

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 490**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2012 E 14187243 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2821792**

54 Título: **Micromatrices de aglutinación en placa de un proteoma completo**

30 Prioridad:

18.03.2011 US 201161454214 P

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

21.12.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ALBERT, THOMAS;
BUEHLER, JOCHEN;
RICHMOND, TODD;
RODESCH, MATTHEW y
STENGELE, KLAUS-PETER**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 647 490 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

Micromatrices de aglutinación en placa de un proteoma completo

5 **Campo de la invención**

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, se refiere a una micromatriz que comprende al menos 50 000 casillas de oligopéptidos por cm², en la que las casillas de oligopéptidos representan entre aproximadamente un 90 % y un 100 % del proteoma de un virus o un organismo. La presente invención, como se define en las
 10 reivindicaciones, se refiere adicionalmente a procedimientos para la síntesis de dichas micromatrices y a procedimientos de uso de micromatrices que comprendan al menos 50.000 casillas de oligopéptidos por cm². En un modo de realización de la invención, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en la misma especie, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos aproximadamente 5000, al menos aproximadamente 10 000, al menos aproximadamente 15 000, al menos
 15 aproximadamente 20 000 o al menos aproximadamente 25 000 de las proteínas expresadas en una especie. En algunos modos de realización, las casillas de micromatrices de oligopéptidos representan proteínas expresadas en la misma especie, en las que las casillas de micromatrices se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 de las proteínas expresadas en una especie, entre aproximadamente 10 000 y 50 000 de las proteínas expresadas en una especie, entre aproximadamente 15 000 y
 20 50 000 de las proteínas expresadas en una especie, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 de las proteínas expresadas en una especie o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 de las proteínas expresadas en una especie.

Antecedentes de la invención

25 Las micromatrices de oligopéptidos se usan ampliamente en investigación y en atención sanitaria. En estos ámbitos, las micromatrices de oligopéptidos son adecuadas para muchas aplicaciones diferentes. Las micromatrices de oligopéptidos, por ejemplo, proporcionan una herramienta para la identificación de motivos biológicamente activos, por ejemplo, las micromatrices de oligopéptidos pueden imitar a los motivos activos potenciales de ligandos para cribar la unión a los receptores correspondientes. Además, las micromatrices de oligopéptidos pueden reflejar secuencias
 30 específicas de antígenos asociados a enfermedades. Dichas micromatrices de oligopéptidos se pueden utilizar para detectar anticuerpos en muestras de pacientes que sugieren la presencia de determinadas enfermedades inflamatorias, infecciones y similares. Otra aplicación importante de las micromatrices de oligopéptidos es el descubrimiento de interacciones bioquímicas, incluyendo la unión de proteínas o ADN. Las micromatrices de oligopéptidos se pueden usar adicionalmente para seguir el rastro de la actividad celular, la actividad de enzimas, la
 35 adhesión de células y similares.

Los procedimientos tradicionales para el análisis de las enfermedades autoinmunitarias implican la detección de autoanticuerpos e incluyen enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), análisis de inmunoelectrotransferencia, análisis de inmunoprecipitación y ensayos basados en flujo. Los ensayos rutinarios para la detección de
 40 autoanticuerpos se realizan, en general, mediante ELISA y ensayos de fluorescencia. Los ensayos individuales se realizan en placas de microvaloración, con un único antígeno por pocillo. Estas pruebas se realizan de una en una, son laboriosas y caras. Las matrices de oligopéptidos se han usado para caracterizar y detectar autoanticuerpos, pero en general han utilizado moléculas de antígenos purificados impresas en sustratos. Los antígenos se deben producir en sistemas de expresión recombinante y se deben purificar, por lo que se trata de un procedimiento que requiere mucho
 45 tiempo. En general, estos antígenos son proteínas completas, o dominios antigénicos conocidos, y no permiten la caracterización de epítomos específicos. También se han utilizado matrices de péptidos sintéticos; sin embargo, la producción de estos péptidos se hace mediante sintetizadores de péptidos automatizados comerciales y, entonces, se imprimen en portaobjetos. Sin embargo, no pueden lograr la escala de péptidos sintetizados mediante la tecnología de síntesis de matrices sin máscara (MAS). La tecnología de base respectiva se divulga en

50 el documento WO 2008/151146 A2

el documento US 2005/101763 A1

55 MARTHANDAN N *ET AL.*

(IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE vol. 7, n.º 1, 1 de marzo de 2008 (01-03-2008), páginas 20-27)

YUN CHIEN CHENG *ET AL.*

60 (PROCEEDINGS OF THE WSEAS CONFERENCE, WORLD SCIENTIFIC AND ENGINEERING ACADEMY AND SOCIETY, EE. UU., 1 de enero de 2010 (01-01-2010), páginas 19-22, XP008153081) y

STENGELE K-P *ET AL.*

65 (NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS vol. 24, n.º 5/7, 1 de enero de 2005 (01-01-2005), páginas

891-896).

Los procedimientos tradicionales, tales como ELISA, son laboriosos y costosos, y solo se pueden hacer para un antígeno cada vez. Aunque las micromatrices de oligopéptidos impresas estén disponibles y permitan la detección paralela de múltiples autoanticuerpos, el coste de producción de esas matrices es muy caro debido al coste de producción de las moléculas de antígenos purificados en un sistema de expresión recombinante. Además, tienen una resolución muy baja y no pueden lograr la cobertura integral de sustancialmente todo el proteoma, algo que sí puede conseguir una micromatriz de oligopéptidos. Muchas proteínas no se pueden sintetizar en sistemas *in vitro*, lo que impide su uso en dichas matrices.

Además, los antígenos que se expresan y posteriormente imprimen en una micromatriz a menudo solo representan un pequeño porcentaje de la secuencia de proteínas total. Los anticuerpos de un paciente se pueden dirigir a un conjunto de dominios antigénicos, mientras que, en otro paciente, los anticuerpos se pueden dirigir a un conjunto completamente diferente de dominios antigénicos de la misma proteína. Dichas diferencias entre pacientes pueden provenir de un plegamiento erróneo de las proteínas, un problema común en las enfermedades autoinmunitarias, provocando de esta manera la presentación diferencial de los dominios de proteínas con respecto a los linfocitos B productores de anticuerpos. De esta manera, son preferentes las matrices de oligopéptidos, puesto que permiten examinar todos los sitios antigénicos posibles de una proteína dada a fin de detectar patrones o huellas genéticas en muchos pacientes.

El objeto de la presente invención es proporcionar micromatrices con oligopéptidos de alta densidad con capacidades mejoradas para el análisis de alta resolución (que incluye, pero no se limita a, análisis serológico), un procedimiento para su síntesis y su uso. La ventaja de las micromatrices de acuerdo con la invención es su densidad de oligopéptidos y la cobertura de sustancialmente todo el proteoma de un organismo mediante la aplicación de un concepto de aglutinación en placa. Debido a esta densidad de oligopéptidos, las micromatrices de acuerdo con la invención permiten la detección paralela de todos los autoanticuerpos de una muestra de suero humano en un único ensayo de unión. Además, el ensayo permite obtener información específica sobre la localización de los epítomos mediante la introducción del concepto de aglutinación en placa. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento simple y rentable para el cribado en cuanto a una amplia variedad de enfermedades autoinmunitarias, así como para un mapeado de epítomos rápido y personalizado, el cribado de péptidos en cuanto a su unión a moléculas pequeñas, la síntesis de matrices similares a anticuerpos para el análisis de la expresión de proteínas, el barrido de péptidos a escala de proteoma y muchas más aplicaciones.

Resumen de la invención

La presente invención se ha definido en las reivindicaciones y se refiere a la síntesis de una micromatriz con alta densidad de casillas de oligopéptidos, permitiendo así la detección de las interacciones de proteínas en todo el proteoma de un organismo. La micromatriz correspondiente definida en las reivindicaciones comprende al menos 50 000 casillas de oligopéptidos por cm².

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** representa un procedimiento sintético útil en la presente invención, en el que se utiliza un dispositivo digital de microespejos para la síntesis de matrices sin máscara de matrices de oligopéptidos.

La **Figura 2** representa una "aglutinación en placa" representativa de la secuencia de poli(A) polimerasa alfa (PAPOLA) desde el aminoácido 620 al aminoácido 649.

La **Figura 3** proporciona ejemplos de unión de anti-PAPOLA policlonal a una matriz de péptidos "diana" (Fig. 3A), representando la misma matriz la unión a la proteína PAPOLA de longitud total (Fig. 3B) y la unión a la diana de PAPOLA en una matriz de proteoma total (Fig. 3C).

La **Figura 4** muestra un resumen de los autoanticuerpos y epítomos determinados a través de experimentos de unión.

La **Figura 5** muestra una valoración de sensibilidad de una dilución del anticuerpo anti-PAPOLA.

La **Figura 6** muestra la unión de una población de IgG aislada de una muestra de suero de cáncer colorrectal a una matriz con aproximadamente 40 000 péptidos 12-méricos con un solapamiento 11-mérico.

La **Figura 7** proporciona ejemplos de unión de anti-ADA policlonal a una matriz de péptidos "diana" (Fig. 7A), representando la misma matriz la unión a la proteína ADA de longitud total (Fig. 7B) y la unión a la diana de ADA en una matriz de proteoma total (Fig. 7C).

La **Figura 8** muestra la unión de anti-poli-histidina monoclonal en una matriz de proteoma total.

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de diversos términos usados para describir la invención y la divulgación en el presente documento.

5 El término “micromatriz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una disposición bidimensional de casillas sobre la superficie de un soporte sólido o semisólido. Las “casillas”, como se usan en el presente documento, son áreas definidas en la micromatriz que comprenden biomoléculas, tales como péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y similares. Las casillas se pueden diseñar en cualquier forma, pero preferentemente las casillas se diseñan como cuadrados o rectángulos. Las casillas pueden presentar cualquier densidad de biomoléculas. En algunos casos, la densidad es de al menos 10 000 casillas por cm².

15 El término “proteoma”, como se usa en el presente documento, se refiere a todas las proteínas o a un conjunto de proteínas expresadas por un genoma, célula, tejido u organismo, incluyendo todas las proteínas contenidas en las bases de datos existentes actualmente que describen las proteínas expresadas de un organismo particular, e incluye adicionalmente todas las variantes o un conjunto de variantes de proteínas resultantes del empalme alternativo de los genes, todas las proteínas modificadas postraduccionalmente y proteínas traducidas a partir de genes que contienen uno o más polimorfismos mononucleotídicos (SNP), mutaciones de cambio de marco, deleciones, inversiones y similares. Los ejemplos de bases de datos existentes que describen las proteínas expresadas de diversos organismos son:

20 UniProt (Universal Protein Resource; uniprot.org en Internet);
 Ensembl (ensembl.org en Internet);
 VEGA (Vertebrate Genome Annotation; vega.sanger.ac.uk/ en Internet);
 CCDS (Consensus CDS; ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/ en Internet);
 UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu en Internet);
 25 Base de datos de NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/protein en Internet); y
 RCSB Protein Data Bank (pdb.org/ en Internet).

30 Dichas bases de datos se pueden consultar en relación con organismos particulares. Por ejemplo, la base de datos UniProt se puede consultar en cuanto a las proteínas por taxonomía. Para la determinación de las proteínas que contienen SNP, un experto en la técnica buscaría en las bases de datos existentes actualmente que contienen información en relación con los SNP, tal como dbSNP de NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/ en Internet).

35 El término “modificación postraducciona”, como se usa en el presente documento, se refiere a una modificación química de una proteína, produciéndose la modificación después de la traducción de la proteína. Las modificaciones postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, fosforilación, acetilación, metilación, palmitoilación, amidación y similares.

40 El término “respuesta serológica”, como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de anticuerpos en un organismo, por ejemplo, en el cuerpo humano, en la que los anticuerpos se dirigen contra determinados antígenos. Los anticuerpos se pueden dirigir contra xenoantígenos, tales como moléculas o estructuras en la superficie de moléculas, compuestos o microorganismos intrusos. Preferentemente, los anticuerpos se pueden dirigir contra los antígenos propios del organismo (en casos de enfermedades autoinmunitarias, lesiones precancerosas o cáncer). Preferentemente, los antígenos propios del organismo son proteínas. La respuesta serológica se puede medir mediante pruebas de diagnóstico, que detectan los anticuerpos específicos en cuanto a la respuesta en líquidos corporales, preferentemente en suero, dando así información sobre el motivo de la respuesta a fin de establecer acciones terapéuticas. Como pruebas de diagnóstico se pueden usar pruebas conocidas por el experto en la técnica, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, aglutinación y similares.

