la estabilidad únicamente se verán para estos estados de transición.

50 Cuando una proteína diana precipita en un pequeño intervalo de temperatura, la temperatura de fusión inicial es la primera temperatura en el intervalo y la temperatura de fusión final es la última temperatura del intervalo. Por lo tanto, la temperatura de fusión inicial es la temperatura más baja a la que la proteína diana comienza a precipitar, por ejemplo, al menos 5 % de la proteína diana precipita y la temperatura de fusión final es la primera temperatura a la que no se detecta ninguna proteína diana soluble, por ejemplo, menos de 5 % de la proteína diana está en forma soluble. Generalmente, al menos 95 % de la proteína diana se funde y precipita.

60 Por lo tanto, cuando una proteína diana precipita en un intervalo de temperatura, la proteína diana puede empezar a precipitar o desplegarse a una temperatura particular, momento en el que la cantidad de proteína diana soluble presente comienza a disminuir y la cantidad de proteína diana insoluble presente aumentará (ya que la estabilidad térmica está vinculada a la solubilidad). Por lo tanto, parte de la proteína soluble todavía puede ser detectable a la temperatura de fusión inicial hasta que se aplica una temperatura ligeramente superior, momento en el que poco o nada de proteína soluble es detectable.

65

Por consiguiente, la temperatura final de fusión para una proteína es una temperatura particular a la que hay una disminución significativa de la proteína soluble detectada, generalmente al menos 95 % de la proteína es insoluble. Para las proteínas problemáticas que tienen múltiples transiciones, cada una de estas transiciones puede tener como resultado que una menor cantidad de proteína se convierta en insoluble, pero esta seguiría siendo suficientemente significativa como para ser medida (por ejemplo, al menos el 10 % de la proteína soluble se convierte en cada transición). Cuando la proteína precipita en un pequeño intervalo de temperatura, si el porcentaje de proteína soluble disminuye hasta que ninguna proteína soluble es detectable y, por lo tanto, la proteína está completamente desplegada o precipitada, se puede determinar una temperatura inicial y final de la fusión. Por lo tanto, a la temperatura de fusión inicial de un intervalo tal de temperatura es decir, la temperatura más baja a la que la proteína diana comienza a fundirse o precipitar, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de la proteína diana puede fundirse o precipitar. Como alternativa, a la temperatura de fusión inicial de un intervalo de temperatura, la cantidad de proteína diana soluble detectada disminuye al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %. Además, la cantidad de proteína diana insoluble presente puede aumentar en al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %.

También es posible que una proteína diana pueda desplegarse y precipitar a una temperatura específica. En este caso, preferiblemente al menos 95 % de la proteína diana estará en forma insoluble a una temperatura específica y, por lo tanto, la proteína puede no precipitar sobre un pequeño intervalo de temperatura. La temperatura inicial de fusión de tales proteínas puede por lo tanto estar cerca de la temperatura de fusión final.

La temperatura que se puede aplicar en los métodos descritos en la presente memoria puede ser cualquier temperatura desde la temperatura de fusión inicial a la que la proteína diana comienza a desplegarse. Cualquier temperatura igual o superior a la temperatura de fusión inicial será capaz de causar o aumentar la precipitación de la proteína diana. Por lo tanto, una proteína diana con una estabilidad térmica mayor debido a la unión del ligando generalmente no se desplegará ni precipitará a esta temperatura y se detectará una mayor cantidad de proteína soluble en comparación con la proteína diana solo que ya está completamente desplegada o que ha empezado a desplegarse. La temperatura es, por lo tanto, discriminatoria, provocando o aumentando la precipitación de la proteína diana no unida a un mayor grado que la que provoca o aumenta la precipitación de la proteína diana unida al ligando de interés.

La detección de una mayor cantidad de proteína diana soluble a una temperatura particular, cuando una molécula de ensayo está presente en comparación con la cantidad de proteína diana soluble presente cuando la molécula de ensayo está ausente es indicativa de que la molécula es un ligando para la proteína diana y que la molécula de ensayo se une a la proteína diana. Cuando la temperatura utilizada en los métodos descritos en la presente memoria es la temperatura de fusión inicial o una temperatura entre la temperatura de fusión inicial y la temperatura de fusión final (es decir, no una temperatura que da como resultado que al menos un 95 % de la proteína diana sea insoluble (la temperatura de fusión final o una temperatura superior a esta)) puede ser necesario llevar a cabo una reacción de control simultáneamente para la proteína diana sin que haya un ligando presente, con el fin de comparar las cantidades de proteína soluble detectada en ambos casos, para detectar las muestras con el ligando cuando una mayor cantidad de proteína diana soluble está presente en comparación con la proteína diana solo. Esto normalmente se realiza midiendo la curva de fusión de la proteína en muestras similares no purificadas. Sin embargo, cuando se utiliza una temperatura en la invención a la que no se detecta o se detecta muy poca proteína diana soluble (es decir, proteína diana sin ligando), por ejemplo, la temperatura de fusión final, no hay necesidad de utilizar una comparación o de control para cada medición. En este caso, cualquier detección de la proteína soluble en el método indica la presencia de una proteína diana térmicamente estable y, por lo tanto, de la proteína unida al ligando. Dicha temperatura sería normalmente igual o mayor que la temperatura de fusión final.

Además, la temperatura puede ser elegida en los métodos descritos en la presente memoria para la detección sólo de los ligandos que se unen a la proteína diana con una alta afinidad. Por lo tanto, generalmente cuanto más alta es la temperatura a la que se detectan proteínas solubles y, por tanto, las proteínas diana unidas al ligando térmicamente estables, más probable es que la afinidad de la unión del ligando sea mayor. Por lo tanto, si solamente se requiere detectar interacciones de alta afinidad, se puede seleccionar una temperatura que sea más alta que la temperatura de fusión final, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más °C más alta que la temperatura de fusión final. Por lo tanto, preferiblemente, la temperatura seleccionada sería mayor que la temperatura de fusión final de un rango de temperatura. Como alternativa, si se desea identificar todas las moléculas/ligandos unidos a la proteína diana, se puede usar una temperatura más baja, por ejemplo, una igual a la temperatura de fusión inicial de un rango. Como alternativa, al seleccionar para las interacciones de alta afinidad, la temperatura discriminatoria de la etapa (a) será aquella que causa o aumenta la precipitación de la proteína diana no unida en un grado mucho mayor de lo que provoca o aumenta la precipitación de la proteína diana unida al ligando, por ejemplo, al menos 30 % más, preferiblemente al menos 50 % más, más preferiblemente al menos 60, 70 o 80 % más.

La afinidad de unión del ligando a la proteína diana se puede determinar a través de la realización de las etapas del método descrito anteriormente en un rango de concentraciones variables de ligando o de la proteína diana. En tales métodos, a la muestra tratada en la etapa (a) se habrán añadido a la misma una cantidad conocida de proteína o ligando diana. Se puede trazar una curva dosis-respuesta, y por lo tanto, determinar la constante de unión del ligando (es decir, la concentración de ligando o proteína diana a la que la mitad de la proteína diana se une al

ligando). Tal información de unión obtenida en una muestra clínica impura proporcionaría una interpretación más precisa de las características de unión del ligando a la proteína diana en condiciones fisiológicas en comparación con la información derivada de las muestras puras. Tal información podría tener aplicaciones útiles para establecer pautas posológicas para los pacientes o para encontrar una ventana terapéutica de un fármaco mediante estudios de constantes de unión aparentes en diferentes órganos del cuerpo. Por lo tanto, ciertos aspectos de los métodos divulgados en la presente memoria pueden comprender también una etapa más:

d) repetir las etapas a) a c) con uno o más (por ejemplo 2 o más, preferiblemente 3 o 4 o más) diferentes concentraciones de ligando o proteína diana.

La etapa de calentamiento puede llevarse a cabo usando cualquier fuente de calor que pueda calentar una muestra a una temperatura particular. Así pues, cuando la proteína diana no purificada y la molécula de ensayo (potencial ligando) están en forma líquida, entonces preferiblemente la etapa de calentamiento puede llevarse a cabo en un aparato de PCR. Sin embargo, también se pueden utilizar incubadoras, baños de agua, etc. Cuando la proteína diana se encuentra en una colonia de células, se usa preferiblemente una incubadora para llevar a cabo la etapa de calentamiento.

La invención abarca además la aplicación de un rango de temperaturas a la proteína diana y la molécula de ensayo y el procesamiento y análisis de la proteína diana después de incubación a cada temperatura con el fin de producir una curva de precipitación para cada combinación de proteína diana y molécula de ensayo. Por lo tanto, una proteína diana y el ligando pueden incubarse a cualquier rango de temperatura siempre y cuando se utilice una temperatura que sea capaz de provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana (es decir, sin ligando unido). Preferiblemente, por lo tanto, el rango de temperatura aplicado incluye la incubación a la temperatura de fusión inicial o a una temperatura superior a la temperatura de fusión inicial. Incubando la proteína diana no purificada y la molécula de ensayo en todo un rango de temperaturas, es posible determinar la temperatura a la que la proteína diana precipita cuando está unido el ligando. Además, si un control de muestra no purificada sin ligando se somete a las mismas temperaturas de incubación, es posible identificar las muestras de proteína unida al ligando sin conocimiento previo de la temperatura de fusión de la proteína diana. Preferiblemente, cualquier calentamiento de un control se llevaría a cabo al mismo tiempo que el calentamiento de la muestra no purificada y la molécula de ensayo/ligando. Mediante el uso de una curva de precipitación, también es posible determinar ligandos que tienen el mayor efecto sobre la estabilidad térmica cuando se está analizando más de un ligando.

Normalmente, se puede utilizar un rango de temperatura para producir una curva de precipitación donde las temperaturas usadas son aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 °C diferentes entre sí. Así, la proteína diana y la molécula de ensayo podrían incubarse a una cualquiera de más de 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72 y 75 °C, siempre que una de las temperaturas sea igual a o mayor que la temperatura inicial de fusión de la proteína diana. Cuando la proteína diana y la molécula de ensayo se calientan durante un intervalo de temperatura, esto puede llevarse a cabo en un aparato de PCR en el que se puede ajustar una temperatura inicial y luego aumentarla en la cantidad deseada después de una cantidad particular de tiempo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. Como se ha descrito anteriormente, después de calentar a cada temperatura, se puede extraer una pequeña alícuota o cantidad de muestra (por ejemplo 1 o 2 µl) con el fin de poder analizar la solubilidad de la proteína diana. Cuando la proteína diana no purificada está presente en una o más colonias de células, puede tomarse una parte de la colonia después de cada incubación, por ejemplo, mediante la colocación de papel de filtro en la parte superior de la colonia.

Con el fin de aplicar los métodos descritos en la presente memoria, es necesario determinar la temperatura(s) de fusión de la proteína diana de interés sin molécula de ensayo/ligando de modo que se pueda detectar cualquier cambio térmico en la presencia de la molécula de ensayo/ligando. Por lo tanto, la temperatura(s) de fusión de la proteína diana se puede determinar antes de llevar a cabo los métodos descritos en la presente memoria o antes de llevar a cabo una reacción de control simultánea con los métodos descritos en la presente memoria, donde un intervalo de temperaturas se aplican al control y a la proteína diana y la molécula, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para producir una curva de precipitación. La T<sub>ms</sub> (temperatura a la que se precipita el 50 % de la proteína) de muchas proteínas diana en muestras purificadas también es conocida en la técnica y, aunque la T<sub>ms</sub> para proteínas diana no purificadas es ligeramente diferente, éstas a menudo se pueden utilizar como una guía para las temperaturas de fusión de proteínas no purificadas.

“Una temperatura capaz de causar o aumentar la precipitación” de proteína diana, por tanto, se refiere a una temperatura o un intervalo de temperatura como se ha descrito anteriormente en la que hay un aumento en la precipitación o, como alternativa, en el despliegue o la fusión de una proteína diana, en comparación con la proteína diana a una temperatura inferior. La temperatura es, en general, una temperatura mayor en comparación con la temperatura a la que se encuentra normalmente la proteína diana, por ejemplo, a 37 °C para las proteínas diana en un paciente. Por lo tanto, la temperatura aplicada es generalmente superior a 37 °C, preferiblemente superior a 40 C, por ejemplo, superior a 50 C.