50 El término “estímulo externo”, como se usa en el presente documento, se refiere a estímulos que inducen una respuesta serológica, mientras que los estímulos tienen su origen fuera del organismo, preferentemente, el cuerpo humano. Los estímulos externos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, polen, péptidos, proteínas, venenos y similares.

55 El término “reacción autoinmunitaria”, como se usa en el presente documento, se refiere a disfunciones del sistema inmunitario, preferentemente del sistema inmunitario humano. Dichas disfunciones se caracterizan por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra los antígenos propios del organismo o por la producción de inmunocitos que se dirigen a y atacan células o tejidos particulares del cuerpo, preferentemente del cuerpo humano. La reacción autoinmunitaria puede dar como resultado síntomas que constituyen un trastorno autoinmunitario. La definición de reacción autoinmunitaria incluye, pero no se limita a, reacciones inmunitarias que se producen como reacción a la presencia de lesiones preneoplásicas, lesiones neoplásicas, células malignas, tejidos malignos.

65 El término “soporte sólido”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material sólido que tenga un área de superficie a la que se puedan acoplar moléculas orgánicas a través de la formación de enlaces o absorber a través de interacciones electrónicas o estáticas, tales como un enlace covalente o la formación de complejos a través de un grupo funcional específico. El soporte puede ser una combinación de materiales, tales como plástico sobre vidrio, carbono sobre vidrio y similares. La superficie funcional puede ser moléculas orgánicas simples, pero también

puede comprender copolímeros, dendrímeros, cepillos moleculares y similares.

El término "plástico", como se usa en el presente documento, se refiere a materiales sintéticos, tales como homo o heterocopolímeros de bloques orgánicos de construcción (monómero) con una superficie funcionalizada de tal manera que las moléculas orgánicas se puedan acoplar a través de la formación de enlaces covalentes o absorber a través de interacciones electrónicas o estáticas, tal como a través de la formación de enlaces a través de un grupo funcional. Preferentemente, el término "plástico" se refiere a poliolefina, que es un polímero derivado de la polimerización de una olefina (por ejemplo, polímero de monómero de etileno propileno dieno, poliisobutileno). Lo más preferentemente, el plástico es una poliolefina con propiedades ópticas definidas, como TOPAS® o ZEONOR/EX®.

El término "transmisión de la luz", como se usa en el presente documento, se refiere a la propiedad de la materia mediante la que la materia es transparente hasta un determinado grado de tal forma que la luz pueda atravesar la materia. La cantidad de luz que la atraviesa es dependiente del grado de transparencia o transmitancia.

El término "fot irradiación resuelta espacialmente", como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que la luz se dirige de manera precisa hacia áreas definidas de una superficie, preferentemente la superficie de una micromatriz, mediante un dispositivo, tal como una colección de microespejos de aluminio direccionables individualmente. El dispositivo controla el patrón global de la luz proyectada sobre la superficie, preparando así las áreas para la siguiente reacción de acoplamiento. Preferentemente, la exposición a la luz da lugar a la escisión de grupos protectores fotolábiles y al desenmascaramiento de grupos funcionales en las áreas donde se va a acoplar el siguiente componente, por ejemplo, un aminoácido o un nucleótido. Este sistema se combina en paralelo con un sintetizador a fin de producir micromatrices. El uso de esta técnica que dirige la luz hacia microespejos de aluminio direccionables individualmente, permite sintetizar de 385 000 a 4,2 millones de casillas de sondas únicas en una única micromatriz de tamaño de portaobjetos de 75 x 25 mm.

El término "fotolitografía sin máscara", como se usa en el presente documento, se refiere a una técnica para la síntesis de micromatrices de ADN u oligopéptidos sin el uso de fotomáscaras. En la fotolitografía sin máscara se usa un dispositivo para dirigir la luz hacia un área definida de una superficie, preferentemente la superficie de una micromatriz, a fin de inducir fotorreacciones, preferentemente la liberación de grupos protectores fotolábiles. Los ejemplos de dicho dispositivo pueden ser un dispositivo de microespejos, una pantalla LCD transmisora de luz o un divisor de haz. Preferentemente, el dispositivo es una colección de elementos de espejo de aluminio direccionables individualmente que se hacen funcionar bajo el control de programas informáticos. Dichos elementos de espejo dirigen individualmente la luz hacia un área definida de una superficie, preferentemente la superficie de una micromatriz. Un dispositivo de microespejos preferente es el Digital Light Processor (DLP) de Texas Instruments, Inc.

El término "grupo protector",/ como se usa en el presente documento, se refiere a un sustituyente, grupo funcional, ligando o similar, que se une de manera escindible (por ejemplo, por medio de un enlace covalente, enlace iónico o complejo) a un grupo funcional potencialmente reactivo y previene que el grupo funcional potencialmente reactivo reaccione de manera incontrolada. Preferentemente, el grupo protector se une de manera escindible por medio de un enlace covalente. El grupo protector se puede escindir del respectivo grupo funcional reactivo de cualquier forma, tal como mediante ácidos, bases, fluoruro, enzimas, reducción u oxidación. Preferentemente, el grupo protector se escinde mediante exposición a la luz. Los grupos protectores de acuerdo con la divulgación son grupos protectores fotolábiles, que incluyen, pero no se limitan a, o-nitrobenzil-oxicarbonilo (NBOC), o-nitrofenil-etoxicarbonilo (NPEOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-propiloxi-carbonilo (MeNPPOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-oxicarbonilo (MeNPOC), 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC), 2-(2-nitro-4-benzoilfenil)-2'-propil-1'-oxicarbonilo (benzoil-NPPOC), dimetoxi-benzo-inilil-oxicarbonilo (DMBOC), 2-(2-nitrofenil)-etilsulfonilo (NPES), (2-nitrofenil)-propilsulfonilo (NPPS) y similares.

El término "grupo funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de numerosas combinaciones de átomos que forman parte de moléculas químicas, que experimentan reacciones características por sí mismas y que influyen en la reactividad del resto de la molécula. Los grupos funcionales típicos son hidroxilo, carboxilo, aldehído, carbonilo, amino, azida, alquinilo, tiol y nitrilo. Los grupos funcionales potencialmente reactivos incluyen, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, dobles enlaces y similares. Los grupos funcionales preferentes son grupos funcionales potencialmente reactivos de aminoácidos, tales como grupos amino o grupos carboxilo.

El término "aminoácido natural", como se usa en el presente documento, se refiere a uno de los 20 aminoácidos usados para la biosíntesis de proteínas, así como a otros aminoácidos que se pueden incorporar en las proteínas durante la traducción (incluyendo pirrolisina y selenocisteína). Los 20 aminoácidos naturales incluyen histidina, alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, metionina y lisina.

El término "aminoácido no natural", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto orgánico que no está entre los codificados por el código genético estándar o se incorpora en las proteínas durante la traducción. Por lo tanto, los aminoácidos no naturales incluyen aminoácidos o análogos de aminoácidos, pero no se limitan a, los isostereómeros D de aminoácidos, los análogos beta-amino de aminoácidos, citrulina, homocitrulina, homoarginina,

hidroxiprolina, homoprolina, ornitina, 4-amino-fenilalanina, ciclohexilalanina, ácido α -aminoisobutírico, N-metil-alanina, N-metil-glicina, norleucina, ácido N-metil glutámico, terc-butilglicina, ácido α -aminobutírico, terc-butilalanina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2-aminoindano-2-carboxílico, selenometionina, deshidroalanina, lantionina, ácido γ -aminobutírico y derivados de los mismos en los que el nitrógeno amínico está mono o dialquilado.

5 El término "péptido" u "oligopéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos orgánicos formados por aminoácidos que están dispuestos en una cadena lineal y unidos entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácido adyacentes. El término "péptido" u "oligopéptido" se refiere preferentemente a compuestos orgánicos formados por menos de 70 residuos de aminoácido, más
10 preferentemente menos de 35 residuos de aminoácido, más preferentemente menos de 25 residuos de aminoácido.

El término "grupo amino", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos amino primarios ($-\text{NH}_2$) o secundarios ($-\text{NHR}_1$). Los ejemplos de grupos amino incluyen, pero no se limitan a, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHCH}_3$, $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2$. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, pero no se limitan a, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino y tiomorfolino.
15

El término "grupo amino reactivo", como se usa en el presente documento, se refiere a una amina que puede reaccionar con un grupo funcional para formar un enlace covalente entre el nitrógeno del grupo amino y el electrófilo del grupo funcional, tal como un enlace peptídico.
20

El término "disolvente orgánico polar", como se usa en el presente documento, se refiere a disolventes que son solubles en agua en tanto que es posible una mezcla homogénea del disolvente en agua a temperatura ambiente en condiciones ambientales. Los disolventes orgánicos polares preferentes son metanol, etanol, propanol, metiletilcetona, acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano (THF), dioxano, dimetilsulfóxido (DMSO), n-metil-2-pirrolidona (NMP),
25 dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA).

El término "base", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia capaz de aceptar un protón en disolventes polares o no polares. La base de elección para una reacción particular depende de los materiales de partida, del disolvente y de la temperatura usados para una reacción específica. Los ejemplos de bases incluyen sales de carbonato, fosfatos, haluros, hidróxidos, hidruros, aminas heterocíclicas, disililamidas, trialkilaminas, aminas bicíclicas, hidruros de metales alcalinos, bases que contienen nitrógeno.
30

El término "ciclo de síntesis", como se usa en el presente documento, se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se llevan a cabo para realizar una síntesis de oligopéptidos. Preferentemente, el término "ciclo de síntesis" se refiere a un número predeterminado de etapas de reacción sucesivas que se llevan a cabo durante la síntesis en fase sólida de oligopéptidos a fin de acoplar el respectivo siguiente aminoácido al grupo funcional previo. La síntesis de oligopéptidos comprende un número predeterminado de ciclos de síntesis, en la que en cada ciclo se acopla un aminoácido específico al grupo funcional previo. Por lo tanto, el número de ciclos depende del número de aminoácidos del oligopéptido. Por ejemplo, para la síntesis de una micromatriz de péptidos que contenga
35 20 bloques de construcción de aminoácidos, se requieren 20 ciclos para elongar cada casilla de la micromatriz de péptidos en un residuo de aminoácido. La combinación de residuos de aminoácido en un oligopéptido depende de los aminoácidos específicos que se acoplan uno tras otro al respectivo grupo funcional previo durante los ciclos de síntesis sucesivos.
40

El término "molécula secuestrante", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente reactivo con radicales libres. Además, una molécula secuestrante puede ser una molécula que reaccione con olefinas por medio de una reacción de adición conocida en el campo de la química de péptidos. La molécula secuestrante es un agente que puede estar contenido en disolventes orgánicos polares a fin de reaccionar con productos secundarios de la etapa de desprotección. Las moléculas secuestrantes incluyen, pero no se limitan a, aminas nucleófilas fuertes, como piperidina, piperazina, imidazol y similares, así como neutralizadores de radicales, tales como hidroxilamina, TEMPO, Oxo-TEMPO, tiofenoles y fenoles impedidos estéricamente.
45
50

Las matrices de oligopéptidos de la presente invención proporcionan una serie de usos no disponibles actualmente con respecto a la tecnología de matrices de oligopéptidos existente. Como ejemplo, dichas micromatrices de oligopéptidos son útiles en la detección de anticuerpos relacionada con enfermedades autoinmunitarias. En general, las enfermedades autoinmunitarias son el resultado de una respuesta inmunitaria hiperactiva del cuerpo a sus propios tejidos y/o sustancias. El cuerpo ataca a sus propias células, dando como resultado diversos síntomas de enfermedad. Se conocen más de 80 enfermedades autoinmunitarias diferentes. Los síntomas de las diferentes enfermedades autoinmunitarias varían dependiendo de la propia enfermedad, así como de la constitución del sistema inmunitario del paciente. Algunos síntomas, sin embargo, pueden ser idénticos en enfermedades autoinmunitarias diferentes. Los síntomas incluyen, pero no se limitan a: astenia, malestar general, mareos, temperatura corporal alta o fiebre, sensibilidad incrementada a la temperatura en manos y pies. Los síntomas graves son inflamación, debilidad y rigidez de los músculos y articulaciones, problemas digestivos o gastrointestinales que dan como resultado cambios en el peso, cambios en la glucemia, presión arterial anómala, irritabilidad, ansiedad o depresión, libido reducida, infertilidad y cambio en el tamaño de un órgano o incluso destrucción de un órgano o tejido. La diversidad de los síntomas y la difícil clasificación impiden un diagnóstico eficaz y unos enfoques terapéuticos eficaces. El éxito del tratamiento de una
55
60
65

enfermedad autoinmunitaria depende en general de los síntomas de una persona, los resultados de la exploración física y las pruebas de diagnóstico, siendo estas últimas un elemento esencial de los enfoques terapéuticos eficaces. Por lo tanto, se requieren procedimientos simples y rentables de cribado para una amplia variedad de enfermedades autoinmunitarias.