Por lo tanto, la temperatura utilizada en los métodos descritos en la presente memoria, provoca preferiblemente un aumento en la precipitación de la proteína diana de al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 %. Un

aumento en la precipitación de las proteínas por lo general tiene como resultado la producción de proteína insoluble, y por lo tanto, visto de otra manera, la temperatura usada en la invención puede provocar un aumento en la cantidad de proteína diana insoluble presente, por ejemplo, un incremento de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 %. En la presente invención, cualquier aumento de la precipitación puede ser medido mediante la medición de una disminución o reducción en la cantidad de proteína diana soluble presente, por ejemplo, una reducción de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 %. La medición de esta reducción, podría hacerse, por ejemplo usando la técnica de la transferencia de puntos o un ensayo ELISA en el que la cantidad de anticuerpo unido puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, la integración de las señales de fluorescencia de anticuerpos etiquetados con fluorescencia.

El método de la invención requiere además el uso de una etapa de separación (b) para separar las proteínas solubles de las insolubles. La etapa de separación puede implicar cualquier método de separación que sea capaz de separar la proteína soluble de la proteína insoluble. Por ejemplo, se puede utilizar como se ha descrito anteriormente una etapa de centrifugación o en una realización preferida, puede utilizarse una etapa de filtración. Por lo tanto, se puede utilizar un filtro para separar las proteínas solubles de las proteínas insolubles, donde las proteínas solubles pasarán a través de un filtro. Se pueden utilizar membranas de filtro estándar para el filtrado de muestras calentadas, donde los filtros tendrán generalmente un tamaño de poro de 0,015  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 0,35  $\mu\text{m}$  a 1,2  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de 0,45  $\mu\text{m}$  a 0,8  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, los filtros tienen tamaños de poro por debajo de 4,0  $\mu\text{m}$ , generalmente por debajo de 2,0  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente por debajo de 1,0  $\mu\text{m}$ . Cuando la proteína diana se produce o se expresa en células, tales como bacterias por ejemplo, *E. coli*, un tamaño óptimo de poro puede ser 0,1 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Cuando la proteína diana es de una célula eucariota o muestra, los tamaños de poro preferidos pueden ser mayores. Se apreciará que los filtros se fabrican y comercializan con un tamaño de poro particular, pero el proceso de fabricación puede ocasionalmente dar como resultado unos poros más pequeños o más grandes; los tamaños indicados, referidos al diámetro, son por lo tanto el tamaño de poro más común de un filtro dado. Aunque se hace referencia a una serie de posibles tamaños de poro, cualquier filtro individual tendrá normalmente un tamaño de poro designado, por ejemplo, 0,45  $\mu\text{m}$ . Los filtros adecuados son Super y GH polypro (de Pall) y Nucleopore (de Whatman).

Se apreciará que las proteínas diana de muestras eucariotas y procariotas y de diferentes tipos de células pueden requerir el uso de filtros con diferentes tamaños de poro. La selección de un filtro adecuado está dentro de la competencia de alguien experto en este campo. Por ejemplo, es posible seleccionar un tamaño de poro apropiado, mediante el uso de un conjunto de proteínas de ensayo para el tipo celular o de la muestra deseado e investigar su comportamiento con filtros de diversos tamaños de poro.

Como se ha descrito anteriormente, cuando la proteína diana está presente dentro de una célula, se puede llevar a cabo una etapa de lisis celular antes de la etapa de separación. También será necesaria la lisis de la célula cuando la muestra sea una muestra de células y se añada la proteína diana a la misma con el fin de ensayar la presencia de un ligando. Cuando el presente método se lleva a cabo en las colonias de células, la lisis puede llevarse a cabo directamente sobre estas colonias, es decir, no hay necesidad de recoger las colonias y hacerlas crecer en cultivo líquido (aunque esto se puede hacer). En este caso, se prefiere que la etapa de separación sea una de filtración. Además, cuando se realiza el método en las colonias de células, preferiblemente, el papel de filtro se superpone sobre las colonias para extraer las colonias de los medios de crecimiento semi-sólidos o sólidos. Como alternativa, los filtros se podrían colocar en el medio de crecimiento y sembrar directamente las células en el filtro, el filtro podría simplemente extraerse con las colonias ya sobre él. Preferiblemente, la extracción de las colonias de esta manera puede llevarse a cabo antes de la etapa de lisis. Como se indicó anteriormente, la lisis puede llevarse a cabo directamente sobre las colonias en un filtro. El filtro con las colonias unidas puede ser tratado con tampón de lisis o se puede superponer sobre otras membranas/filtros tratados con tampón de lisis.

[0057]La filtración también puede llevarse a cabo para cultivos de células líquidos, por ejemplo, cultivos líquidos que crecen en una placa multipocillo, por ejemplo, una placa de 96 pocillos.

La filtración se lleva a cabo después de realizar cualquier etapa de lisis necesaria. Se apreciará, sin embargo, que la filtración y la lisis pueden tener lugar simultáneamente cuando se considera toda una colonia, ya que algunas células pueden sufrir lisis antes que otras y, por lo tanto, puede filtrarse antes o al mismo tiempo que el resto se lisa.

Preferiblemente, cuando la etapa de separación es la filtración, las proteínas que pasan a través del filtro se retienen sobre un soporte sólido, por ejemplo, una membrana de captura, para permitir la detección/detección de la proteína(s) diana y después para permitir la identificación de la muestra(s) que contiene la proteína diana unida al ligando. Tales membranas de captura pueden comprender generalmente nitrocelulosa. Sin embargo, se apreciará que en este método es el primer filtro el que separa la proteína soluble de la insoluble. En una realización preferida, simplemente se puede permitir que las proteínas pasen a través del filtro, posiblemente como resultado de la acción capilar. En otra realización, la fuerza se puede aplicar verticalmente sobre el papel de filtro, en la que tales fuerzas pueden incluir la aplicación de presión o de vacío.

La membrana de captura puede fijar las proteínas solubles de la muestra individual(es) y de esta manera, es posible multiplexar este método. Por lo tanto, las posiciones de la proteína(s) diana en la membrana de captura se pueden

- comparar con el filtro que o bien lleva las colonias de células originales, si el método se lleva a cabo en las colonias de células, o los puntos de la muestra. Así, desde la transferencia de la filtración, es posible rastrear e identificar las muestras originales que comprenden la proteína diana y el ligando unido. Para ayudar en el proceso de identificación de las colonias que comprenden proteína diana unido al ligando, se pueden utilizar controles positivos.
- 5 Estos se hacen claramente visibles en las transferencias de filtración de colonias finales y pueden permitir que la membrana/transferencia se oriente correctamente con las colonias originales. Por lo tanto, después de llevar a cabo cualquier etapa de filtración, un soporte sólido tal como una membrana de captura permite identificar fácilmente las muestras que tienen la proteína diana unido al ligando.
- 10 El filtro con muestra(s) tratada por calor también se puede colocar con la muestra hacia abajo y en la parte superior del filtro se puede colocar una membrana de captura (nitrocelulosa) y sobre esta se pueden colocar varias capas de papel de filtro (y toallitas de papel). A continuación, se puede aplicar fuerza a la parte superior de este "sándwich" y lo ideal sería verter el tampón de transferencia alrededor de la parte inferior para facilitar la filtración y la transferencia de proteínas a la membrana de captura.
- 15 Además, el filtro se puede colocar con la muestra hacia arriba sobre una membrana de captura y aplicar un vacío para "tirar" de la proteína a través del papel de filtro y sobre la membrana de captura.
- 20 Como alternativa a la filtración y la centrifugación, puede llevarse a cabo la captura por afinidad de la proteína soluble. Muchos anticuerpos y reactivos de afinidad que reconocen la estructura plegada de la proteína se unirán a la proteína soluble con una afinidad mucho mayor que la proteína desplegada y precipitada. También el reconocimiento de etiquetas más pequeñas, como la unión de etiquetas de polihistidina a los conjugados de metal a menudo se correlacionará con la solubilidad cuando estas etiquetas sean menos accesibles en la proteína precipitada. Los anticuerpos, los conjugados de metal y otros reactivos de afinidad pueden unirse a perlas magnéticas o a una resina de una columna que se mezcla con la muestra no purificada tratada con calor. Esta mezcla puede ponerse en una etapa posterior en una válvula apropiada y lavarse para eliminar la proteína insoluble cuando esta no tenga una gran afinidad por el reactivo de afinidad. La cantidad de proteína unida al reactivo de afinidad se puede medir posteriormente se puede medir utilizando, por ejemplo, técnicas de Bradford, electroforesis en gel, Elisa o la detección de resonancia de plasmón de superficie.
- 25 De acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es posible analizar una (o ambas) fracciones insolubles o solubles para detectar la presencia de la proteína diana. La fracción insoluble se solubiliza preferiblemente antes del análisis, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3, las proteínas precipitadas se pueden disolver en tampón de carga antes de la aplicación a los geles de separación. Preferiblemente, los métodos descritos en la presente memoria implican una etapa (c) de análisis de las proteínas solubles para detectar la presencia de proteína diana. Por lo tanto, las proteínas solubles obtenidas después de la etapa de separación se analizan preferiblemente para detectar la presencia de proteína diana. Por lo tanto, si se ha llevado a cabo una etapa de separación por centrifugación, el sobrenadante se puede analizar para detectar la presencia de proteína diana y si se ha llevado a cabo una etapa de separación por filtración, las proteínas que pasan a través del filtro es decir, el filtrado, puede ser analizados para detectar la presencia de la proteína.
- 30 La proteína diana se puede detectar mediante varios métodos diferentes. Por lo tanto, las proteínas diana se pueden detectar utilizando diversas etiquetas que son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, la cola de histidina, la etiqueta VS, la etiqueta T7, la etiqueta FLAG o cualquier secuencia corta de proteína contra la que se disponga de un anticuerpo específico, tiorredoxina y proteína de unión a maltosa. Las etiquetas son preferiblemente de entre 1-100 aminoácidos de longitud, preferiblemente entre 1-70, 2-50, 1-30 o 1-20 aminoácidos de longitud. Más preferiblemente, las etiquetas pueden ser de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos de longitud. Sin embargo, la proteína diana no se detecta basándose en cualquier actividad enzimática de una etiqueta, un péptido, un polipéptido o una proteína que está fusionada a la proteína diana. Así, las proteínas diana no se detectan usando una actividad enzimática mostrada por cualquiera de dichas etiquetas o proteínas fusionadas a la proteína diana, por ejemplo, cuando la actividad enzimática tiene como resultado la producción de una señal detectable. Por ejemplo, en la presente invención no se utilizan las etiquetas de fusión que poseen actividad enzimática, tal como la proteína verde fluorescente, la peroxidasa de rábano picante, la luciferasa y la glutatión-S-transferasa para detectar la proteína diana. Por lo tanto, aunque es posible fusionar cualquier etiqueta/proteína con la proteína diana, la proteína diana no se detecta utilizando la actividad enzimática poseída por cualquiera de dichas etiquetas o proteínas. Por lo tanto, en el caso de una etiqueta GFP, luz verde fluorescente es producida por una reacción enzimática y, por lo tanto, se excluye específicamente en la presente invención, para una proteína diana a detectar usando una reacción de este tipo. Por lo tanto, se excluye la detección de la proteína diana por fluorescencia producida a partir de una etiqueta GFP, ya que dicha fluorescencia es el resultado de la actividad enzimática poseída por la etiqueta. Además,
- 45 en una realización preferida, la proteína diana de la invención no está fusionada a una proteína indicadora con actividad enzimática. En una realización particularmente preferida, la proteína diana no está fusionada con GFP. Por lo tanto, como alternativa, se prefiere que cualquier etiqueta fusionada a la proteína diana sea una etiqueta no proteica.
- 50 Para que una etiqueta se fusione con la proteína diana, esta en general se transcribe y se traduce con la proteína diana como una sola molécula. Por lo tanto, los anticuerpos que se unen a la proteína diana y que pueden ser
- 55
- 60
- 65

etiquetados con HRP, etc. no son considerados para ser fusionados a la proteína diana. En tales casos, la proteína diana se puede detectar mediante la etiqueta HRP ya que esta no es parte de una molécula de fusión con la proteína diana.

- 5 Por lo tanto, las etiquetas se pueden unir a una proteína diana mediante la expresión de dichas proteínas como proteínas de fusión. Como tal, se prefieren etiquetas cortas, para permitir que las proteínas de interés mantengan una conformación similar a la nativa. Además, se prefieren las etiquetas C-terminales, aunque también se utilizan etiquetas His N-terminales. Se apreciará que una etapa de detección que implica el uso de una etiqueta fusionada a una proteína diana sólo puede utilizarse cuando la proteína diana deriva de un sistema de expresión recombinante.
- 10 Por lo tanto, en general, no se utilizará este método de detección cuando la proteína diana, por ejemplo, se obtiene de un paciente.

15 Las proteínas diana se pueden detectar además a través de las etiquetas de fusión que actúan como el sustrato en los métodos de detección enzimática, siendo especialmente adecuada en este sentido las etiquetas de His. Por ejemplo, se puede usar la sonda de His INDIA (Pierre, Rockford IL, EE.UU.) para la detección en la que la proteína diana está marcada con poli-histidina o es rica en histidina y donde la proteína diana se detecta mediante derivado de peroxidasa de rábano picante activado con níquel, que se une a las etiquetas de His. Las proteínas diana también se pueden detectar basándose en su propia actividad enzimática.

20 La detección puede, alternativamente, estar basada en la unión por afinidad entre la proteína diana y un resto de detección o entre una etiqueta fusionada a la proteína diana y un resto de detección, por ejemplo un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o Affibody (pareja de unión a la proteína que no es un Ac). Preferiblemente, las proteínas diana se pueden detectar utilizando anticuerpos, monoclonales o policlonales, ya sea dirigidos a una etiqueta o directamente a la proteína diana (expresada como tal o como una fusión). Los anticuerpos que se dirigen a la

25 proteína diana se utilizan normalmente para detectar una proteína diana en una muestra del paciente. Tales métodos permiten el análisis rápido y fiable de una amplia variedad de proteínas diana, incluidas aquellas que no poseen ninguna actividad catalítica. La proteína diana también se puede detectar mediante espectrometría de masas (EM) semicuantitativa. En un experimento de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier utilizando un instrumento Orbitrap, generalmente se pueden detectar simultáneamente 1000-2000 proteínas en una

30 muestra de un lisado. En una realización preferida, un barrido de temperatura de las células, seguido de lisis, filtración y en una etapa final la detección de toda la proteína soluble restante usando espectrometría de masas, a cada temperatura de la exploración, permite medir en paralelo las curvas de precipitación para muchas proteínas. Este análisis de la curva de fusión del proteoma global podría, por ejemplo, utilizarse para detectar los denominados efectos de los fármacos fuera de la diana farmacológica, es decir, para controlar que otras proteínas de la célula

35 parecen unirse al fármaco. Este análisis de la curva de fusión del proteoma global también podría usarse en la búsqueda de dianas de fármacos o de candidatos a fármacos para los que se desconoce la diana del fármaco. Por ejemplo, el cribado de una biblioteca de compuestos directamente sobre las células puede identificar compuestos que generan fenotipos preferidos en estas células, lo que es indicativa de que los compuestos efectúan procesos en la célula que son útiles como dianas de fármacos para una determinada enfermedad. Sin embargo, normalmente es

40 muy difícil identificar con qué proteína o proteínas de la célula interactúa el candidato a fármaco. El análisis de la curva de fusión del proteoma global para los cambios de cambio térmico permite que esto se lleve a cabo para las proteínas que están disponibles a un nivel suficiente para ser detectables con EM.

45 La unión de la molécula/ligando a las proteínas diana puede ser investigada en un sistema de expresión recombinante. Por lo tanto, los genes/ADNc/regiones de codificación para la proteína diana pueden ser transformados o transfectados en sistemas de expresión en vectores/construcciones, tales como plásmidos, vectores virales, cósmidos y YAC. Tales vectores pueden contener secuencias reguladoras y otros elementos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el gen/ADNc/región de codificación puede ser colocado bajo el control de un

50 promotor en un vector. Los promotores utilizados son generalmente capaces de expresar la proteína diana dentro de un huésped particular. El promotor utilizado puede ser inducible, es decir, se puede controlar la expresión de la proteína diana. Tales promotores/sistemas inducibles incluyen lac, en el que la inducción de la expresión se controla por la adición de IPTG y tet on/off, en el que la inducción de la expresión se controla por la presencia/ausencia de tetraciclina y otros que son conocidos en el campo.

55 Como se describió anteriormente, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para cribar en bibliotecas de moléculas pequeñas aquellas que se unirán a una proteína diana. Esto puede llevarse a cabo usando placas multipocillo donde cada compuesto de la biblioteca se añade a una alícuota de células o de un lisado celular. Como alternativa, se pueden cribar bibliotecas de proteína diana mutante para determinar una proteína diana

60 mutante que muestra unión alterada a un ligando particular. Por ejemplo, se pueden identificar proteínas diana mutantes que tienen una asociación más cercana o más estrecha con un ligando que la proteína diana de tipo silvestre. Cuando se están analizando proteínas diana mutantes, son deseables las mediciones de la estabilidad de la proteína sin ligando para decidir si la estabilización se debe a la interacción con el ligando o si es debida a que el propio mutante es más estable, es decir, la mutación tiene un efecto estabilizador sobre la proteína mutante. Si el

65 ligando es otra proteína, la medición de la estabilidad podría en su lugar llevarse a cabo en esta proteína no mutante, donde la variante de la proteína mutada se puede seleccionar de tal modo que establezca la proteína no mutada. Esto podría utilizarse, por ejemplo, para proteínas de unión maduras (es decir, los ligandos) tales como, por

ejemplo, anticuerpos, fragmentos Fab, anticuerpos de cadena sencilla o moléculas Affibody donde se añaden mutaciones al azar a la proteína de unión y se detectan variantes con una aparente unión mejorada midiendo la mayor estabilización de la proteína no mutada. De esta manera, podrían seleccionarse los ligandos de mayor afinidad de los ligandos de menor afinidad. Cuando las proteínas de unión pueden servir como fármacos de tipo proteína dirigidos contra, por ejemplo, receptores o citocinas específicas, el método podría usarse para mejorar la afinidad de tales ligandos a la diana del fármaco o al fármaco de tipo proteína.

En la técnica se conocen muchos métodos diferentes de mutagénesis que podrían ser empleados para crear una variante de la proteína diana o una biblioteca de variantes de la proteína diana. Posibles procedimientos incluyen truncamiento de la secuencia, uso de una enzima exonucleasa, introducción de un sitio de mutaciones al azar usando, por ejemplo PCR propensa a errores, la introducción de un casete aleatorizado o la mutagénesis dirigida al sitio. En el caso de los truncamientos, el número de nucleótidos eliminados puede ser menos de 2.000, preferiblemente menos de 1.000 y más preferiblemente menos de 800. La introducción de un casete aleatorizado para la mutagénesis utiliza preferiblemente un casete que contiene menos de 100 nucleótidos.

La mutagénesis puede llevarse a cabo en varias copias de una secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína diana de manera que se pueda cribar un conjunto de diferentes secuencias mutadas, aumentando por lo tanto, la probabilidad de identificar una variante de la proteína diana con las propiedades de unión del ligando deseadas. El uso de mutagénesis aleatoria se prefiere especialmente cuando no existe un conocimiento previo de qué mutaciones particulares pueden dar una variante que, por ejemplo, se una al ligando con más fuerza es decir, que tenga una mayor afinidad por el ligando.

Se pueden crear bibliotecas de proteínas donde la región de codificación se ha mutado aleatoriamente y donde se han generado construcciones de diferente longitud por Erase-a-base o reacciones de cebado aleatorio.

Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para detectar variantes de la proteína diana que se han alterado y, preferiblemente, tienen una afinidad de unión a un ligando incrementada o mayor. Además, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar si una proteína diana en un cultivo celular o una muestra del paciente va a interactuar con una molécula de ensayo particular, por ejemplo, un fármaco. Por lo tanto, un uso preferido del método es determinar las interacciones fármaco-proteína en el cultivo de células durante el ciclo de desarrollo de fármacos para confirmar que el fármaco se une a la proteína diana en este tipo de células. Del mismo modo, el método puede ser usado para controlar la unión del fármaco a las proteínas no deseadas, la denominada unión fuera de la diana. Otro uso preferido del método es determinar las interacciones proteína-fármaco en muestras de pacientes (por ejemplo, tejido, sangre, linfa, etc.), para proporcionar una indicación en cuanto a si una terapia farmacológica particular será eficaz para ese paciente. Si hay que examinar una muestra de tejido, entonces los métodos descritos en la presente memoria también pueden incorporar una etapa de extracción de una proteína diana del tejido. Adicional o alternativamente, se puede utilizar una etapa de lisis. Las condiciones de lisis apropiadas son las descritas anteriormente.

Una vez que se ha detectado una interacción entre la proteína diana y el ligando en una muestra no purificada utilizando los métodos descritos en la presente memoria, puede ser deseable identificar la secuencia o la estructura de la proteína diana, en particular si se han investigado variantes de la proteína diana. Alternativamente, como se ha descrito anteriormente, los resultados obtenidos se pueden utilizar para determinar si es probable que una terapia farmacológica sea eficaz en un paciente y, por lo tanto, adaptar la terapia proporcionada a un paciente.

La unión de un fármaco de alta afinidad a una diana del fármaco establecida como se muestra en, por ejemplo, los ejemplos 4, 5, 6 y 7, por lo general conduce a una estabilización de la proteína diana como viene apoyado por el cambio positivo de la temperatura de fusión a una temperatura más alta. Sin embargo, también hay ligandos que, tras la unión a la proteína diana, provocan un cambio negativo de la temperatura de fusión a una temperatura más baja, es decir, se produce la desestabilización. Por ejemplo, se pueden ver cambios negativos para ligandos que forman enlaces de tipo covalente (incluyendo algunos metales) a una proteína diana. Se presume que la energía de unión de un enlace covalente y las tensiones energéticamente desfavorables generadas por la formación de un enlace tal, podría, en algunos casos, promover la desestabilización de una proteína. Por ejemplo, Ericsson et al (Anal Biochem 357 (2006) pp 289-298) muestran que los compuestos que contienen átomos de metales pesados, tales como hexahidrato de cloruro lutecio (III), son capaces de desestabilizar diversas proteínas bacterianas tras la unión.

Por lo tanto, se divulga un método para determinar si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés, en el que dicho ligando no es una proteína de fusión, que comprende las etapas de:

- a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida;
- b) procesar el producto de la etapa a) con el fin de separar la proteína soluble de la insoluble y

c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

5 Además, se divulga un método para determinar si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés que comprende las etapas de:

a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida;

b) procesar el producto de la etapa a) con el fin de separar la proteína soluble de la insoluble y

c) analizar la fracción de proteína soluble de la etapa b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, péptido, polipéptido o proteína fusionada a la misma.

15 En los métodos anteriores, se podría exponer la muestra no purificada a una temperatura capaz de causar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida al ligando, porque la proteína diana unida al ligando desestabilizador precipitaría a una temperatura inferior en comparación con la proteína diana no unida. Por lo tanto, a la temperatura distintiva descrita en la etapa a), se esperaría encontrar más de la proteína unida en la fracción de proteína insoluble y más de la proteína no unida en la fracción de proteína soluble.

20 Las discusiones sobre las diversas características de los métodos descritos en la presente memoria y las realizaciones preferidas expuestas en relación con la estabilización causada por la unión del ligando, se aplica *mutatis mutandis*, a estos aspectos del método donde la unión del ligando causa desestabilización.