5 Además, las micromatrices de oligopéptidos son adecuadas para el análisis de básicamente cualquier otra enfermedad que implique interacciones de proteínas que se puedan representar en una matriz. Por ejemplo, las micromatrices de oligopéptidos proporcionan una herramienta para la identificación de motivos biológicamente activos implicados en la aparición de determinadas enfermedades, por ejemplo, las micromatrices de oligopéptidos pueden imitar a los motivos activos potenciales de ligandos para cribar la unión a los receptores correspondientes. Además, las micromatrices de oligopéptidos pueden reflejar secuencias específicas de antígenos asociados a enfermedades. Dichas micromatrices de oligopéptidos se pueden utilizar para detectar anticuerpos en muestras de pacientes que sugieren la presencia de determinadas enfermedades inflamatorias, infecciones y similares. Otra aplicación importante de las micromatrices de oligopéptidos es el descubrimiento de las interacciones bioquímicas, incluyendo las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína. Las micromatrices de oligopéptidos se pueden usar adicionalmente para seguir el rastro de la actividad celular, la actividad de enzimas, la adhesión de células y similares.

Las aplicaciones autoinmunitarias son tan solo un ejemplo de la utilidad de las matrices con oligopéptidos de alta densidad. Otras aplicaciones incluyen, pero no se limitan a, el mapeado de epítomos rápido y personalizado, el cribado de péptidos en cuanto a su unión a moléculas pequeñas, la síntesis de matrices similares a anticuerpos para el análisis de la expresión de proteínas, el barrido de péptidos a escala de proteoma y muchas más aplicaciones.

En la fotolitografía sin máscara, en la que la luz se dirige hacia áreas específicas de la superficie de síntesis, la desprotección localizada de los PLPG se efectúa mediante tecnologías de proyección digital, tal como los dispositivos de microespejos (Singh-Gasson *et al.*, *Nature Biotechn.* 17 (1999) 974-978). De esta manera, es innecesaria la producción de máscaras de exposición que requiere mucho tiempo y es cara.

Las etapas del ciclo de síntesis útiles para la fabricación de micromatrices de oligopéptidos de la presente invención se ejemplifican en la Fig. 1. En un modo de realización se irradian soportes sólidos de plástico que comprenden grupos amino reactivos y/o restos de enlazador de ácido ϵ -aminohexanoico reactivos usando luz de una fuente de luz dirigida hacia un dispositivo digital de microespejos (DMD) que redirige la luz hacia la superficie del soporte sólido. La iluminación de una localización particular usando el DMD está "encendida" o "apagada" dependiendo de si un sitio de una casilla particular incorpora el siguiente aminoácido en el ciclo de síntesis. Si el oligopéptido deseado en una localización particular requiere dicho siguiente aminoácido sucesivo, la luz reflejada desde el DMD a esa localización particular esta "encendida" (es decir, esa casilla particular se iluminará), escindiendo de esta manera el grupo protector del aminoácido presente en ese sitio. Si el oligopéptido deseado en una localización particular no incorpora el siguiente aminoácido sucesivo, el DMD está "apagado" en esa posición (es decir, esa casilla no se iluminará) y el aminoácido presente en ese sitio permanecerá protegido.

En la Fig. 1 se ejemplifican cuatro casillas de micromatrices particulares (casillas 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Cada casilla está ocupada por un aminoácido protegido de una etapa previa del ciclo de síntesis. Las casillas 2 y 4 se iluminan mediante el DMD, escindiendo el grupo protector de los respectivos aminoácidos en esas casillas. Entonces, se deja que el siguiente aminoácido sucesivo, la asparagina con un grupo protector fotolábil en este ejemplo, fluya sobre la micromatriz y se incorpore en las casillas activadas 2 y 4, pero no se incorpore en las casillas bloqueadas 1 y 3. De esta manera, los oligopéptidos que se construyen en las casillas 2 y 4 se extienden mediante la adición de asparagina bloqueada, mientras que los oligopéptidos que se construyen en las casillas 1 y 3 permanecen sin cambios. En la siguiente etapa del ciclo de síntesis ejemplificada en la Fig. 1, las casillas 1 y 4 se iluminan mediante el DMD, escindiendo el grupo protector de los respectivos aminoácidos en esas casillas, mientras que las casillas 2 y 3 permanecen protegidas. Entonces, se deja que la alanina protegida fluya sobre la micromatriz y se incorpore en las casillas 1 y 4, pero no se incorpore en las casillas 2 y 3. Las etapas sucesivas continúan hasta que se sintetizan los oligopéptidos apropiados en las cuatro casillas.

Los aminoácidos introducidos en la síntesis de micromatrices de oligopéptidos están protegidos con NPPOC o MeNPPOC, respectivamente. El procedimiento que usa aminoácidos protegidos con NPPOC tiene la desventaja de que la semivida de todos los aminoácidos protegidos (excepto uno) está en el intervalo de aproximadamente 2 a 3 minutos en determinadas condiciones. Por el contrario, en las mismas condiciones, la tirosina protegida con NPPOC presenta una semivida de prácticamente 10 minutos. Dado que la velocidad del procedimiento de síntesis completo depende del subprocedimiento más lento, este fenómeno incrementa el tiempo del procedimiento de síntesis en un factor de 3 a 4. Simultáneamente, el grado de daño provocado por los iones radicalarios fotogenerados a los oligómeros en crecimiento se incrementa al hacerlo el requisito de dosis de luz excesiva y en incremento. Los aminoácidos, que están protegidos con benzoil-NPPOC, muestran una semivida de aproximadamente 2 a 3 minutos, incluyendo la tirosina protegida con benzoil-NPPOC. El inconveniente de usar exclusivamente aminoácidos protegidos con benzoil-NPPOC es que los grupos protectores disociados se adhieren al soporte sólido, inhibiendo así el procedimiento de síntesis de los oligopéptidos, un fenómeno que es desconocido para las matrices de ADN y que se atribuye a la adición inducida por la luz del resto de benzofenona liberado a la cadena peptídica en crecimiento o bien al propio soporte sólido. En la tecnología de matrices de proteínas son preferentes los soportes derivados de plástico debido a su baja unión no

específica a las muestras de proteínas. Sin embargo, se conoce bien en el estado de la técnica que los restos de benzofenona se añaden a los hidrocarburos presentes en las superficies de plástico mediante un mecanismo radicalario.

5 En un aspecto de la invención, los oligopéptidos de cada casilla pueden tener una longitud de entre 9 y 18 residuos de aminoácido. En algunos casos, las casillas de oligopéptidos tienen una longitud de entre 10 y 15 aminoácidos. En otro modo de realización, la longitud de los oligopéptidos es de 12 residuos de aminoácido. En un modo de realización, sustancialmente todas las casillas de oligopéptidos tienen la misma longitud. Por ejemplo, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % de las casillas de oligopéptidos pueden tener la misma longitud en una
10 micromatriz proporcionada en el presente documento. En algunos casos, las secuencias de las casillas de oligopéptidos de una micromatriz proporcionada en el presente documento son sustancialmente idénticas. En un aspecto adicional de la invención, la secuencia de aminoácidos de cada casilla se solapa con la secuencia de aminoácidos de al menos otra casilla en al menos 3, al menos 6 o al menos 9 residuos de aminoácido contiguos. En un modo de realización, la secuencia de cada casilla tiene un solapamiento de n-1 con al menos otra casilla, en la que n es igual a la longitud del oligopéptido de al menos otra casilla.
15

En un aspecto de la invención, cada casilla de oligopéptidos representa una porción de un proteoma diana, en la que la diana se selecciona entre un virus y un organismo. Los organismos apropiados para las micromatrices y los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden incluir especies de mamíferos (por ejemplo, ser humano, ratón), especies vegetales (por ejemplo, *Arabidopsis*), especies de insectos (por ejemplo, *Drosophila*), procariontes, levaduras y hongos.
20

En un modo de realización de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en la misma especie, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 de las proteínas expresadas en una especie, al menos 10 000 proteínas expresadas, al menos 15 000 proteínas expresadas, al menos 20 000 proteínas expresadas o al menos 25 000 proteínas expresadas. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en la misma especie, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 proteínas expresadas, entre aproximadamente 10 000 y
25 50 000 proteínas expresadas, entre aproximadamente 15 000 y 50 000 proteínas expresadas, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 proteínas expresadas o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 proteínas expresadas.
30

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en un proteoma de mamífero, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 proteínas de mamífero, al menos 10 000 proteínas de mamífero, al menos 15 000 proteínas de mamífero o al menos 20 000 proteínas de mamífero. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en un mamífero, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 proteínas de mamífero, entre aproximadamente 10 000 y 50 /000 proteínas de mamífero, entre aproximadamente 15 000 y 50 000 proteínas de mamífero, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 proteínas de mamífero o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 proteínas de mamífero.
35
40

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en el proteoma humano, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 proteínas de ser humano, al menos 10 000 proteínas de ser humano, al menos 15 000 proteínas de ser humano o al menos 20 000 proteínas de ser humano. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en seres humanos, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 proteínas humanas, entre aproximadamente 10 000 y 50 000 proteínas humanas, entre aproximadamente 15 000 y 50 000 proteínas humanas, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 proteínas humanas o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 proteínas humanas.
45
50

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en el proteoma de ratón, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 proteínas de ratón, al menos 10 000 proteínas de ratón, al menos 15 000 proteínas de ratón o al menos 20 000 proteínas de ratón. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en ratón, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 proteínas de ratón, entre aproximadamente 10 000 y
55 50 000 proteínas de ratón, entre aproximadamente 15 000 y 50 000 proteínas de ratón, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 proteínas de ratón o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 proteínas de ratón.
60

En otro modo de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en un proteoma vegetal, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 proteínas vegetales, al menos 10 000 proteínas vegetales, al menos 15 000 proteínas vegetales, al menos 20 000 proteínas vegetales o al menos 25 000 proteínas vegetales. En algunos modos de realización, las casillas de
65

micromatrices de oligopéptidos representan proteínas expresadas en plantas, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 proteínas vegetales, entre aproximadamente 10 000 y 50 000 proteínas vegetales, entre aproximadamente 15 000 y 50 000 proteínas vegetales, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 proteínas vegetales o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 proteínas vegetales.

En otro modo de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en el proteoma de *Arabidopsis*, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos aproximadamente 5000 proteínas de *Arabidopsis*, al menos 10 000 proteínas de *Arabidopsis*, al menos 15 000 proteínas de *Arabidopsis*, al menos 20 000 proteínas de *Arabidopsis* o al menos 25 000 proteínas de *Arabidopsis*. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en *Arabidopsis*, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 50 000 proteínas de *Arabidopsis*, entre aproximadamente 10 000 y 50 000 proteínas de *Arabidopsis*, entre aproximadamente 15 000 y 50 000 proteínas de *Arabidopsis*, entre aproximadamente 20 000 y 50 000 proteínas de *Arabidopsis* o entre aproximadamente 25 000 y 50 000 proteínas de *Arabidopsis*.

En otro modo de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en un proteoma de insecto, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 proteínas de insecto, al menos 10 000 proteínas de insecto o al menos aproximadamente 15 000 proteínas de insecto. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en insectos, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 5000 y 30 000 proteínas de insecto, entre aproximadamente 10 000 y 30 000 proteínas de insecto, entre aproximadamente 15 000 y 30 000 proteínas de insecto, entre aproximadamente 20 000 y 30 000 proteínas de insecto o entre aproximadamente 25 000 y 30 000 proteínas de insecto.

En otro modo de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en el proteoma de *Drosophila*, en las que las casillas de micromatrices de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 5000 proteínas de *Drosophila*, al menos 10 000 proteínas de *Drosophila* o al menos aproximadamente 15 000 proteínas de *Drosophila*. En algunos modos de realización, las casillas de micromatrices de oligopéptidos representan proteínas expresadas en *Drosophila*, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa de 5000 a 50 000 proteínas de *Drosophila*, 10.000 a 50.000 proteínas de *Drosophila*, 15 000 a 50 000 proteínas de *Drosophila*, 20 000 a 50 000 proteínas de *Drosophila* o 25 000 a 50 000 proteínas de *Drosophila*.

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en procariontes, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 2000 proteínas de procarionte, al menos 3000 proteínas de procarionte, al menos 4000 proteínas de procarionte o al menos 5000 proteínas de procarionte. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en procariontes, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 2000 y 10 000 proteínas de procarionte, entre aproximadamente 3000 y 10 000 proteínas de procarionte, entre aproximadamente 4000 y 10 000 proteínas de procarionte o entre aproximadamente 5000 y 10 000 proteínas de procarionte.

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en *E. coli*, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 2000 proteínas de *E. coli*, al menos 3000 proteínas de *E. coli*, al menos 4000 proteínas de *E. coli* o al menos 5000 proteínas de *E. coli*. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en *E. coli*, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 2000 y 10 000 proteínas de *E. coli*, entre aproximadamente 3000 y 10 000 proteínas de *E. coli*, entre aproximadamente 4000 y 10 000 proteínas de *E. coli* o entre aproximadamente 5000 y 10 000 proteínas de *E. coli*.

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en hongos, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 2000 proteínas de hongos, al menos 3000 proteínas de hongos, al menos 4000 proteínas de hongos o al menos 5000 proteínas de hongos. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en hongos, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 2000 a 10 000 proteínas de hongos, entre aproximadamente 3000 a 10 000 proteínas de hongos, entre aproximadamente 4000 a 10 000 proteínas de hongos o entre aproximadamente 5000 a 10 000 proteínas de hongos.

En otro aspecto de la divulgación, las casillas de oligopéptidos representan proteínas expresadas en levaduras, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa al menos 2000 proteínas de levaduras, al menos 3000 proteínas de levaduras, al menos 4000 proteínas de levaduras o al menos 5000 proteínas de levaduras. En algunos modos de realización, las casillas de oligopéptidos representan

proteínas expresadas en levaduras, en las que las casillas de oligopéptidos se presentan en un patrón de aglutinación en placa que representa entre aproximadamente 2000 a 10 000 proteínas de levaduras, entre aproximadamente 3000 a 10 000 proteínas de levaduras, entre aproximadamente 4000 a 10 000 proteínas de levaduras o entre aproximadamente 5000 a 10 000 proteínas de levaduras.

5 La presente invención también se refiere a un procedimiento para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos como se define en las reivindicaciones y como se describe adicionalmente en los párrafos previos. En varios modos de realización, el solapamiento de cada casilla de oligopéptidos con otra casilla es exactamente de 9 aminoácidos en micromatrices producidas de acuerdo con el procedimiento de la invención.

10 La presente divulgación de la invención se refiere adicionalmente al uso de una micromatriz de oligopéptidos para el análisis serológico. En algunos casos, una micromatriz descrita en el presente documento se usa para el análisis de una respuesta serológica a un estímulo externo. En otro modo de realización, una micromatriz descrita en el presente documento se usa para detectar una reacción autoinmunitaria.

15 Un aspecto de la presente divulgación es una micromatriz de oligopéptidos que comprende al menos 50 000 casillas por cm^2 , caracterizada por que las casillas representan al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % del proteoma de un proteoma diana, en el que la diana se selecciona entre un virus o un organismo. En un modo de realización, la micromatriz comprende casillas de oligopéptidos que representan el proteoma humano, en la que las casillas de oligopéptidos representan al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o un 100 % del proteoma humano.

20 Otro aspecto de la presente divulgación son micromatrices con alta densidad que tienen numerosas casillas en un área compacta. Los modos de realización de las presentes micromatrices pueden tener una variedad de densidades de casillas de oligopéptidos. Por ejemplo, las micromatrices de la presente divulgación comprenden al menos 10 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , al menos 50 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , al menos 100 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , al menos 200 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , al menos 300 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , al menos 400 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , al menos 500 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 o al menos 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 . Adicionalmente, determinados modos de realización de micromatrices tienen una densidad de casillas en una variedad de intervalos de densidades de casillas. Por ejemplo, la densidad puede comprender un intervalo de 10 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , 50 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 100 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 200 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 300 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 400 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 500 000 a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 10 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 50 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 100 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 , de 200 000 a 500 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 o cualquier intervalo encontrado en un nivel inferior a 10 000 y un nivel superior a 1 000 000 casillas de oligopéptidos/ cm^2 .

25 En un modo de realización, la micromatriz tiene una densidad de al menos 10 000 casillas de oligopéptidos por cm^2 y, en algunos casos, de al menos 50 000 casillas de oligopéptidos por cm^2 . Aplicada al área de una micromatriz, una única micromatriz de tamaño 75 x 25 mm puede contener al menos 385 000 casillas de oligopéptidos únicos, al menos 720 000 casillas de oligopéptidos únicos o al menos 2,1 millones de casillas de oligopéptidos únicos.

30 En otro modo de realización, los oligopéptidos de cada casilla pueden tener básicamente cualquier longitud en la matriz. En algunos casos, los oligopéptidos tienen una longitud de entre 2 y 50 residuos de aminoácido. En algunos casos, los oligopéptidos pueden tener una longitud de entre 5 y 25 residuos de aminoácido o entre 9 y 18 residuos de aminoácido.

35 En otro modo de realización, sustancialmente todos los oligopéptidos tienen la misma longitud. En algunos casos, sustancialmente todos los oligopéptidos tienen una longitud de entre 2 y 50 residuos de aminoácido, una longitud de entre 5 y 25 residuos de aminoácido, una longitud de entre 10 y 15 residuos de aminoácido y, en determinados modos de realización, tienen una longitud de 12 residuos de aminoácido.

40 En otro modo de realización más, la secuencia de cada casilla tiene un solapamiento de al menos 3, al menos 6 y/o al menos 9 residuos de aminoácido contiguos con la secuencia de aminoácidos de al menos otra casilla. En un modo de realización, la secuencia de cada casilla tiene un solapamiento de n-1 con al menos otra casilla, en la que n es igual a la longitud del oligopéptido de al menos otra casilla.

45 En la presente invención, las secuencias de proteínas que representan todo el proteoma o bien dianas de enfermedades autoinmunitarias específicas se aglutinan en placa en la micromatriz de oligopéptidos de acuerdo con la invención y se realiza un ensayo de unión a anticuerpos usando sueros humanos. A continuación, los anticuerpos secundarios marcados de manera fluorescente se pueden unir a la micromatriz de oligopéptidos para detectar a qué oligopéptidos de la micromatriz se han unido los anticuerpos de los sueros. Un experto en la técnica apreciará que también están disponibles otros procedimientos para la detección de la unión, tal como (pero no se limita al) el marcaje directo del anticuerpo de unión. Los procedimientos de marcaje directo son particularmente adecuados cuando la presente invención se usa para investigar la unión de anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, se entiende que el

uso de la presente invención no está necesariamente limitado a anticuerpos, sino que se puede aplicar a fragmentos de anticuerpo u otros compañeros de unión que se dirigen específicamente a una proteína o péptido.

Los oligopéptidos se pueden aglutinar en placa para las secuencias de proteínas de diversas maneras, dependiendo de la plataforma de la matriz y del número de dianas proteicas. Como ejemplos, para un diseño de proteoma total que utilice la plataforma 2,1 M, se pueden usar oligopéptidos 12-méricos en un tramo de 3 aminoácidos o péptidos 16-méricos en un tramo de 6 aminoácidos. Los primeros permiten la caracterización de todos los epítomos 9-méricos del proteoma y los últimos permiten la caracterización de todos los epítomos 10-méricos.

Para la presente invención, la construcción de la micromatriz de oligopéptidos implica la obtención de las secuencias de proteínas que representan el proteoma de un virus o un organismo, por ejemplo, el proteoma humano. La respectiva información a menudo está disponible públicamente. Los péptidos se producen a partir de las secuencias de proteínas capturando subcadenas de la secuencia de proteínas. Las subcadenas tienen una longitud de 12 a 16 aminoácidos y se seleccionan con una separación de 3 a 6 aminoácidos, lo que ilustra el concepto de aglutinación en placa de la presente invención. Se usa un algoritmo de compresión simple, idéntico al usado para la síntesis de ADN, para descartar, o bien truncar, secuencias de péptidos que llevaría demasiado tiempo producir. Las secuencias de péptidos se disponen en un diseño en matrices usando un programa informático, tal como el programa informático ArrayScribe, y se producen archivos de máscara para la unidad 3P MAS usando un script Perl personalizado análogo al procedimiento usado para producir máscaras de matrices de ADN. Las matrices se sintetizan en una unidad MAS y se procesan de manera idéntica a otras matrices de péptidos. La unión se puede llevar a cabo usando mezcladores y siguiendo protocolos conocidos por el experto en la técnica. La detección de la señal por medio de anticuerpos secundarios marcados de manera fluorescente se hace por medio de procedimientos conocidos por el experto en la técnica. El barrido y la cuantificación de las imágenes se pueden realizar usando el dispositivo de barrido MS200 y el programa informático NimbleScan.

La Figura 2 proporciona un ejemplo del concepto de aglutinación en placa utilizado en determinados modos de realización de la presente invención. Cada línea superior de las Figs. 2A-2C muestra la secuencia de la proteína PAPOLA desde el aminoácido 620 al aminoácido 649 (la "secuencia PAPOLA"). En la Figura 2A se ilustra un conjunto de 4 casillas de sondas debajo de la secuencia PAPOLA que incorpora un conjunto de oligopéptidos 12-méricos, en el que las sondas de cada casilla difieren en un aminoácido (una matriz 1x12). De esta manera, un conjunto de casillas de sondas configuradas como una matriz 1x12 tiene un solapamiento de 11 aminoácidos entre una casilla particular y al menos otra casilla. En la Fig. 2B se ilustra un modo de realización de aglutinación en placa alternativo. De nuevo, la línea superior muestra la secuencia PAPOLA; sin embargo, la disposición de aglutinación en placa de las 4 casillas de sondas ilustradas está diseñada de modo que cada casilla tenga sondas 12-méricas que difieran en 3 aminoácidos (una matriz 3x12). De esta manera, un conjunto de casillas de sondas configuradas como una matriz 3x12 tiene un solapamiento de 9 aminoácidos entre una casilla particular y al menos otra casilla. En la Fig. 2C se ilustra otro modo de realización en el que las casillas de sondas son de nuevo 12-méricas, pero el "tramo" entre las casillas es de 6 aminoácidos (una matriz 6x12). En dicha matriz, un conjunto de casillas de sondas configuradas como una matriz 6x12 tiene un solapamiento de 6 aminoácidos entre una casilla particular y al menos otra casilla.

Otro aspecto de la presente divulgación es un procedimiento para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos como se describe anteriormente. En un modo de realización, se usa un procedimiento en el que el solapamiento de cada casilla en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de otra casilla es de entre 2 y 40 residuos de aminoácido, entre 5 y 20 aminoácidos, entre 8 y 15 aminoácidos o, en algunos casos, exactamente de 9 aminoácidos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para usar micromatrices de oligopéptidos. Por ejemplo, las micromatrices de la presente invención son útiles en la detección de anticuerpos relacionados con enfermedades autoinmunitarias. Una micromatriz como se describe anteriormente se puede usar para cualquier análisis de tejido o líquido corporal adecuado, preferentemente para análisis serológico. Un modo de realización es el uso de una micromatriz de oligopéptidos como se describe anteriormente para el análisis de una respuesta serológica a estímulos internos o externos, preferentemente estímulos externos. Otro modo de realización es el uso de una micromatriz de oligopéptidos como se describe anteriormente para detectar una reacción autoinmunitaria. En algunos casos, una micromatriz de oligopéptidos se puede usar para caracterizar la capacidad de unión a antígenos de un antisuero, un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo. Por ejemplo, una micromatriz se puede usar para caracterizar la capacidad de unión a antígenos de un anticuerpo monoclonal o un antisuero policlonal.

Los aminoácidos protegidos con NPPOC se sintetizaron añadiendo el respectivo aminoácido a una solución de Na_2CO_3 en H_2O . A esta solución se añadió posteriormente tetrahidrofurano (THF). Luego, se añadió una solución de 2-nitrofenil-2-propan-1-ol (NPPOC-Cl) en THF. Se eliminó el THF en un evaporador rotatorio a vacío y se extrajo el residuo. El residuo se acidificó y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos se lavaron con H_2O y se evaporaron a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en diclorometano y se purificó mediante cromatografía en columna.

La micromatriz de acuerdo con la divulgación se puede sintetizar de acuerdo con las siguientes etapas:

- a) proporcionar un soporte sólido de plástico
- b) acoplar al soporte sólido de plástico un aminoácido que esté protegido en su grupo amino con NPPOC o un derivado

del mismo

- c) proteger opcionalmente los aminoácidos sin reaccionar
- d) lavar opcionalmente el soporte sólido de plástico
- e) desproteger el aminoácido mediante fotoirradiación a 350 a 410 nm
- f) repetir las etapas b) a e) durante un número predeterminado de veces.