25 En algunos casos, puede haber un sustrato fisiológico o co-factor, como ATP o NADP, presente en un lisado celular, que se une a la proteína diana, incluso antes de añadir el ligando a la muestra. Cuando se añade un ligando de interés a un lisado de este tipo, el desplazamiento de la curva de fusión hacia temperaturas más altas generalmente será más pequeño, en comparación con el caso en el que no hay ligando fisiológico presente en el lisado. En un caso extremo, un ligando de afinidad muy baja (que generalmente provoca pequeños cambios térmicos positivos) como un candidato piloto a fármaco inicial, podría competir en concentraciones muy altas con un ligando fisiológico más fuerte (que generalmente provoca grandes cambios térmicos positivos) como NADP. La sustitución del ligando fisiológico podría, en tal caso, conducir a un cambio negativo, es decir, un cambio a una temperatura de fusión más baja, cuando el cambio aparente es la diferencia entre los cambios de las dos formas unidas de ligandos de la proteína. En tales circunstancias, debido a que el cambio negativo sería detectable como una disminución en la temperatura de fusión de la proteína diana, se aplicarían aquí los aspectos de la invención en relación con el ligando que provoca la desestabilización.

40 También se divulga un instrumento para su uso en los métodos de la invención en el que dicho instrumento comprende un medio de calentamiento, un medio para separar la proteína soluble de la proteína insoluble y un medio para el análisis de proteínas para detectar la presencia de la proteína diana, por ejemplo, para el análisis de la proteína adecuada.

45 Además se divulga un instrumento adaptado en el uso para llevar a cabo el método de la invención que comprende un medio de calentamiento, un medio para separar la proteína soluble de la insoluble y un medio para el análisis de las proteínas (por ejemplo, soluble) para detectar la presencia de la proteína diana.

50 Se describe el uso de un instrumento que comprende un medio de calentamiento, un medio para separar la proteína soluble de la insoluble y un medio para el análisis de la proteína (por ejemplo, soluble) para detectar la presencia de la proteína diana en los métodos de la invención.

Los instrumentos están dispuestos de tal manera que una muestra se pone en contacto primero con los medios de calentamiento, a continuación, con los medios de separación y finalmente con los medios de análisis.

55 La expresión "un medio de calentamiento" como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier fuente de calor que puede calentar una muestra a una temperatura particular. Por lo tanto, los medios de calentamiento pueden consistir en o comprender una placa caliente que se puede programar para calentar una muestra a una temperatura particular, por ejemplo, se puede usar un aparato de PCR para calentar una muestra de esta manera. Además, un medio de calentamiento podría comprender una incubadora o un baño de agua.

60 La expresión "un medio para separar la proteína soluble de la insoluble" se refiere a cualquier aparato conocido que puede separar la proteína soluble e insoluble. Así, los medios pueden comprender un papel de filtro donde la proteína soluble pasará a través del papel de filtro. Como alternativa, los medios pueden comprender un aparato que puede impartir una fuerza centrífuga en la muestra calentada, por ejemplo, una centrífuga. Adicionalmente, los medios pueden comprender un aparato que puede capturar por afinidad de la proteína soluble. Tal aparato puede comprender anticuerpos u otros reactivos de afinidad que son capaces de reconocer la estructura plegada de la

proteína soluble. Los anticuerpos, conjugados de metales u otros reactivos de afinidad pueden estar ligados a perlas magnéticas o resina de la columna. La proteína insoluble se puede eliminar por lavado.

La expresión "medios de análisis de proteína (por ejemplo, soluble) para detectar la presencia de la proteína diana" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier aparato que sea capaz de detectar la proteína diana. Así, este puede referirse a un espectrómetro de masas, pero más preferiblemente se puede referir al aparato necesario para, por ejemplo, detectar un anticuerpo marcado con HRP o una molécula fluorescente unida a la proteína diana (es decir, membrana de nitrocelulosa o un fluorímetro). Además, los medios para el análisis de proteínas para detectar la presencia de la proteína diana pueden comprender además cualquiera de los reactivos necesarios para detectar la proteína diana, o como alternativa, éstos pueden suministrarse por separado.

También se describe el uso de un kit en los métodos de la invención que comprende un anticuerpo y/o una etiqueta no proteica.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos en los que:

La Figura 1 muestra la evaluación de la presencia de proteína soluble de tres proteínas diferentes expresadas en una muestra de *E. coli* después de la exposición a un rango de temperaturas diferentes. Las temperaturas de fusión conocidas de las proteínas purificadas se muestran en el lado derecho de la figura.

La Figura 2 muestra la evaluación de la presencia de la proteína PIK3C3 soluble después de la adición de los ligandos wortmanina y 3-[4-(4-morfolinil)tiemo [3,2-d]pirimidin-2-il]-fenol (Compuestos 15e) (+). También se muestra la muestra de referencia sin ligando añadido (-). En las muestras con ligandos se puede ver un cambio térmico. Los carriles con proteínas más ligando son térmicamente más estables que las proteínas sin ligando.

La Figura 3 muestra las membranas de transferencia Western de las dianas quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK-2) (a) y la proteína quinasa C (PKC) (b). Las bandas oscuras indican que la presencia de la proteína soluble se detectó a una temperatura específica y se volvió más débil y, finalmente, desapareció a medida que aumentaba la temperatura (de izquierda a derecha). El sedimento que contiene proteína precipitada de la temperatura más alta se disolvió en tampón de carga y se cargó en el último carril del gel con el fin de mostrar la presencia de la proteína diana en esta fracción.

La Figura 4 muestra los niveles de timidilato sintasa (TS) soluble, dihidrofolato reductasa (DHFR), CDK-2 o proteína PKC presente después de la exposición a un rango de diferentes temperaturas en extractos de células de mamíferos. El eje X representa la temperatura expuesta (°C) y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

La Figura 5 muestra la curva de fusión térmica de extractos de células humanas de la proteína DHFR soluble después de la adición del inhibidor metotrexato (◆). También se muestra la muestra de referencia sin inhibidor (■). El eje X representa la temperatura expuesta (°C) y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

La Figura 6 muestra la curva de fusión térmica de extractos de células humanas de la proteína TS soluble después de la adición del inhibidor raltitrexed (+). También se muestra la muestra de referencia sin inhibidor (●). El eje X representa la temperatura expuesta (°C) y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

La Figura 7 muestra la curva de fusión térmica de la metionina-aminopeptidasa-2 soluble después de la adición del ligando TNP-470 (x) o bien del extracto de hígado de vaca (a) o del extracto de células humanas (b). También se muestra la muestra de referencia sin ligando (○). El eje X representa la temperatura expuesta (°C) y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

La Figura 8 muestra la curva de respuesta a la dosis del tratamiento con TNP-470 del extracto de hígado de vaca. El eje X representa la concentración de TNP-470 añadido y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

La Figura 9 muestra la curva de respuesta a la dosis de TNP-470 creado añadiendo lisado celular que contiene proteína diana. El eje X representa la concentración de TNP-470 añadido y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

La Figura 10 muestra la curva de fusión térmica de cualquiera de la proteína B-raf variante V600E soluble (◆) o de la proteína B-raf de tipo silvestre (▲) después de la adición del ligando SB590885. Las muestras de referencia sin ligando también se muestran, tanto para la proteína B-raf variante V600E (■) como para la proteína B-raf de tipo silvestre (x). El eje X representa la temperatura expuesta (°C) y el eje Y representa la intensidad integrada de las transferencias Western.

Ejemplo 1 - Determinación de las temperaturas de fusión de cuatro proteínas de prueba

Se usaron tres construcciones de expresión de la proteína soluble humana en un vector de expresión con una etiqueta de His N-terminal con el fin de determinar la temperatura de fusión de cada proteína en la célula. Esto se hizo mediante la exposición de la célula que contiene la proteína a un panel de temperaturas crecientes y después de cada etapa de temperatura aplicando las células a un "sándwich de lisis/filtración" empapado en tampón de lisis. Mediante el uso de esta etapa de lisis/filtración, la proteína soluble (a la temperatura de fusión específica de la

proteína) pudo ser detectada en una membrana de captura de nitrocelulosa como manchas oscuras, mientras que la proteína precipitada (es decir, por encima de su temperatura de fusión específica) no fue capaz de pasar a través de la membrana de filtro y, por tanto, no pudo ser detectada.

#### Materiales y métodos

5 Los cultivos líquidos de células de *E. coli* que sobreexpresan las tres proteínas de interés se iniciaron mediante la inoculación de 1 ml de caldo de Luria-Bertani (LB) (Formedium Ltd., Reino Unido) que contiene 50 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) y 35 µg/ml de cloranfenicol (Duchefa Biochemie, Holanda) con *E. coli* congelada de reservas en glicerol en una placa de 96 pocillos de pozo profundo (Porvair Pico., Reino Unido). Los  
10 cultivos se incubaron en una placa de agitación durante la noche a 700 rpm y + 37 °C. Al día siguiente, se transfirieron 100 µl de cada cultivo de la noche al correspondiente pocillo de una placa de 96 pocillos de pozo profundo nueva que contiene 900 µl de LB, 50 µg/ml de kanamicina y 35 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos se incubaron en una placa de agitación a 700 rpm y + 37 °C. Después de 1,5 horas la temperatura se bajó a + 18 °C (30 min.) y la expresión de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 100 mM (Anatrace/Affymetrix Co.,  
15 EE.UU.). Las células se cultivaron durante la noche en una placa de agitación a 700 rpm y + 18 °C. Las células sedimentaron por centrifugación, el día siguiente a 1500 g durante 2 min. y se eliminaron 900 µl de sobrenadante de cada pocillo por aspiración y se desecharon. Los sedimentos celulares se resuspendieron en los 100 µl restantes del medio (es decir, se concentró 10 veces). Las suspensiones celulares se transfirieron a tiras de 8 tubos para PCR (Applied Biosystems, Reino Unido) y se colocaron en un termociclador. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: + 27 °C - + 75 °C con incrementos de 3 °C y una parada de 3 min. en cada paso. Después de la parada de 3 min. a cada temperatura, se detuvo el termociclador y se aplicó rápidamente 2 µl de cada suspensión celular al “sándwich de lisis/filtración” que consiste en la membrana de filtro Durapore con tamaño de poro 0,45 µm (Millipore Inc., EE.UU.) (capa superior), membrana de nitrocelulosa Protran BA 45 (Schleicher y Schuell, Alemania) (capa media) y papel Whatman 3MM (VWR Int'l. Ltd., Reino Unido). El “sándwich de lisis/filtración” estaba empapado en tampón de lisis natural (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 10 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.),  
25 Benzonase nucleasa 25 U/µl (Novagen, Dinamarca) y el Complete Inhibidor de la proteasa, comprimidos libres de EDTA (Roche, Suiza). Después de la aplicación de las células sobre el “sándwich de lisis/filtración”, el procedimiento anteriormente mencionado se repitió en cada etapa de temperatura. Después de aplicar la última alícuota de células, el “sándwich de lisis/filtración” se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente con el fin de permitir la lisis completa y la transferencia del material celular líquido a través de la membrana de filtro. El “sándwich de lisis/filtración” se congeló después a -80 °C durante 10 minutos y luego se descongeló durante 10 minutos a + 37 °C. Este procedimiento de congelación/descongelación se repitió 3 veces. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó en tampón TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05 %) que contiene BSA 1 % (VWR Int'l. Ltd., Reino Unido) durante 1 hora. A continuación, la transferencia se lavó 3 veces durante 10 minutos en TBST con un poco de agitación (agitador de sobremesa). La membrana se incubó durante 1 hora con la sonda de His INDIA (Thermo Scientific, EE.UU.) diluido 1:5000 en TBST. A continuación, la transferencia se lavó 3 veces durante 10 minutos en TBST. La detección quimioluminiscente del nivel de expresión de la proteína diana en cada punto de la transferencia se realizó utilizando SuperSignal West Dura (Pierce) Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, EE.UU.). La quimioluminiscencia se detectó y se registró utilizando una cámara CCD (BioRad Laboratories, Inc., EE.UU.).