De forma alternativa, la micromatriz de acuerdo con la divulgación se puede sintetizar de acuerdo con las siguientes etapas:

- a) proporcionar un soporte sólido de plástico, teniendo el soporte sólido una amina primaria o secundaria acoplada a la superficie
- b) acoplar al soporte sólido de plástico un aminoácido que esté protegido en su grupo amino con NPPOC o un derivado del mismo
- c) proteger opcionalmente los sitios que no se han acoplado al derivado de aminoácido de la etapa previa
- d) lavar opcionalmente el soporte sólido de plástico
- e) desproteger selectivamente el aminoácido mediante fotoirradiación a 350 a 410 nm, proporcionándose la selección mediante una máscara o un dispositivo libre de máscaras, preferentemente en un disolvente orgánico polar, lo más preferentemente que contenga una molécula secuestrante para que reaccione con los productos secundarios de esta etapa de desprotección
- f) repetir las etapas b) a e) durante un número predeterminado de veces.

De forma alternativa, la micromatriz de acuerdo con la divulgación se puede sintetizar de acuerdo con las siguientes etapas:

- a) proporcionar un soporte sólido de plástico, teniendo el soporte sólido una amina primaria o secundaria acoplada a la superficie
- b) acoplar al soporte sólido de plástico un aminoácido que esté protegido en su grupo amino con NPPOC o un derivado del mismo, formando un enlace peptídico al soporte sólido
- c) proteger opcionalmente los sitios que no se han acoplado al derivado de aminoácido de la etapa previa
- d) lavar opcionalmente el soporte sólido
- e) desproteger selectivamente el aminoácido mediante fotoirradiación a 350 a 410 nm, proporcionándose esta selección mediante una máscara o un dispositivo libre de máscaras, preferentemente en un disolvente orgánico polar, lo más preferentemente que contenga una molécula secuestrante para que reaccione con los productos secundarios de esta etapa de desprotección
- f) repetir las etapas b) a e) durante un número predeterminado de veces
- g) desproteger todos los "grupos de protección permanentes" localizados en las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, lisina(e-amino-BOC)-
- h) tratar opcionalmente la micromatriz de péptidos con un agente reductor a fin de revertir el daño oxidativo que se produce en el azufre de cisteína o metionina.

El soporte de la micromatriz puede estar hecho de cualquier material conocido por el experto en la técnica usado para la síntesis de una micromatriz, preferentemente el soporte está hecho de plástico, vidrio, carbono sobre vidrio, metal sobre vidrio, plástico sobre vidrio. Preferentemente, se usa plástico como soporte. Lo más preferente es un soporte sólido de plástico. Más preferentemente, el soporte comprende una capa superficial y un cuerpo, en el que el cuerpo consiste en poliolefina. Es más preferente que la superficie del soporte comprenda grupos amino reactivos. Más preferentemente, se acopla ácido ϵ -aminohexanoico a la superficie del soporte. El soporte se puede proporcionar en cualquier forma, tal como microesferas, geles, placas, membranas, portaobjetos o preferentemente chips. Los residuos de aminoácido del extremo C terminal se pueden unir a la superficie del soporte, preferentemente un soporte sólido de plástico, por medio de enlaces peptídicos. Los aminoácidos del extremo C terminal de los oligopéptidos se pueden acoplar a la superficie del soporte, preferentemente un soporte sólido de plástico, con ácido ϵ -aminohexanoico.

La superficie del soporte puede comprender grupos funcionales capaces de formar enlaces, tales como enlaces peptídicos. Preferentemente, la superficie del soporte se puede recubrir con un compuesto respectivo que, entonces, proporcione los grupos funcionales capaces de formar los enlaces. El soporte se puede recubrir con ácido ϵ -aminohexanoico o con ácido ϵ -aminohexanoico que se acopla a la superficie del soporte.

El primer aminoácido, que se acopla al soporte, y los siguientes aminoácidos acoplados al mismo, se protegen mediante cualquier grupo protector capaz de prevenir que el grupo funcional potencialmente reactivo del aminoácido reaccione en determinadas condiciones de reacción. Los grupos protectores preferentes son o-nitro-benziloxi-carbonilo (NBOC), o-nitrofenil-etoxicarbonilo (NPEOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-propiloxi-carbonilo (MeNPPOC), 2-(3,4-metilendioxi-2-nitrofenil)-oxicarbonilo (MeNPOC), dimetoxi-benzo-inilil-oxicarbonilo (DMBOC), 2-(2-nitrofenil)-etilsulfonilo (NPES) y (2-nitrofenil)-propilsulfonilo (NPPS). Los grupos protectores lo más preferentes son 2-(2-nitrofenil)-propoxicarbonilo (NPPOC) o derivados del mismo. Preferentemente, los grupos protectores usados son NPPOC y/o derivados de NPPOC. Preferentemente, los derivados son 2-(2-nitro-4-benzoil-fenil)-propoxicarbonilo (NPPOC), benzoil-NPPOC.

Para la síntesis de micromatrices de péptidos se puede usar cualquier aminoácido natural o no natural protegido

mediante los grupos protectores mencionados anteriormente. Preferentemente, se usan aminoácidos naturales para la síntesis de micromatrices de oligopéptidos. Los aminoácidos se pueden proteger mediante NPPOC y/o derivados de NPPOC, tal como benzoil-NPPOC. Se usan 16-19 aminoácidos diferentes, tales como histidina, alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, triptófano, cisteína, tirosina, metionina y lisina, que se protegen con NPPOC y/o derivados de NPPOC. Algunos aminoácidos se pueden proteger con benzoil-NPPOC, preferentemente se protege tirosina con benzoil-NPPOC.

Los grupos protectores se unen de manera escindible a grupos funcionales potencialmente reactivos de aminoácidos a fin de prevenir que los grupos funcionales potencialmente reactivos reaccionen de manera incontrolada. Los grupos protectores se unen de manera escindible preferentemente a los aminoácidos mediante una unión covalente. Los grupos protectores se pueden escindir del respectivo grupo funcional de cualquier forma, tal como mediante ácidos, bases, fluoruro, enzimas, reducción u oxidación. Es preferente el uso de grupos protectores fotolábiles que se escindan por completo mediante su exposición a la luz o irradiación, respectivamente.

Para escindir los grupos protectores fotolábiles se puede usar irradiación, lo que abarca el espectro completo de radiación electromagnética. Para escindir el grupo protector fotolábil es preferente el intervalo de la luz desde UV hasta IR, que varía aproximadamente desde 200 nm a 700 nm. La desprotección más preferente se realiza entre 200 nm y 400 nm. La desprotección se puede realizar entre 350 a 410 nm. En algunos casos, la desprotección se puede realizar entre 350 a 375 nm. En otros casos, la desprotección se puede realizar entre 360 a 370 nm o, en algunos casos, a alrededor de 365 nm.

El soporte puede ser transparente o no transparente a la luz en el intervalo de la luz desde UV hasta IR. Preferentemente, el soporte tiene al menos un 50 % de transmisión de la luz, preferentemente un 60 % de transmisión de la luz y más preferentemente un 75 % de transmisión de la luz en el intervalo de la luz desde UV hasta IR. El soporte puede tener al menos un 50 %, al menos un 60 % y al menos un 75 % de transmisión de la luz a longitudes de onda de 350 a 410 nm. En algunos casos, el soporte puede tener al menos un 50 %, al menos un 60 % y al menos un 75 % de transmisión de la luz a longitudes de onda de 350 a 375 nm. En algunos casos, el soporte puede tener al menos un 50 %, al menos un 60 % y al menos un 75 % de transmisión de la luz a longitudes de onda de 360 a 370 nm. En algunos casos, el soporte puede tener al menos un 50 %, al menos un 60 % y al menos un 75 % de transmisión de la luz a longitudes de onda de aproximadamente 365 nm.

La etapa de lavado del soporte entre la etapa de protección y la etapa de desprotección del procedimiento para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos puede ser opcional. Preferentemente, hay una o más etapas de lavado entre la etapa de protección y la etapa de desprotección del procedimiento para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos. El lavado del soporte se realiza mediante un disolvente orgánico polar o una mezcla de disolventes orgánicos.

La síntesis de las micromatrices de oligopéptidos se puede realizar usando técnicas basadas en fotolitografía. Por lo tanto, se usa una máscara fotolitográfica para exponer las respectivas casillas a la luz a fin de desproteger los grupos funcionales, preferentemente los grupos alfa-amino de los péptidos, para acoplar el siguiente aminoácido. Preferentemente, se usa fotolitografía sin máscara para dirigir la luz hacia las respectivas casillas de una micromatriz de oligopéptidos. Para este propósito, la fotolitografía sin máscara usa dispositivos controlables, por ejemplo, dispositivos controlados por ordenador, que tienen elementos direccionables individualmente para dirigir la luz hacia las respectivas casillas. Dichos dispositivos controlables se seleccionan entre, pero no se limitan a, pantallas LCD transmisoras de luz y divisores de haz. Preferentemente se usa un dispositivo digital de microespejos como un dispositivo controlable, que es una colección de elementos de espejo de aluminio direccionables individualmente que se hacen funcionar bajo el control de programas informáticos. Dichos elementos redirigen la luz hacia las respectivas casillas de una micromatriz. Lo más preferente como dispositivo de microespejos es el Digital Light Processor (DLP) de Texas Instruments, Inc.

La fotoirradiación se puede limitar de manera espectral a longitudes de onda de 350 a 410 nm, preferentemente a longitudes de onda de 350 a 375 nm, más preferentemente a longitudes de onda de 360 a 370 nm, mucho más preferentemente a longitudes de onda de 363 a 367 nm y lo más preferente a longitudes de onda de 365 nm.

La resolución espacial al dirigir la luz hacia las respectivas casillas en los microespejos de aluminio direccionables individualmente puede dar lugar a muchas densidades de elección de los oligopéptidos por área de superficie. La micromatriz puede tener una densidad de al menos 10 000 y preferentemente de al menos 50 000 casillas de oligopéptidos por cm². Aplicada al área de una micromatriz, una única micromatriz de tamaño 75 x 25 mm puede contener al menos 385 000 casillas de oligopéptidos únicos, preferentemente al menos 720 000 casillas de oligopéptidos únicos, más preferentemente al menos 2,1 millones de casillas de oligopéptidos únicos.

Los oligopéptidos sintetizados en la micromatriz pueden tener cualquier longitud y pueden contener cualquier número de los mismos o de diferentes residuos de aminoácido. Preferentemente, los oligopéptidos sintetizados en la micromatriz tienen al menos 35 residuos de aminoácido, más preferentemente los oligopéptidos sintetizados en la micromatriz tienen al menos 25 residuos de aminoácido, son preferentes los oligopéptidos sintetizados en la

micromatriz que consisten en de 6 a 24 aminoácidos y preferentemente de 9 a 18 aminoácidos.

La fotoirradiación se puede realizar en presencia de un disolvente orgánico, preferentemente un disolvente orgánico polar. En algunos casos, la fotoirradiación se realiza en presencia de un disolvente orgánico polar o una mezcla de disolventes, seleccionados de un grupo que consiste en, pero no se limita a, dimetilsulfóxido, n-metil-2-pirrolidona, dimetilformamida, acetonitrilo, metanol, etanol y propanol.

La desprotección, especialmente mediante fotoirradiación, se puede realizar en ausencia y en presencia de una base. Las bases adecuadas incluyen sales de carbonato, sales de amonio, fosfatos, sales de tiolato, hidróxidos, hidruros, aminas heterocíclicas, disililamidas, trialkilaminas, aminas bicíclicas, sales de ácidos orgánicos y bases que contienen nitrógeno. La base en la que se realiza la fotoirradiación se puede seleccionar entre hidrazina, hidroxilamina o imidazol. Las más preferentes son las bases débilmente básicas, aunque nucleófilas y débilmente reductoras.

Los procedimientos usados para la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos se diseñan en ciclos repetitivos, que comprenden las etapas básicas de acoplamiento, protección opcional, lavado opcional y desprotección. Durante cada ciclo se acopla otro aminoácido al oligopéptido. Por lo tanto, el número de ciclos viene determinado por la longitud de los oligopéptidos sintetizados. Cada etapa tiene una duración definida dependiente de la velocidad de la reacción química asociada. Un factor limitante en referencia a la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos es la etapa de desprotección junto con la etapa de acoplamiento. Por una parte, la escisión del grupo protector mediante su exposición a la luz depende de parámetros físicos, tales como el pH, la temperatura, el contenido en sales, la intensidad de la luz y las longitudes de onda. Por otra parte, la escisión del grupo protector mediante su exposición a la luz depende de qué aminoácido se use en el respectivo ciclo conjuntamente con qué grupo protector. Por ejemplo, el tiempo de desprotección de la tirosina protegida con NPPOC se incrementa en un factor de 3 a 4 en comparación con los aminoácidos naturales restantes. De esta manera, la tirosina protegida con NPPOC es el principal factor limitante del tiempo de la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos. Por el contrario, el tiempo de desprotección de la tirosina protegida con benzoil-NPPOC está en el mismo nivel que los aminoácidos naturales restantes protegidos con NPPOC. De esta manera, el uso de tirosina protegida con benzoil-NPPOC junto con los 19 aminoácidos naturales restantes protegidos con NPPOC da lugar a la eliminación del principal factor limitante del tiempo de la síntesis de oligopéptidos o micromatrices de oligopéptidos y, de esta manera, a un incremento significativo de la velocidad. Las etapas de acoplamiento de cada ciclo de síntesis pueden ser de menos de 15 minutos, menos de 10 minutos o menos de 5 minutos.

Es esencial tener una alineación activa de la micromatriz y de las casillas de oligopéptidos, respectivamente, con respecto a la parte óptica entre los ciclos de síntesis para garantizar que la exposición a la luz se produzca exclusivamente en las respectivas casillas. Por lo tanto, es necesario ajustar con exactitud la posición de la micromatriz de oligopéptidos durante una duración de más de 36 horas en una misma posición con una tolerancia de aproximadamente 1 μm . Para lograr este objetivo, tanto la matriz de oligopéptidos como la matriz de microespejos se alinean activamente mediante un sistema de control. El posicionamiento de los haces de fotoirradiación sobre el soporte se puede controlar y ajustar a lo largo del tiempo. En algunos casos, el posicionamiento de los haces de fotoirradiación sobre el soporte se puede controlar y ajustar antes de al menos cada 4^a irradiación (etapa de desprotección) o, en algunos casos, antes de cada irradiación.

El soporte puede estar hecho de cualquier material conocido por el experto en la técnica usado para la síntesis de una micromatriz de oligopéptidos, preferentemente el soporte está hecho de plástico, vidrio, carbono sobre vidrio, metal sobre vidrio o plástico sobre vidrio. Preferentemente, se usa plástico como soporte. Lo más preferente es un soporte sólido de plástico. El ajuste se puede realizar por medio del ajuste de la posición del soporte sólido de plástico.

La micromatriz se puede localizar sobre un soporte, preferentemente un soporte sólido de plástico, que comprenda al menos 10 000 y preferentemente al menos 50 000 casillas de oligopéptidos por cm^2 . Aplicada al área de una micromatriz, una única micromatriz puede contener al menos 385 000 casillas de oligopéptidos únicos, preferentemente al menos 720 000 casillas de oligopéptidos únicos, más preferentemente al menos 2,1 millones de casillas de oligopéptidos únicos.

Los residuos de aminoácido de extremo C terminal de la micromatriz de oligopéptidos se unen de manera covalente a la superficie del soporte, preferentemente un soporte sólido de plástico, por medio de enlaces peptídicos. Los aminoácidos del extremo C terminal de los oligopéptidos también se pueden acoplar a la superficie del soporte, preferentemente un soporte sólido de plástico, con un resto de enlazador de ácido ϵ -aminohexanoico.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1:

Creación del diseño de proteoma de CCDS

La colección de secuencias de proteínas se descargó de la base de datos Consensus Coding Sequence (CCDS) (disponible en ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CdsBrowse.cgi en Internet, archivo CCDS_protein.20090902.faa.gz). Este

conjunto contenía 23 754 secuencias de proteínas, representando un total de 13 405 531 aminoácidos (aa). Se usó un script Perl personalizado para generar oligopéptidos 12-méricos a partir de cada secuencia de proteínas, en un intervalo de 6 aa. El número de ciclos de síntesis necesarios para sintetizar cada oligopéptido se evaluó usando la siguiente secuencia de aminoácidos: A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V. Los oligopéptidos que no se pudieron sintetizar usando 7 repeticiones de la secuencia precedente se truncaron a una longitud mínima de 8 aa. Si aun así no se podían sintetizar con esa longitud mínima, el oligopéptido se descartaba. Para este conjunto de secuencias de proteínas se descartaron 1931 oligopéptidos, consistiendo la mayoría en secuencias largas de aminoácidos únicos. Se descartaron 39 oligopéptidos adicionales, puesto que contenían códigos de aminoácidos no estándar. Después de descartar estos 1970 oligopéptidos, quedó un conjunto de 2 198 610 oligopéptidos. Con estas delecciones de oligopéptidos solo se eliminaron por completo 22 proteínas del conjunto de datos de CCDS.

Se usó el programa informático de disposición de matrices de Roche NimbleGen, ArrayScribe, para distribuir aleatoriamente los oligopéptidos en la plantilla de diseño de matrices. El diseño final de las matrices consistió en tres submatrices con 1050 casillas de ancho x 1400 casillas de alto. Cada casilla medía 13,67 µm de lado. Los oligopéptidos se dispusieron aleatoriamente en forma de tablero de ajedrez en cada submatriz, de tal manera que se pudieron sintetizar un máximo de 735 000 oligopéptidos en cada submatriz. Después de la colocación de los oligopéptidos, se produjo una serie de archivos para dirigir la desprotección mediada por la luz de las casillas individuales para cada ciclo de síntesis de aminoácidos.

20 Ejemplo comparativo 2:

Creación del diseño de proteoma de SwissProt/RefSeq

Se obtuvo un conjunto de secuencias de proteínas de ser humano de UniProt (uniprot.org en Internet), que consistía en 40 035 secuencias de proteínas, representando un total de 23 843 970 aminoácidos. Debido al gran tamaño del contenido, se implementaron diversos conjuntos de filtros para reducir el tamaño del contenido, enriqueciendo los oligopéptidos más informativos. La primera etapa fue enmascarar las secuencias de proteínas en cuanto a las regiones de baja complejidad. Esto se hizo usando la aplicación Segmasker disponible públicamente (v1.0.0 del paquete 2.2.23 de Blast) del NCBI. Se usaron los parámetros por defecto para enmascarar regiones de baja complejidad; se enmascararon un total de 2 258 766 aa. Se usó un script Perl personalizado para generar oligopéptidos 16-méricos a partir de cada secuencia de proteínas, en un intervalo de 6 aa. El número de ciclos de síntesis necesarios para sintetizar cada oligopéptido se evaluó usando la siguiente secuencia de aminoácidos: A, R, N, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V. Los oligopéptidos que no se pudieron sintetizar usando 10 repeticiones de la secuencia precedente se truncaron a una longitud mínima de 10 aa. Si aun así no se podían sintetizar con esa longitud mínima, el oligopéptido se descartaba. Para este conjunto de secuencias de proteínas solo se descartaron 5 oligopéptidos por su consideración de longitud, debido a que la secuencia de proteínas total era inferior a 10 aminoácidos. Se descartaron un total de 641 066 oligopéptidos debido al enmascaramiento de baja complejidad. Se descartaron 761 oligopéptidos adicionales, puesto que contenían códigos de aminoácidos no estándar. Después de descartar estos 641 832 oligopéptidos, quedó un conjunto de 3 288 695 oligopéptidos. Con estas delecciones de oligopéptidos solo se eliminaron por completo 85 proteínas del conjunto de datos de CCDS. Este conjunto de oligopéptidos contenía 1 462 415 oligopéptidos únicos y 684 075 oligopéptidos compartidos por dos o más proteínas. Estas secuencias de oligopéptidos compartidos se colocaron solo una vez en la matriz y se generó un código de correspondencia para indicar las posiciones e identificadores de secuencias originales para el posterior análisis de datos.

Se usó el programa informático de disposición de matrices de Roche NimbleGen, ArrayScribe, para distribuir aleatoriamente los 2 146 490 oligopéptidos finales en la plantilla de diseño de matrices. El diseño final de las matrices consistió en tres submatrices con 1050 casillas de ancho x 1400 casillas de alto. Cada casilla medía 13,67 µm de lado. Los oligopéptidos se dispusieron aleatoriamente en forma de tablero de ajedrez en cada submatriz, de tal manera que se pudieron sintetizar un máximo de 735 000 oligopéptidos en cada submatriz. Después de la colocación de los oligopéptidos, se produjo una serie de archivos para dirigir la desprotección mediada por la luz de las casillas individuales para cada ciclo de síntesis de aminoácidos.

55 Ejemplo comparativo 3:

Síntesis, unión y análisis de matrices de proteoma de CCDS

Las matrices se sintetizaron en portaobjetos HTA 3D amino de Greiner Bio One. En resumen, se suministraron 400 µl de un aminoácido (diluido a 60 mM en dimetilformamida (DMF)) en un recipiente de reacción y se activaron con 200 µl de activador (60 mmol de HBTU, 60 mmol de HOBt en DMF) y 200 µl de base (DIPEA 0,27 M en DMF). La mezcla se mezcló por medio de burbujeo de aire. La activación continuó durante 5 minutos. Toda la mezcla de aminoácidos activados se incorporó al portaobjetos en la cubeta de flujo y se dejó que se acoplara durante 1 minuto. Después del acoplamiento, la matriz se lavó con 3000 µl de 1-metil-2-pirrolidinona (NMP), antes de hacer fluir 1000 µl de disolvente de exposición (hidroxilamina al 0,01 % en NMP) para lavar y cubrir la superficie de matriz activa. A continuación, las casillas se desprotegeron eliminando el grupo protector NPOC del extremo amino del aminoácido unido. La desprotección se produjo en el disolvente de exposición (véase anteriormente) a través del suministro de luz UV a

365 nm desde una lámpara de mercurio-xenón a una potencia aproximada de 161 mw/cm² durante 60 segundos. El acoplamiento inicial de un enlazador de ácido 6-hexanoico como anteriormente estuvo seguida por un acoplamiento secuencial de 143 péptidos y de etapas de fotodesprotección dirigida para construir las secuencias de péptidos deseadas. Cada péptido tenía un residuo de serina adicional en cada extremo a fin de mejorar la hidrofilia del péptido unido al soporte y de posibilitar el acceso fácil de los anticuerpos.

Después de completar la síntesis, las matrices se lavaron en 3000 µl de MeOH y se secaron con argón. La eliminación de la cadena lateral peptídica se realizó mediante inmersión en una solución de TFA al 95 %/H₂O al 4,5 %/trisisopropilsilano al 0,5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las matrices se lavaron dos veces en cantidades copiosas de MeOH, se enjuagaron con H₂O y se secaron con un chorro de argón.

La unión de las matrices se efectuó lavando las matrices en 1x TBSTT (Tween-20 al 0,055 % y Tritón X-100 al 0,22 %) durante 2 minutos, seguido de lavado en 1x TBS durante 2 minutos. Después de los lavados, las matrices se incubaron durante la noche (~16 horas) en solución de unión (22,5 µl de 1x TBS, 18 µl de DiH₂O, 4,5 µl de caseína soluble en álcali al 5 %) con una dilución final de 1:15 000 de anti-AD A policlonal producido en conejo (Sigma-Aldrich HPA001399 0,19 mg/ml), anti-PAPOLA policlonal producido en conejo (Sigma-Aldrich HPA001788, 0,05 mg/ml) y anti-poli-histidina monoclonal (Sigma-Aldrich H1029, 0,25 mg/ml) producido en ratón. La incubación se produjo a temperatura ambiente con mezclado por medio de un sistema de hibridación de Roche NimbleGen.

Después de su eliminación de la incubación primaria, las matrices se lavaron dos veces con 1x TBSTT durante 2 minutos cada una y una vez con 1x TBS durante 2 minutos. A continuación, las matrices se colocaron en un vaso de tinción de plástico opaco que contenía 75 ml de solución de unión (véase anteriormente) que contenía una dilución final de 1:10 000 de anticuerpo secundario de asno anti-IgG de conejo marcado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch 711-165-152, 1,5 mg/ml) para la detección de ADA y PAPOLA unidas y un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón marcado con Cy3 en una dilución de 1:10 000 (Invitrogen A10521, 2 mg/ml). La incubación se produjo con agitación suave a temperatura ambiente durante 3 horas.

Después de la unión secundaria, las matrices se lavaron dos veces durante 2 minutos con 1x TBSTT, se enjuagaron con DiH₂O y se secaron con una corriente de argón.

Las matrices se sometieron a barrido usando un dispositivo de barrido MS200 de Roche NimbleGen, en el canal de 532 nm a una resolución de 2 µm. Las imágenes se analizaron usando NimbleScan, se representaron las intensidades en bruto de las casillas frente a la posición de la proteína usando el programa informático SignalMap de Roche NimbleGen.