#### Resultados

45 Las manchas oscuras que indican la presencia de proteína soluble se detectaron hasta una temperatura específica; se convirtieron en más débiles y finalmente desaparecieron a temperaturas más altas (Figura 1). Una comparación con los datos anteriores sobre las temperaturas de fusión de las tres proteínas purificadas-IMAC (panel derecho) mostró una buena correlación entre los dos conjuntos de resultados. Los puntos de fusión no se espera que sean exactos ya que las proteínas tienen diferentes entornos de disolvente en una célula y en un tampón de purificación. Este experimento muestra que estas proteínas tienen puntos de fusión distintos en el ambiente celular y que estos puntos de fusión se pueden detectar fácilmente mediante el control de la precipitación de la proteína.

#### Ejemplo 2 - Detección de un aumento de la temperatura de fusión después de la unión a un ligando.

55 Se usó una construcción de expresión de la proteína PIK3C3 soluble humana en un vector de expresión con una etiqueta de His N-terminal con el fin de investigar un posible aumento de la temperatura de fusión de la construcción de PIK3C3 después de la adición y unión de cualquiera de los dos inhibidores específicos de PIK3C3; wortmanina y el compuesto 15e. Después del tratamiento con o sin uno de los dos inhibidores, las células que expresaban las construcciones de PIK3C3 se expusieron a un panel de temperaturas crecientes y después de cada etapa de temperatura, las células que expresaban las proteínas se aplicaron a un “sándwich de lisis/filtración” empapado en  
60 tampón de lisis. Utilizando esta etapa de lisis/filtración en el “sándwich de lisis/filtración”, la proteína soluble (a la temperatura de fusión específica de la construcción) pudo detectarse en una membrana de captura de nitrocelulosa como manchas oscuras, mientras que la proteína precipitada (es decir, por encima de su temperatura de fusión específica) no pudo pasar a través de la membrana de filtro y, por tanto, no pudo detectarse. Las temperaturas de fusión de las construcciones tratadas con el compuesto 15e o con wortmanina se compararon con las de las muestras no tratadas.

## Materiales y métodos

Los cultivos líquidos de células de *E. coli* que sobreexpresan las construcciones de PIK3C3 se iniciaron inoculando 1 ml de caldo de Luria-Bertani (LB) (Formedium Ltd., Reino Unido) que contiene 50 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) y 35 µg/ml de cloranfenicol (Duchefa Biochemie, Holanda) con *E. coli* congelada de reservas en glicerol en una placa de 96 pocillos de pozo profundo (Porvair Pico., Reino Unido). Los cultivos se incubaron en una placa de agitación durante la noche a 700 rpm y + 37 °C. Al día siguiente, se transfirieron 100 µl de cada cultivo de la noche al correspondiente pocillo de una placa de 96 pocillos de pozo profundo nueva que contiene 900 µl de LB, 50 µg/ml de kanamicina y 35 µg/ml de cloranfenicol. Los cultivos se incubaron en una placa de agitación a 700 rpm y + 37 °C. Después de 1,5 horas la temperatura se bajó a + 18 °C (30 min.) y la expresión de proteínas se indujo mediante la adición de IPTG 100 mM (Anatrace/Affymetrix Co., EE.UU.). Las células se cultivaron durante la noche en una placa de agitación a 700 rpm y + 18 °C. Las células sedimentaron por centrifugación, el día siguiente a 1500 g durante 2 min. y se eliminaron 900 µl de sobrenadante de cada pocillo por aspiración y se desecharon. Los sedimentos celulares se resuspendieron en los 100 µl restantes del medio (es decir, se concentró 10 veces). Para cada uno de los experimentos se añadió 1 mM del Compuesto 15e inhibidor de PIK3C3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EE.UU.) o wortmanina 500 µM (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EE.UU.) disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.) o el volumen equivalente (1 µl y 0,5 µl, respectivamente) de DMSO puro y las muestras se agitaron suavemente durante 30 min. a temperatura ambiente. Las suspensiones celulares se transfirieron a tiras de 8 tubos para PCR (Applied Biosystems, Reino Unido) y se colocaron en un termociclador. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: + 27 °C - + 75 °C con incrementos de 3 °C y una parada de 3 min. en cada paso. Después de la parada de 3 min. a cada temperatura, se detuvo el termociclador y se aplicó rápidamente 2 µl de cada suspensión celular al "sándwich de lisis/filtración" que consiste en la membrana de filtro Durapore con tamaño de poro 0,45 µm (Millipore Inc., EE.UU.) (capa superior), membrana de nitrocelulosa Protran BA 45 (Schleicher y Schuell, Alemania) (capa media) y papel Whatman 3MM (VWR Int'l. Ltd., Reino Unido). El "sándwich de lisis/filtración" estaba empapado en tampón de lisis natural (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, 10 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich Co., EE.UU.), Benzonase nucleasa 25 U/µl (Novagen, Dinamarca) y el Complete Inhibidor de la proteasa, comprimidos libres de EDTA (Roche, Suiza). Después de la aplicación de las células sobre el "sándwich de lisis/filtración", el procedimiento anteriormente mencionado se repitió en cada etapa de temperatura. Después de aplicar la última alícuota de células, el "sándwich de lisis/filtración" se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente con el fin de permitir la lisis completa y la transferencia del material celular líquido a través de la membrana de filtro. El "sándwich de lisis/filtración" se congeló después a -80 °C durante 10 minutos y luego se descongeló durante 10 minutos a + 37 °C. Este procedimiento de congelación/descongelación se repitió 3 veces. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó en tampón TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05 %) que contiene BSA 1 % (VWR Int'l. Ltd., Reino Unido) durante 1 hora. A continuación, la transferencia se lavó 3 veces durante 10 minutos en TBST con un poco de agitación (agitador de sobremesa). La membrana se incubó durante 1 hora con la sonda de His INDIA (Thermo Scientific, EE.UU.) diluido 1:5000 en TBST. A continuación, la transferencia se lavó 3 veces durante 10 minutos en TBST. La detección quimioluminiscente del nivel de expresión de la proteína diana en cada punto de la transferencia se realizó utilizando SuperSignal West Dura (Pierce) Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, EE.UU.). La quimioluminiscencia se detectó y se registró utilizando una cámara CCD (BioRad Laboratories, Inc., EE.UU.).

## Resultados

Las manchas oscuras que indican la presencia de proteína soluble se detectaron hasta una temperatura específica, más allá de la cual ya no eran visibles (Figura 2). La adición del Compuesto 15e tuvo como resultado un aumento de la temperatura de fusión de aproximadamente + 55 ° a + 58 °C mientras que la adición de wortmanina tuvo como resultado un aumento de la temperatura de fusión entre aproximadamente + 55 ° y + 65 °C. Una comparación con los datos anteriores sobre las temperaturas de fusión de la construcción PIK3C3 purificada con IMAC con y sin la adición del Compuesto 15e o wortmanina mostró una buena correlación entre los dos conjuntos de resultados. Este experimento muestra que es posible detectar un aumento de la temperatura de fusión de la construcción PIK3C3 en el entorno celular después de la adición y unión de cualquiera de los dos inhibidores de PIK3C3 wortmanina y Compuesto 15e.

Ejemplo 3 - Determinación de la temperatura de fusión de cuatro proteínas de prueba en sistemas de células de mamíferos

Con el fin de determinar la temperatura de fusión de cuatro proteínas, se preparó el lisado a partir de células de mamífero cultivadas y se expuso a un panel de temperaturas crecientes. Después de las etapas de temperatura, se eliminó la proteína precipitada, dejando sólo la proteína soluble (es decir, a la temperatura de fusión específica de la proteína) a detectar.

## Materiales y métodos

El lisado se preparó a partir de células de adenocarcinoma humano cultivadas (A549). Las células se rompieron en hielo en tampón hipotónico y con homogeneización. Las suspensiones se congelaron y descongelaron varias veces y todos los agregados insolubles y restos celulares sedimentaron por centrifugación después de completada la lisis.

El sobrenadante que contiene la fracción citosólica ópticamente transparente se dividió en alícuotas en tiras de 8 tubos para PCR y se sometió a un panel de temperaturas crecientes. Después de calentar durante tres minutos, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada se sedimentó por centrifugación. El sobrenadante, que contiene la proteína soluble, se cargó en geles de separación. Además, el sedimento que contiene la proteína precipitada a partir de la temperatura más alta se disolvió en tampón de carga y se cargó en el último carril del gel con el fin de mostrar la presencia de la proteína en esta fracción. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por transferencia Western. La membrana se lavó y se bloqueó con reactivo de bloqueo y se sondeó primero con anticuerpos primarios contra la dihidrofolato reductasa (DHFR), timidilato sintasa (TS), quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK-2) y la proteína quinasa C (PKC). Los anticuerpos secundarios se unieron y la señal del anticuerpo secundario unido se detectó por quimioluminiscencia y se grabó con una cámara CCD. Las intensidades se midieron y se representaron gráficamente.

#### Resultados

Las bandas oscuras que indican la presencia de la proteína soluble se detectaron hasta una temperatura específica; se convirtieron en más débiles y finalmente desaparecieron a temperaturas más altas (Figura 3). Este experimento muestra que estas proteínas tienen una temperatura de fusión y comportamiento distintos en el ambiente celular y que estos puntos de fusión se pueden detectar fácilmente mediante el control de la precipitación de la proteína (Figura 4).

Ejemplo 4 - Detección de un aumento de temperatura de fusión después de la unión a un ligando en células de mamífero

Con el fin de investigar el posible aumento o disminución de la temperatura de fusión después de la adición y unión de inhibidores, se estudiaron las proteínas dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidilato sintasa (TS) en células de mamífero cultivadas.

El lisado de células de adenocarcinoma cultivadas se trataron con uno de los dos inhibidores; raltitrexed o metotrexato, en donde se analizaron los posibles efectos estabilizadores o desestabilizadores de metotrexato se para la DHFR y raltitrexed se analizó para la TS. Después del tratamiento con o sin los inhibidores, las muestras se sometieron a una etapa de calentamiento seguido de la eliminación de la proteína precipitada. Las temperaturas de fusión de las muestras tratadas se compararon con las de las muestras no tratadas.

#### Materiales y métodos

El lisado se preparó a partir de células de adenocarcinoma humano cultivadas (A549). Las células se rompieron en hielo en tampón hipotónico y con homogeneización. Las suspensiones se congelaron y descongelaron varias veces y todos los agregados insolubles y restos celulares sedimentaron por centrifugación después de la lisis completa. El sobrenadante que contiene la fracción citosólica ópticamente transparente se dividió en cuatro alícuotas, dos fueron suplementadas con su respectivo ligando con el correspondiente control negativo. La concentración de ligando añadido fue de 10 veces el valor de CI50 descrito para la interacción fármaco/diana. Cada ligando se disolvió en DMSO y la concentración final se ajustó a 1 %.

Después de la incubación, cada alícuota se dividió en tiras de 8 tubos para PCR y se sometió a una serie de temperaturas que van de + 36 °C a 60 °C para DHFR y + 51 °C a + 69 °C para TS (guiados por la curva de fusión del Ejemplo 3). Después de calentar durante tres minutos, la proteína precipitada se sedimentó por centrifugación. Los sobrenadantes resultantes se cargaron en un gel de separación y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por transferencia Western. Después del bloqueo de la membrana, se sondeó con anticuerpos primarios y secundarios. La señal del anticuerpo secundario unido se detectó por quimioluminiscencia y grabó con una cámara CCD. Las intensidades se representaron para visualizar los cambios en la temperatura de fusión después del tratamiento con ligando.

#### Resultados

La adición de metotrexato o raltitrexed tuvo como resultado un aumento de la temperatura de fusión (Figuras 5 y 6). Este experimento muestra que es posible detectar un aumento de la temperatura de fusión de DHFR o TS en el entorno celular después de la adición y la unión de los respectivos inhibidores metotrexato y raltitrexed.