Ejemplo comparativo 4:

Unión de antiseros policlonales anti-PAPOLA a matrices de oligopéptidos

Las matrices de péptidos seleccionadas como diana se diseñaron utilizando una estrategia de aglutinación en placa y programas informáticos similares a los descritos en el Ejemplo 1 y se sintetizaron de forma similar a como se detalla en el Ejemplo 3. Las matrices seleccionadas como diana se diseñaron a partir de una población diana de 52 proteínas, incluyendo la secuencia de la proteína PAPOLA total y un subconjunto de antígenos (el "diseño PA52"), aglutinadas en placa a una única resolución de aminoácido (es decir, un "tramo" de 1 aminoácido). Los experimentos de unión que usan anticuerpos policlonales anti-PAPOLA derivados de ATLAS (Sigma-Aldrich) para la unión a anticuerpos primarios se realizaron como se describe en el Ejemplo 3 anterior. La unión a anticuerpos secundarios se realizó usando un anticuerpo secundario de asno anti-IgG de conejo marcado con Cy3 para la detección de anticuerpos PAPOLA unidos.

La Figura 3A muestra la fluorescencia detectada usando una micromatriz con diseño PA52 para un subconjunto diana de la proteína PAPOLA que comprende aproximadamente 140 aminoácidos, aglutinados en placa a una única resolución de aminoácido (1x10 de aglutinación en placa). Este experimento de unión dio como resultado la identificación de tres epítomos potenciales:

- NSSGSSQGRNSPAPAVTA (9 casillas, posiciones 38-46)
- NAATKIPTPIVGV (4 casillas, posiciones 126-129)
- Posiblemente un tercer epítomo en ATQPAISPPPKP (3 casillas, posiciones 88-90).

La Figura 3B muestra una representación de la misma matriz (diseño PA52), que representa la proteína PAPOLA de longitud total (aproximadamente 730 aminoácidos), aglutinada en placa a una única resolución de aminoácido. Cuando se examinan los datos a este nivel, se identifican de nuevo tres epítomos potenciales:

- NSSGSSQGRNSPAPAVTA (9 casillas, posiciones 548-556)
- NAATKIPTPIVGVK (4 casillas, posiciones 637-640)
- Posiblemente un tercer epítomo en ATQPAISPPPKP (3 casillas, posiciones 599-601)

La Figura 3C muestra un ejemplo de unión de anti-PAPOLA policlonal a la diana de PAPOLA en una micromatriz de "proteoma completo" de CCDS diseñada y sintetizada de forma similar al Ejemplo 1 y Ejemplo 3 anteriores. Esta micromatriz de oligopéptidos es un diseño 6x12 (es decir, oligopéptidos 12-méricos con un solapamiento o "tramo"

6-mérico). Los epítomos identificados a partir de este experimento son:

- LNSSGSSQGRNSPAPAVT (2 casillas, posiciones 547 y 553)
- NAATKIPTPIVG (posición 637)
- Posiblemente un tercer epítomo en QPAISPPPKP (posición 601).

5

Los resultados de los tres barridos ejemplificados en las Figuras 3A-C se encuentran en la Tabla 1:

Tabla 1.

	Epítomo	Epítomo	Epítomo
PA52 sub 1aa_aglutinación en placa	NSSGSSQGRNSPAPAVTA	NAATKIPTPIGV	ATQPAISPPPKP
PA52 total 1aa_aglutinación en placa	NSSGSSQGRNSPAPAVTA	NAATKIPTPIGVK	ATQPAISPPPKP
proteoma CCDS 6aa_aglutinación en placa	LNSSGSSQGRNSPAPAVT	NAATKIPTPIVG	QPAISPPPKP

10 A partir de esto, se puede discernir que el diseño de proteoma total de la presente invención, usando un diseño de aglutinación en placa 6x12, puede detectar esencialmente los mismos epítomos potenciales para la unión de anti-PAPOLA que los demostrados mediante matrices con un contenido significativamente más bajo y una resolución de aminoácido mucho mayor. Esta utilidad de una matriz de proteoma total proporciona una oportunidad sin precedentes para cribar un proteoma esencialmente completo en cuanto a la unión a anticuerpos y permite la determinación de los epítomos frente a los que se une un anticuerpo. Adicionalmente, esto proporciona una

15 oportunidad de determinar si un anticuerpo particular presenta una alta reactividad cruzada por un gran número de epítomos en todo el proteoma o si la reactividad del anticuerpo está confinada más específicamente a los epítomos o dianas esperados.

20 **Ejemplo comparativo 5:**

Síntesis de las secuencias de antígenos de 52 anticuerpos seleccionados

Se seleccionaron 52 anticuerpos de la base de datos Human Protein Atlas (proteinatlas.org en Internet). Las respectivas secuencias de antígenos se sintetizaron de acuerdo con el Ejemplo 3 en 164 ciclos de síntesis sucesivos como péptidos 10-méricos con un solapamiento de 9 aminoácidos. En algunos casos, el solapamiento fue menor, pero ninguno fue inferior a 6 aminoácidos. Las matrices de oligopéptidos desprotegidos se incubaron con mezclas de anticuerpos a los factores de dilución de acuerdo con la recomendación de la ficha de datos para el análisis de inmunoelectrotransferencia en el tampón recomendado por el fabricante y sus epítomos de unión se determinaron como las señales de intensidad más alta tras el marcaje fluorescente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (véase Fig. 4). En algunos casos, las matrices se lavaron con un tampón que contenía SDS al 0,1 % a fin de eliminar los anticuerpos unidos de forma no específica.

35 **Ejemplo comparativo 6:**

Valoración de sensibilidad de anti-PAPOLA en tampón

Una matriz de péptidos fabricada de forma similar a como se describe en el Ejemplo 1 y Ejemplo 3 anteriores se incubó con diluciones escalonadas del anticuerpo anti-PAPOLA (poliA polimerasa alfa, HPA001788), desde 1:10 000 hasta 1:240 000, en subconjuntos discretos formados por un conjunto de cámaras de muestras 12-plex de Roche NimbleGen. La tinción y el lavado se realizaron como se describe anteriormente. La Figura 6 representa los resultados de unión para diversas diluciones del anticuerpo, centrándose en las posiciones de aminoácidos 126-129 de la secuencia de antígenos para PAPOLA. Como se representa en la Fig. 5, los datos brutos después del barrido fluorescente con un dispositivo de barrido de micromatrices MS 200 de Roche NimbleGen revelaron los epítomos claramente visibles incluso a la dilución más alta, en comparación con una concentración de anticuerpos de aproximadamente 200 pg/ml, con una relación señal-ruido relativa de 4:1.

45 **Ejemplo comparativo 7:**

Unión a matrices de oligopéptidos con una muestra de suero

50 Una población de IgG aislada de una muestra de suero de cáncer colorrectal se unió a una matriz de oligopéptidos que contenía aproximadamente 40 .000 casillas de oligopéptidos 12-méricos con un solapamiento 11-mérico. La muestra

de suero procedía de un banco de suero que contenía sueros clínicamente caracterizados para diferentes enfermedades. Las muestras de enfermos de cáncer se cribaron con un ensayo anti-p53 para sueros con valores altos. La IgG se aisló a partir de un suero con valores altos mediante procedimientos estándar. Una dilución (10 µg/ml) de esta preparación se usó para los estudios de unión. La incubación de la matriz con la muestra se realizó durante la

5 noche en un mezclador Maui/XI a temperatura ambiente. Después de la incubación, la matriz se lavó con TBSTT, TBST/TBS y H₂O durante dos minutos cada uno. La tinción de anticuerpos secundarios se realizó usando un tinte marcado con Cy3 anti-IgG humana de cabra (Jackson ImmunoResearch) (1:12 500) durante 3 horas. La matriz se lavó con TBSTT, TBST/TBS y H₂O durante dos minutos cada uno, se secó y se sometió a barrido en un dispositivo de barrido MS200.

10 La Fig. 6 muestra los datos generados por este barrido. Los datos muestran una unión intensa a los péptidos que representan la proteína P-53, un antígeno conocido en la autoinmunidad del cáncer. Esta representación de datos también sugiere que hay acontecimientos de unión múltiple de muchos autoanticuerpos en un único paciente. En la Fig. 6, los oligopéptidos que están en las posiciones de aglutinación en placa 10-40 (aproximadamente) son péptidos que representan un antígeno conocido. En las pruebas de ELISA, la muestra usada en la Fig. 6 dio positivo frente a ese antígeno específico; sin embargo, la Fig. 6 demuestra acontecimientos de unión significativos en otros loci de la proteína P-53. De hecho, los demás loci en esta muestra de pacientes muestran una unión de intensidad significativamente más alta que la unión del sitio antigénico conocido.

20 En la práctica actual, un paciente que ya muestre signos de enfermedad (por ejemplo, un paciente que se sospecha que tiene cáncer) puede mostrar autoinmunidad a determinados antígenos conocidos, lo que confirma el diagnóstico de cáncer. Sin embargo, si la prueba de autoinmunidad actualmente conocida arroja un resultado negativo, el médico todavía no está bien informado, puesto que los anticuerpos de autoinmunidad pueden no ser altamente reactivos con respecto a los antígenos conocidos (usados actualmente). Los anticuerpos autoinmunitarios se pueden encontrar en

25 enfermos de cáncer prácticamente todo el tiempo en un estadio en el que el enfermo ya presenta signos clínicos de la enfermedad; sin embargo, las pruebas actuales pueden no ser tan completas para el diagnóstico o la detección temprana como una herramienta que proporcione una mirada más amplia a los acontecimientos de unión, tal como la presente invención. Estos datos demuestran que la observación de las “huellas genéticas” de los anticuerpos autoinmunitarios en un espectro más amplio de sitios antigénicos potenciales puede mejorar el valor pronóstico de las

30 pruebas de autoinmunidad.

Ejemplo comparativo 8:

Ensayo de unión en suero usando una matriz de proteoma de péptidos

35 Este procedimiento es idéntico al procedimiento del Ejemplo 3, con las siguientes excepciones:

1. Los anticuerpos anti-AD A, PAPOLA y poli-histidina se reemplazan por una dilución 1:20 de muestra de suero.
2. La unión secundaria se realiza con un anticuerpo secundario apropiado (es decir, específico de la especie).
3. Los lavados después de la unión secundaria incluyen un lavado con SDS al 0,2 % durante 2 horas o más.

40 Las matrices de diseño especificado (proteoma de CCDS, proteoma de RefSeq, proteoma de SwissProt) se sintetizaron y desprotegeron de sus grupos laterales como anteriormente.

45 La unión de las matrices se efectuó lavando las matrices en 1x TBSTT (Tween-20 al 0,055 % y Tritón X-100 al 0,22 %) durante 2 minutos, seguido de lavado en 1x TBS durante 2 minutos. Después de los lavados, las matrices se incubaron durante la noche (~16 horas) en solución de unión (22,5 µl de 1x TBS, 18 µl de DiH₂O, 4,5 µl de caseína soluble en álcali al 5 %) con una dilución final de 1:20 de muestra de suero. La incubación se produjo a temperatura ambiente con mezclado por medio de un sistema de hibridación Roche NimbleGen.

50 Después de su eliminación de la incubación primaria, las matrices se lavaron dos veces con 1x TBSTT durante 2 minutos cada una y una vez con 1x TBS durante 2 minutos. Entonces, las matrices se colocaron en un vaso de tinción de plástico opaco que contiene 75 ml de solución de unión (véase anteriormente) que contiene una dilución final de 1:10 000 de anticuerpo secundario apropiado, específico de la especie y marcado de manera fluorescente. La incubación se produjo con agitación suave a temperatura ambiente durante 3 horas.

55 Después de la unión secundaria, las matrices se lavaron dos veces durante 2 minutos con 1x TBSTT. Entonces, las matrices se sometieron a lavado riguroso con SDS al 0,2 % durante 2 horas con agitación suave, antes del enjuague final con DiH₂O y secado con argón.

60 Las matrices se sometieron a barrido usando un dispositivo de barrido MS200 de Roche NimbleGen, en el canal apropiado (por ejemplo, 532 nm, 635 nm) a una resolución de 2 µm. Las imágenes se analizaron usando NimbleScan, se representaron las intensidades en bruto de las casillas frente a la posición de la proteína usando SignalMap.

Ejemplo comparativo 9:

Unión de antisueros policlonales anti-ADA a matrices de oligopéptidos

Las matrices de péptidos seleccionadas como diana se diseñaron utilizando una estrategia de aglutinación en placa y programas informáticos similares a los descritos en el Ejemplo 1, se sintetizaron y se realizaron experimentos de unión como se describe en el Ejemplo 3. Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran los resultados de los experimentos de unión usando anticuerpos policlonales anti-ADA derivados de ATLAS (Sigma-Aldrich) para la unión a anticuerpos primarios como se describe en el Ejemplo 3 anterior. La unión a anticuerpos secundarios se realizó usando un anticuerpo secundario de asno anti-IgG de conejo marcado con Cy3 para la detección de anticuerpos ADA unidos.