Ejemplo 5 - Cambio térmico celular estudiado en diferentes sistemas de células y organismos para determinar los cambios en la temperatura de fusión después de la unión de un ligando

Con el fin de estudiar los efectos de la unión del ligando en diferentes sistemas, se estudiaron los posibles efectos estabilizadores o desestabilizadores tras la adición del ligando TNP-470, un agente antiangiogénico, a la proteína metionina-aminopeptidasa-2. Los estudios se realizaron en las células de dos sistemas diferentes: a) biopsias de hígado de vaca intacto incubadas con TNP-470 y b) células cultivadas humanas incubadas con TNP-470. Todas las muestras se compararon con las muestras de referencia, que no habían sido expuestas a TNP-470. Después del

tratamiento con o sin el inhibidor, las muestras se prepararon y se sometieron a una serie de temperaturas crecientes. La fracción de proteína precipitada se sedimentó mediante centrifugación y el sobrenadante de cada etapa de temperatura se analizó en geles y por transferencia Western. Las temperaturas de fusión de las proteínas tratadas con TNP-470 se compararon con las de las muestras no tratadas.

5

#### Materiales y métodos

Se preparó un lisado de células humanas cultivadas (K562) y de muestras de hígado de vaca mediante rotura en hielo en tampón hipotónico y con homogeneización. Las suspensiones se congelaron y descongelaron varias veces y todos los agregados insolubles y restos celulares sedimentaron por centrifugación después de completada la lisis. El lisado de cada tipo de células se dividió en dos alícuotas, donde una se complementó con TNP-470 (disuelto en DMSO puro) y la otra con un volumen equivalente de DMSO puro. Después de incubación a temperatura ambiente, las muestras se dividieron en fracciones de 50 microlitros en tiras de 8 tubos para PCR y posteriormente se colocaron en un termociclador Veriti.

15

A continuación, se aplicaron una serie de temperaturas a muestras diferentes que oscilan entre + 56 °C a + 88 °C con incrementos de 2 o 4 °C y una parada de 3 minutos en cada etapa. Después del calentamiento, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada sedimentó por centrifugación. Se eliminaron 20 microlitros de cada sobrenadante, suplementado con tampón de carga de gel y totalmente desnaturalizado por calentamiento. Las muestras se cargaron en un gel de separación, que después del tiempo de ejecución total se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó y se bloqueó con reactivo de bloqueo y se sondeó con anticuerpos primarios y secundarios. La señal del anticuerpo secundario unido se detectó por quimioluminiscencia y se grabó con una cámara CCD. Las intensidades se representaron para visualizar los cambios en la temperatura de fusión después del tratamiento con ligando.

25

#### Resultados

Las bandas oscuras en la membrana de transferencia Western indican la presencia de la proteína soluble aún en el sobrenadante. La proteína soluble se detectó a una temperatura específica más allá de la cual ya no eran visibles. La adición de TNP-470 tuvo como resultado un cambio en la temperatura de fusión del lisado celular humano de 62 °C a 80 °C (un cambio de 18 °C) y para el lisado de hígado de vaca de 66 °C a 80 °C (un cambio de 14 °) (Figura 7).

30

#### Ejemplo 6 - Curva dosis-respuesta de la dependencia de la concentración de la estabilización térmica

Con el propósito de construir una curva de dosis-respuesta para estimar las constantes de unión aparentes, el lisado de hígado de vaca fue sometido a una serie de dilución del ligando TNP-470, específicamente dirigido a la metionina aminopeptidasa-2. Antes de este ejemplo, se han obtenido las curvas correspondientes a las muestras tratadas y sin tratar (véase el Ejemplo 5) en las que la dosis se ha fijado en los niveles de saturación. Las diferencias en la temperatura de fusión se pueden utilizar para decidir a qué temperatura todavía una muestra tratada sigue estando presente mientras que una muestra no tratada precipita. Para este ejemplo se estableció la temperatura a +76 °C. La serie de dilución se construyó como una serie de diluciones de 10 veces. La curva generada da una indicación de la concentración de ligando necesaria para involucrar a la proteína diana en el lisado.

40

#### Materiales y métodos

45

El lisado se preparó a partir de muestras de hígado de vaca. Las células se rompieron en hielo en tampón hipotónico y con homogeneización. Las suspensiones se congelaron y descongelaron varias veces y todos los agregados insolubles y restos celulares sedimentaron por centrifugación después completada la lisis. El sobrenadante que contiene la fracción citosólica ópticamente transparente se dividió en alícuotas en tiras de 8 tubos para PCR donde cada tubo contenía una cantidad creciente del ligando TNP-470 de modo que la concentración de ligando osciló entre 1 picomolar y 100 nanomolar y con la concentración de DMSO a 1 % del volumen final. Las muestras se incubaron y posteriormente se calentaron a 76 °C durante 3 minutos. Después del tratamiento térmico las muestras se enfriaron y la fracción precipitada se sedimentó por centrifugación. Se eliminaron 20 microlitros de cada sobrenadante y se suplementó con tampón de carga de gel y totalmente desnaturalizado por calentamiento. Las muestras se cargaron en un gel de separación, que después de tiempo de ejecución total se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó y se bloqueó con reactivo de bloqueo y se sondeó con anticuerpos primarios y secundarios. La señal del anticuerpo secundario unido se detectó por quimioluminiscencia y se grabó con una cámara CCD. Las intensidades se midieron y se representaron gráficamente.

55

#### Resultados

60

Las bandas oscuras en la membrana de transferencia Western indica la presencia de proteína en el sobrenadante. Si no existe ninguna o muy poca proteína, no será visible ninguna señal o será visible una señal muy baja. A medida que aumenta la concentración de ligando, también aumenta la cantidad de proteína estabilizada. Esto se observa como una señal de incremento gradual de la banda oscura sobre la membrana de transferencia Western. La representación de las intensidades integradas dará una curva dosis-respuesta (Figura 8), que hace que sea posible

65

identificar una concentración aparente donde la mitad de la proteína en la muestra estará implicada por un ligando unido (es decir, estabilizada). Esto puede tener aplicaciones útiles para establecer regímenes posológicos para los pacientes o para encontrar una ventana terapéutica de un medicamento por los estudios de constantes de unión aparentes en diferentes órganos del cuerpo.

5

Ejemplo 7 - Aplicación del biosensor - medición de la presencia de un ligando en fluidos complejos

La presencia de un ligando (por ejemplo, un fármaco) para el que existe una proteína de unión al ligando afín (por ejemplo, una diana de fármaco) puede ser indicada incluso en muestras de prueba complejas que carecen de la proteína diana. Esto se logra mediante la adición de una alícuota de una muestra que contiene la proteína (por ejemplo, lisado de la célula diana o una proteína purificada) a la muestra de ensayo de fluido biológico. De acuerdo con el Ejemplo 6, una curva de respuesta a la dosis también se puede construir usando diluciones en serie de un fluido biológico (por ejemplo, plasma sanguíneo o suero) que contienen el ligando de interés. La curva así creada se puede superponer con una curva dosis-respuesta generada por la adición de sustancia para dar una concentración estimada del ligando en el fluido biológico.

15

Materiales y métodos

El lisado se preparó a partir de células de adenocarcinoma humano cultivadas (A549). Las células se rompieron con hielo en tampón hipotónico y con homogeneización. Las suspensiones se congelaron y descongelaron varias veces y todos los agregados insolubles y restos celulares sedimentaron por centrifugación después de completada la lisis. El sobrenadante que contiene la fracción citosólica ópticamente transparente se dividió en alícuotas en tiras de 8 tubos para PCR donde cada tubo contenía una cantidad creciente del ligando TNP-470 disuelto en un lisado A549 sometido a tratamiento térmico (el tratamiento térmico a 76 °C precipitó toda la proteína diana (metionina aminopeptidasa-2) y se aseguró de que no se consumía ligando). Como en el Ejemplo 6, las concentraciones oscilaron entre 1 picomolar y 100 nanomolar de concentración efectiva.

20

25

Las muestras se incubaron y se calentaron posteriormente a 76 °C durante 3 minutos. Después del tratamiento térmico las muestras se enfriaron y la fracción precipitada sedimentó por centrifugación. Se eliminaron 20 microlitros de cada sobrenadante y se suplementó con tampón de carga de gel y se desnaturalizó totalmente por calentamiento. Las muestras se cargaron en un gel de separación, que después del tiempo de ejecución total se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó y se bloqueó con reactivo de bloqueo y se sondeó con anticuerpos primarios y secundarios. La señal del anticuerpo secundario unido se detectó por quimioluminiscencia y grabó con una cámara CCD. Las intensidades se midieron y se representaron gráficamente.

30

35

Resultados

Se generó el lisado tratado con calor para imitar un fluido biológico deficiente en proteína diana. La adición del lisado tratado térmicamente con el ligando y la dilución en serie del mismo produjo a continuación, una curva de respuesta (Figura 9) que podría ser comparada y superpuesta con una curva dosis-respuesta generada in vitro para obtener una estimación de la cantidad de ligando es presente en la muestra.

40

Ejemplo 8 - Ligandos dirigidos a variantes de proteínas específicas

Dentro de una población humana, las proteínas existen como diferentes variantes, por lo general con un pequeño número de sustituciones de aminoácidos. En algunos casos estas sustituciones promueven enfermedades, tales como, por ejemplo, el cáncer. La proteína B-raf está involucrada en las vías donde las perturbaciones en la regulación o función pueden causar este tipo de enfermedades. Se han descrito muchas sustituciones de aminoácidos diferentes para B-raf que tienen como resultado una proteína oncogénica. Las sustituciones de aminoácidos también pueden hacer que una proteína sea menos capaz de unir fármacos, lo que es una de las causas que impulsan el desarrollo de resistencia durante el tratamiento del cáncer.

45

50

Se sabe que el ligando SB590885 se une la variante V600E de B-raf, que puede ser difícil de tratar con medicamentos tales como sorafenib. En este Ejemplo, se muestra que hay una diferencia en la estabilidad en la proteína sustituida frente a la proteína de tipo silvestre y que la unión del ligando afecta en diferente medida a las variantes de la proteína.

55

Materiales y métodos

Se preparó un lisado a partir de células A375 humanas cultivadas que contienen la sustitución V600E en B-raf y K562, que contienen la versión de tipo silvestre de la misma. Las células se rompieron en hielo en tampón hipotónico y con homogeneización. Las suspensiones se congelaron y descongelaron varias veces y todos los agregados insolubles y restos celulares sedimentaron por centrifugación después de completada la lisis. Los sobrenadantes que contienen la fracción citosólica ópticamente transparente se dividieron en alícuotas en dos tubos, donde cada tubo contenía el ligando SB590885 disuelto en DMSO o DMSO puro para el control. Las muestras se incubaron y posteriormente se dividieron en partes alícuotas en tiras de 8 tubos para PCR en fracciones de 50

60

65

microlitros. Se aplicaron una serie de temperaturas a las diferentes muestras que oscilan entre + 44 °C a + 62 °C con incrementos de 2 °C y una parada de 3 minutos a cada temperatura. Después del calentamiento, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada sedimentó por centrifugación. Se eliminaron 20 microlitros de cada sobrenadante y se suplementó con tampón de carga de gel y se desnaturalizó totalmente por calentamiento. Las muestras se cargaron en un gel de separación, que después de tiempo de ejecución total se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se lavó y se bloqueó con reactivo de bloqueo y se sondeó con anticuerpos primarios y secundarios. La señal del anticuerpo secundario unido se detectó por quimioluminiscencia y se grabó con una cámara CCD. Las intensidades se normalizaron y se representaron para visualizar los cambios en la temperatura de fusión después del tratamiento del ligando (Figura 10).

## Resultados

Las curvas de fusión en la Figura 10 muestran que B-raf sustituida con V600E es menos estable que el tipo silvestre si no hay presente ligando estabilizador. Tras el tratamiento, B-raf sustituida con V600E se estabiliza con un aumento de aproximadamente 6 °C en la temperatura de fusión, mientras que la proteína de tipo silvestre una vez estabilizada sólo mostró un aumento de 3 °C en la temperatura de fusión. Después de la estabilización, tanto B-raf sustituida con V600E como B-raf de tipo silvestre mostraron una temperatura de fusión de 55 °C.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés que comprende las etapas de:
- (a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana no unida en mayor medida de lo que puede provocar o aumentar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando;
- 10 (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa (a) y
- (c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana se detecta mediante la unión por afinidad de un resto de detección o por espectrometría de masas.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que de acuerdo con la etapa c) se analiza la fracción soluble.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ligando es una proteína, una molécula de ADN o ARN, un metabolito celular, un fármaco u otra sustancia química.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la temperatura es igual o mayor que la temperatura de fusión inicial de la proteína diana.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra no purificada se expone a una serie de diferentes temperaturas, que incluyen una temperatura que es igual a o mayor que la temperatura de fusión inicial de la diana.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína diana se identifica usando anticuerpos.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa de tratamiento (b) es una etapa de centrifugación, de separación por afinidad o de filtración, preferiblemente en el que la proteína diana en el filtrado de la etapa de filtración se captura en un soporte sólido antes de la etapa de análisis (c).
- 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína diana se añade a la muestra con el fin de determinar la presencia o ausencia del ligando de interés en dicha muestra, o en el que se añade un ligando de interés a la muestra con el fin de determinar la presencia o ausencia de proteína diana en dicha muestra.
9. Un método para identificar un ligando que puede unirse a una proteína diana que comprende las etapas de:
- 40 a) exponer una muestra no purificada que comprende dicha proteína diana y una molécula de ensayo a una serie de diferentes temperaturas, que incluyen una temperatura que es igual a o mayor que la temperatura de fusión inicial de la proteína diana;
- b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa (a) y
- 45 c) analizar una o ambas fracciones de proteína soluble e insoluble de la etapa (b) para detectar la presencia de la proteína diana, en el que dicha proteína diana se detecta mediante la unión por afinidad de un resto de detección o por espectrometría de masas y preferiblemente en el que una muestra no purificada que comprende dicha proteína diana sin molécula de ensayo añadida también se somete a las etapas a) a c) en una reacción de control.
- 50 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína diana se identifica usando anticuerpos y en el que la etapa b) es una etapa de centrifugación, de filtración o de separación por afinidad.
11. El método de la reivindicación 1 o 9, en el que dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, un péptido, un polipéptido o una proteína fusionada a la misma.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha muestra no purificada es una colonia de células, un cultivo celular líquido, o una muestra de un paciente o de un animal.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la muestra del paciente o del animal se ha obtenido directamente del paciente o del animal y/o es una muestra de tejido, preferiblemente sangre, suero, plasma o linfa.
- 60 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la proteína diana en dicha muestra no purificada está comprendida dentro de o en las células.
- 65 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la muestra no purificada se somete a la etapa a) antes de llevar a cabo una etapa de lisis.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la muestra no purificada es una colonia de células, la etapa de separación b) es una filtración y en el que dicha colonia de células se transfiere a un filtro y la lisis se lleva a cabo directamente en la colonia sobre el filtro.

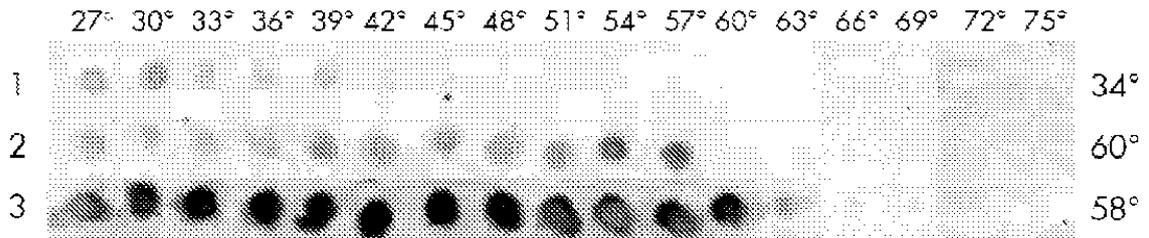


Figura 1

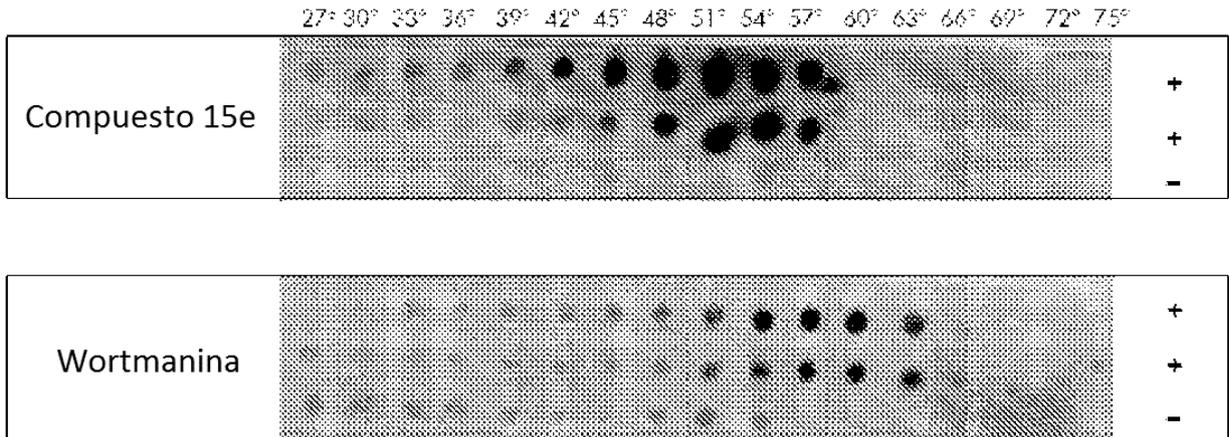


Figura 2



Figura 3a



Figura 3b

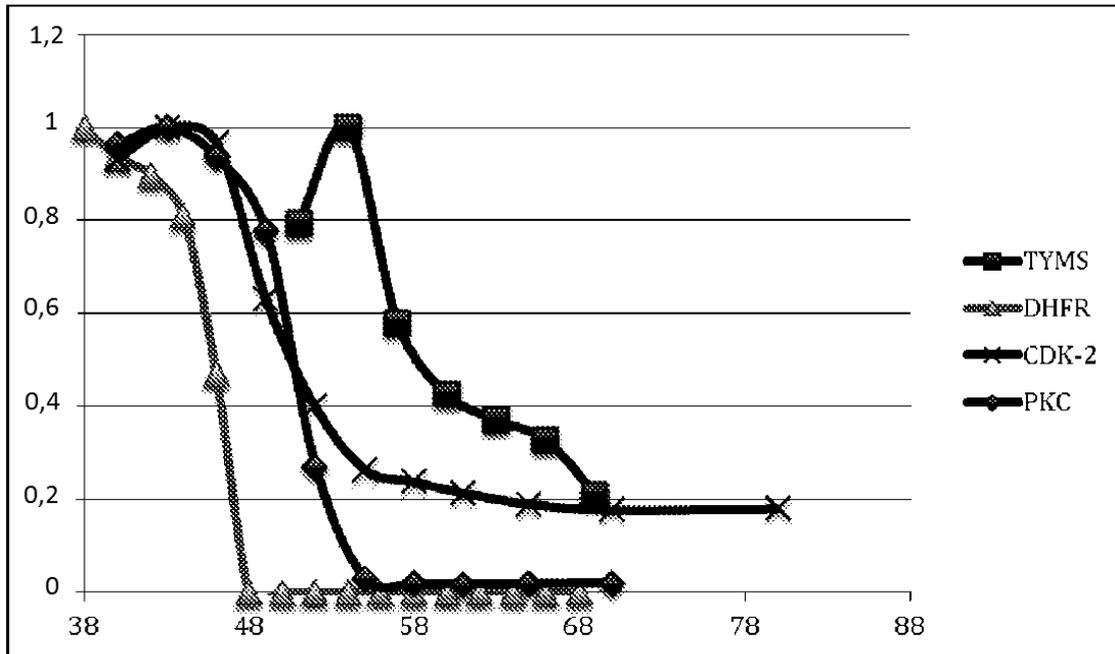


Figura 4

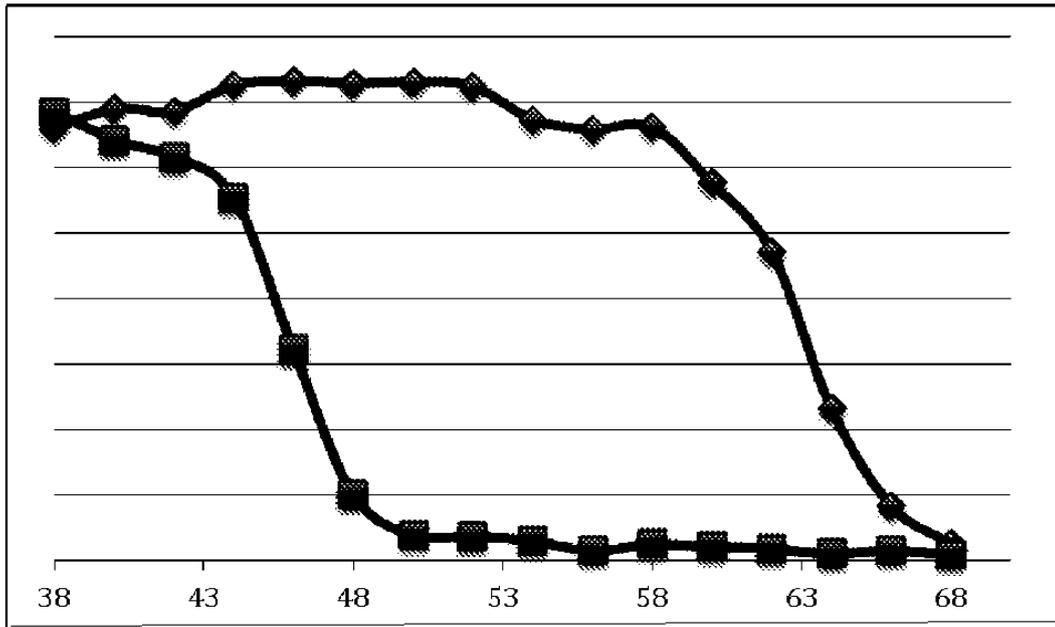


Figura 5

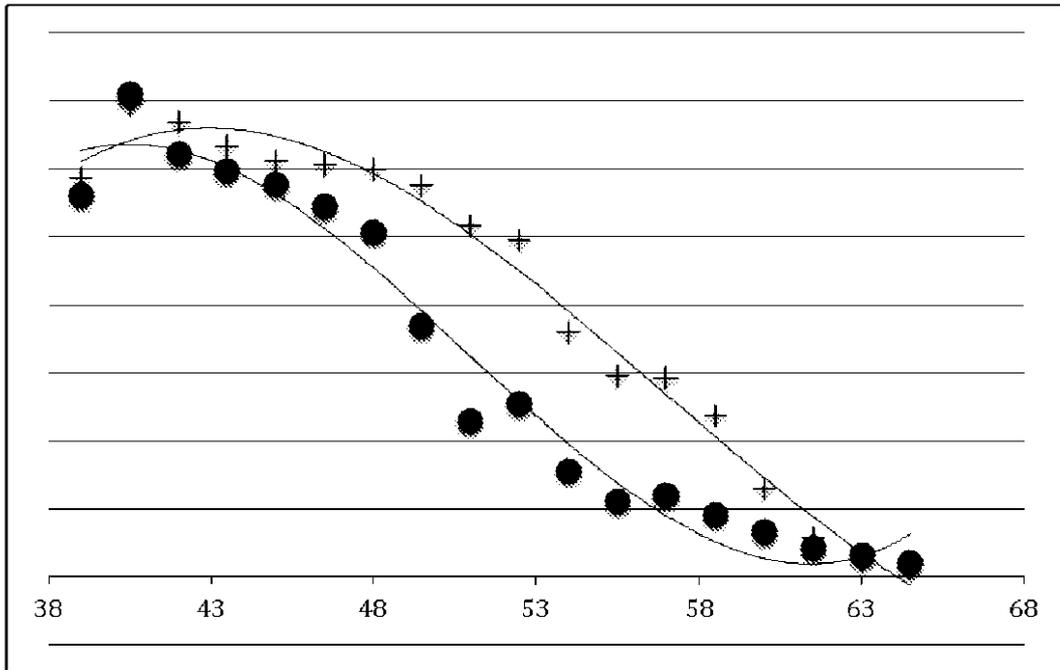


Figura 6

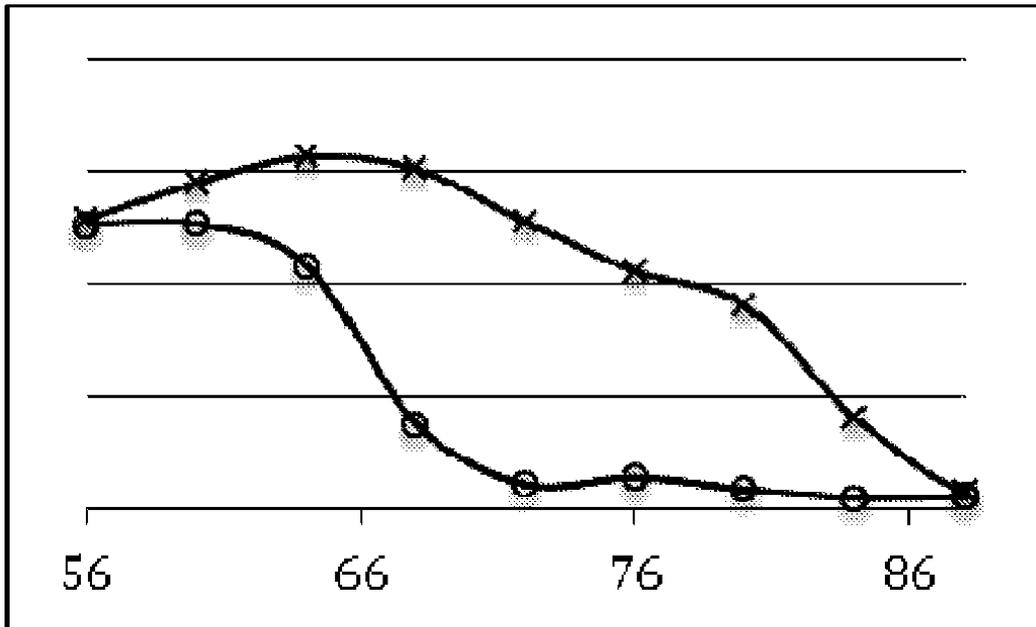


Figura 7a

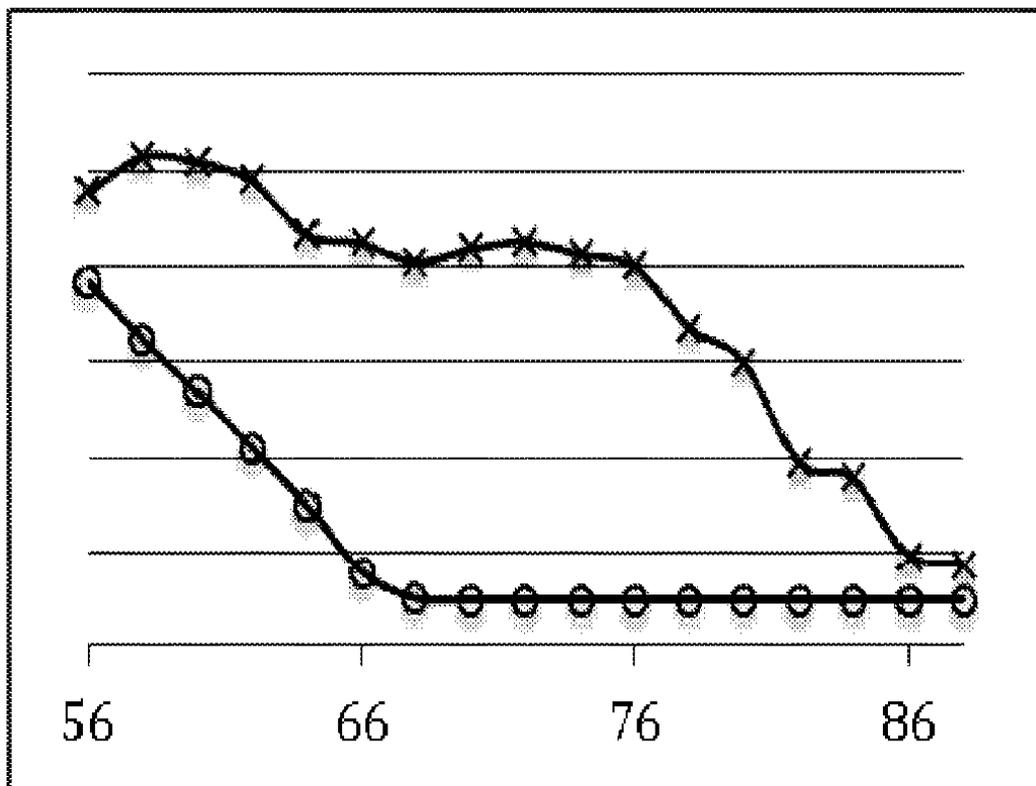


Figura 7b

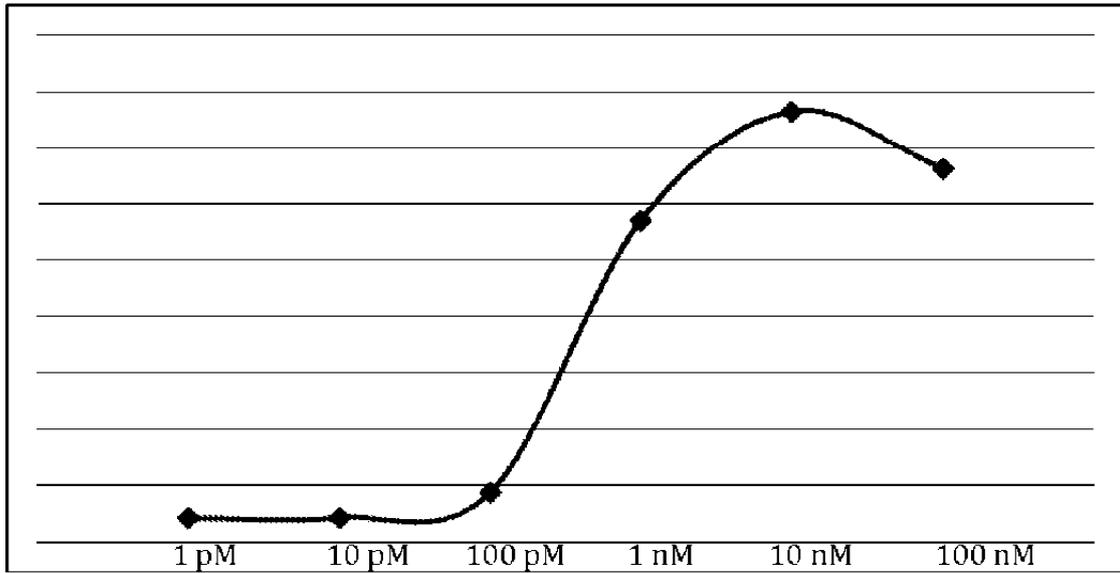


Figura 8

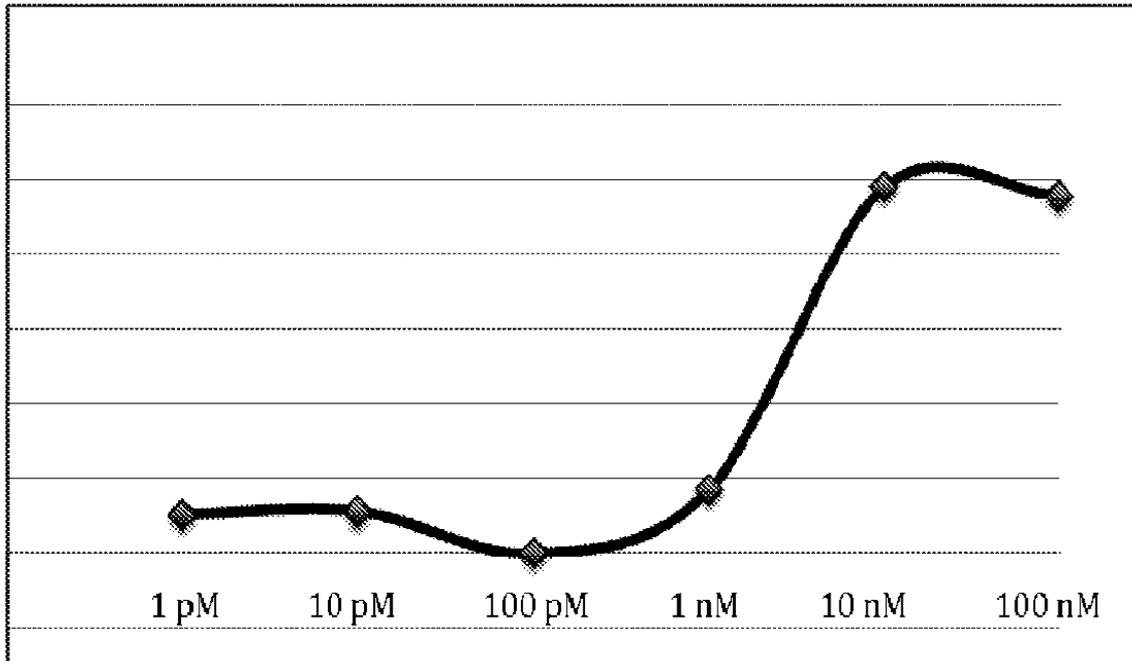


Figura 9

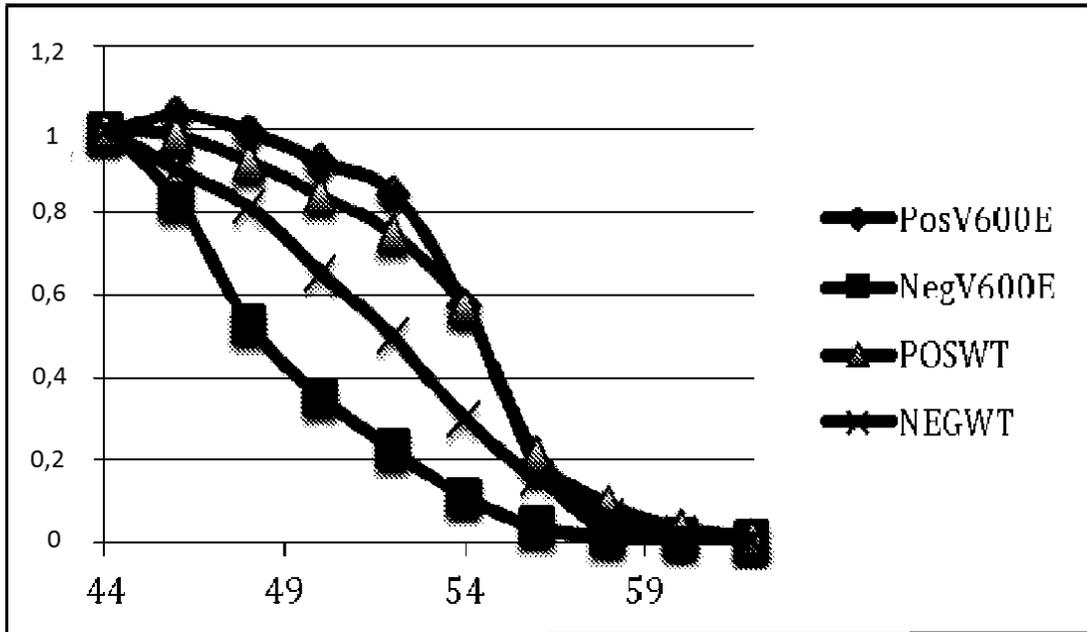


Figura 10