La Figura 7A muestra la fluorescencia detectada usando una micromatriz con diseño PA52 para un subconjunto diana de la proteína ADA que comprende aproximadamente 140 aminoácidos, aglutinados en placa a una única resolución de aminoácido (1x10 de aglutinación en placa). Este experimento de unión dio como resultado la identificación de dos epítomos potenciales:

- SLLPGHVQAYQEAV (5 casillas, posiciones 9-13)
- HTLEDQALYNRLQEN (6 casillas, posiciones 58-63)

La Figura 7B muestra una representación de la misma matriz (diseño PA52), que representa la proteína ADA de longitud total, aglutinada en placa a una única resolución de aminoácido. Cuando se examinan los datos a este nivel, se identifican de nuevo dos epítomos potenciales:

- SLLPGHVQAYQEAV (5 casillas, posiciones 192-196)
- HTLEDQALYNRL (4 casillas, posiciones 241-243)

La Figura 7C muestra un ejemplo de unión de anti-ADA policlonal a la diana de ADA en una micromatriz de "proteoma completo" de CCDS diseñada y sintetizada de forma similar al Ejemplo 1 y Ejemplo 3 anteriores. Esta micromatriz de oligopéptidos es un diseño 6x12 (es decir, oligopéptidos 12-méricos con un solapamiento o "tramo" 6-mérico). El epítomo identificado a partir de este experimento es:

- LLPGHVQAYQEA (1 casilla, posición 193)

La unión a epítomo esperada en aproximadamente la posición 241 faltaba en el experimento de unión al proteoma total; sin embargo, esto se explicó fácilmente por el hecho de que las casillas en y alrededor de la posición 241 estaban ocluidas por una marca del logotipo del portaobjetos que indicaba el fabricante del portaobjetos. La casilla que se esperaba que mostrara un máximo en la posición 241 mostró, en su lugar, una disminución real por debajo de los niveles de fondo, demostrando de esta manera que la casilla estaba comprometida debido a la posición del logotipo.

A partir de estos datos, se puede discernir que el diseño de proteoma total de la presente invención, usando un diseño de aglutinación en placa 6x12, puede detectar esencialmente los mismos epítomos potenciales para la unión de anti-ADA que los demostrados mediante matrices con un contenido significativamente más bajo y una resolución de aminoácido mucho mayor.

Ejemplo comparativo 10:

Unión de un anticuerpo anti-poli-histidina monoclonal a la matriz de proteoma total

La Figura 8 muestra un ejemplo de anticuerpo anti-poli-histidina monoclonal que se une a un epítomo potencial en una micromatriz de "proteoma total" de CCDS. Esta micromatriz se diseñó y sintetizó y se llevaron a cabo los experimentos de unión como se describe en el Ejemplo 1 y Ejemplo 3 anteriores. Esta micromatriz de oligopéptidos es un diseño 6x12 (es decir, oligopéptidos 12-méricos con un solapamiento o "tramo" 6-mérico). El epítomo identificado de la Figura 9 es:

- HFQH HHHH (1 casilla, posición 511)

Esto es solo un ejemplo de este experimento de unión: hubo otros numerosos ejemplos en el diseño en los que el anticuerpo anti-poli-histidina monoclonal se unió a otros péptidos con tramos de poli-histidina (datos no mostrados). Este experimento de unión demostró que una matriz de proteoma total se puede usar fácilmente para unir anticuerpos monoclonales, así como anticuerpos policlonales.

ES 2 647 490 T3

<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> oligopéptido

<400> 4

Ala Thr Gln Pro Ala Ile Ser Pro Pro Pro Lys Pro
10 1 5 10

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligopéptido

20 <400> 5

Asn Ala Ala Thr Lys Ile Pro Thr Pro Ile Val Gly Val Lys
1 5 10

<210> 6
25 <211> 18
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligopéptido

<400> 6

Leu Asn Ser Ser Gly Ser Ser Gln Gly Arg Asn Ser Pro Ala Pro Ala
1 5 10 15

35 **Val Thr**

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligopéptido

45 <400> 7

Asn Ala Ala Thr Lys Ile Pro Thr Pro Ile Val Gly
1 5 10

<210> 8
50 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> oligopéptido

<400> 8

Gln Pro Ala Ile Ser Pro Pro Pro Lys Pro
 1 5 10

5 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> oligopéptido

<400> 9

Ser Leu Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> oligopéptido

<400> 10

25 **His Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu Gln Glu Asn**
 1 5 10 15

30 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> oligopéptido

<400> 11

His Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn Arg Leu
 1 5 10

40 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> oligopéptido

<400> 12

Leu Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala
 50 1 5 10

55 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligopéptido con tramos de (poli-)histidina

<400> 13

His Phe Gln His His His His His
 1 5

5 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 14

Gln Ala Val Ala Ser Ile Ala Gly Gly Ile Arg Asn Gly Tyr Asp
 1 5 10 15

15 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 15

Ile Thr Ser Glu Asn Val Ala Glu Arg Phe Gly Ile Ser
 1 5 10

25 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

30 **Gly Cys Thr Gly Val Gln Thr Ala Ile Glu Gly Asn Ser Leu Gly**
 1 5 10 15

35 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Met Pro Ile Ile Ile Ala Gly Asn Asp Gln Gln
 1 5 10

40 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 18

Ser Arg Pro Thr Pro Ser Asp Met Ala Ile Val
 1 5 10

50 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 19

Ser Leu Leu Pro Gly His Val Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Val Lys
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
His Thr Leu Glu Asp Gln Ala Leu Tyr Asn
 10 1 5 10
 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 21
Asn Asp Leu Ile Glu Arg Ile Gln Val Asp Ala Tyr
 20 1 5 10
 <210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 22
Ser Val Leu Gln Asn Gln Gly Arg Glu Met Met Leu Val Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Ala Val
 30 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 23
Leu Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Ala Thr
 45 1 5 10
 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 25

ES 2 647 490 T3

Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro
1 5 10 15

Ala

<210> 26
<211> 13
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Lys His Met Thr Arg Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys
10 1 5 10

<210> 27
<211> 16
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Arg Glu Arg Arg Phe Gly Arg Asp Met Glu Thr Ile Gly Phe Ala
20 1 5 10 15

<210> 28
<211> 17
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Phe Trp Glu Gly Asp Phe His Arg Asp Met Glu Ala Leu Asn Val Leu
1 5 10 15

Pro

30 <210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 29

Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile
1 5 10

40 <210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val
45 1 5 10

50 <210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 647 490 T3

<400> 31

Gln Gly Gln Ala Ile Asp Asp Leu Met Pro Ala Gln Lys
1 5 10

5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 32

Gly Lys Asn Lys Gln Ser Leu Asp Ala Val Glu
1 5 10

15

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 33

Ser Val Gly Met Ile Ala Gly Gly Thr Gly Ile Thr
1 5 10

25

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 34

Ala Ile Met Lys Asp Pro Asp Asp His Thr Val
1 5 10

35

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

40

Met Ile Gln Tyr Ala Cys Leu Pro Asn Leu Asp His
1 5 10

45

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

50

Trp Thr Ser Phe Leu Ser Gly Val Asn Ile
1 5 10

55

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 647 490 T3

Gly Leu Lys Met Val Val Pro Gly Leu Asp Gly Ala Gln Ile
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 38
Met Gln Thr Gln Gln Met Leu Leu Asn Lys Glu Glu Ala Val
 1 5 10
 10 <210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 39
Glu Asp Gly Gly Ile Ile Arg Arg Ile Gln Thr Arg Gly Glu
 1 5 10
 20 <210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 40
His Ile Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys
 1 5 10
 30 <210> 41
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 41
Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
 1 5 10
 40 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala Val Ala
 45 1 5 10
 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens
 <400> 43
His Pro Cys Arg Gln Pro Asp Thr Pro Thr
 1 5 10
 55 <210> 44

ES 2 647 490 T3

<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 44

Ala Thr Gln Cys Ile Ser Asp Gly Lys Leu Asn Glu Gly His Thr
1 5 10 15

<210> 45
10 <211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 45

Trp Trp Lys Ala Gln Ser Leu Thr Thr Gly Gln Glu Gly
1 5 10

<210> 46
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

25 **Arg Gln Leu Leu Ala Pro Gly Asn Thr**
1 5

<210> 47
30 <211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

35 **Cys Asn Pro Asp Asp Met Ala Arg Asp Leu Glu Gln**
1 5 10

<210> 48
40 <211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Ser Phe Val Pro Trp Gln Pro Arg Phe Met Ile His Met Cys Pro Ser
1 5 10 15

Thr

45 <210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <400> 49

Lys Glu Val Phe Ser Gly Ile Lys Asn Ser Asn Glu
1 5 10

<210> 50

ES 2 647 490 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 50

Arg Tyr Ser Trp Asp Cys Ser Pro Leu Ser Met Phe Arg Arg His
 1 5 10 15

10 <210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51

Asn Thr Glu Arg Thr Ile Tyr Val Arg Asp Pro Thr Ser
 1 5 10

20 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 52

Trp Pro Glu Ser Ala Ser Ser Pro Pro Val
 1 5 10

30 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Asp Gly Gly Leu Arg His Trp Leu Arg Gln Asn Leu Pro
 1 5 10

35 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

Glu Pro Arg Asp Gly Ile Glu Pro Gly His Ile
 1 5 10

45 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 55

Asn Ser Ile Asn Thr Glu Glu Val Ile Asn
 1 5 10

55 <210> 56
 <211> 10

ES 2 647 490 T3

<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 62

Leu Phe Asp Leu Asn Phe Gln Ala Gly Phe Leu Met Lys Lys
1 5 10

10 <210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 63

Leu Gln Glu Arg Ala Val Leu Gly Ala Asn Asp Pro
1 5 10

20 <210> 64
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Thr Ala Ile Arg Pro His Gly Ile Phe Gly Pro Arg Asp Pro Gln Leu
1 5 10 15

Val Pro

25 <210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 65

Ser Gly Ser Ser Gln Gly Arg Asn Ser Pro Ala Pro Ala Val Thr
1 5 10 15

35 <210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 66

Asn Ala Ala Thr Lys Ile Pro Thr Pro Ile Val Gly Val Lys
1 5 10

45 <210> 67
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <400> 67

ES 2 647 490 T3

Ile Ser Asp Gly Pro Ser Val Ser Ala Leu Thr Asn Gly Phe Asp Thr
1 5 10 15

Pro Glu Glu Arg Tyr Gln
20

5 <210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

10 Tyr Asp Glu Lys Arg Ser Gln Ala Asn Gly Ala Gly Ala
1 5 10

15 <210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

20 Ser Leu Asp Ser Leu Pro Gln Ala Val Arg Glu Phe Leu Glu
1 5 10

<210> 70
<211> 26
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 70

Gln Arg Asp Thr Val Pro Ile Pro Lys Thr Gly Leu Ser Gln Leu Gly
1 5 10 15

30 Arg Trp Met Ser Glu Glu Asp Phe Glu Lys
20 25

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35 <400> 71

Phe Pro Gly Cys Met Lys Gly Arg Thr Met Tyr Val Ile Pro Phe Ser
1 5 10 15

Met

40 <210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
45 <400> 72

ES 2 647 490 T3

Gly Ser Asn Tyr Trp Arg Asn Arg Val Met Met Val Ala Lys
 1 5 10

5 <210> 73
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 73

Pro Thr Leu Lys Ile Phe Arg Asp Gly Glu Glu Ala Gly Ala Tyr Asp
 1 5 10 15

Gly Pro Arg Thr Ala Asp Gly Ile Val Ser His Leu Lys Lys Gln Ala
 20 25 30

Gly Pro Ala Ser Val Pro Leu Arg Thr Glu Glu Glu Phe Lys Lys Phe
 35 40 45

Ile Ser Asp Lys Asp Ala Ser Ile Val Gly Phe Phe Asp Asp Ser Phe
 50 55 60

Ser Glu Ala His Ser Phe Leu Lys Ala Ala Ser Asn Leu Arg Asp Asn
 65 70 75 80

Tyr Arg Phe Ala His Thr Asn
 85

15 <210> 74
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

20 Thr Leu Cys Lys Pro Ala Pro Leu Thr Gly Thr Leu Glu Val
 1 5 10

25 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75

30 Asp Ser Arg Pro Pro Phe Leu Ser Arg Pro Ala
 1 5 10

35 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

ES 2 647 490 T3

Leu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Leu Ser Gly
 1 5 10

5 <210> 77
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 77

Pro Glu Thr Arg Thr Val Ala Val Lys Gln Leu Gly Val Asn Pro Ser
 1 5 10 15

Thr Thr Gly Thr Gln
 20

15 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

20 Leu Val Asn Gly Leu His Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Glu Thr
 1 5 10 15

25 <210> 79
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

30 Gln Pro Asp Thr Pro Pro Gly Thr Pro Leu Val Gln Asp Glu
 1 5 10

35 <210> 80
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Leu Glu Pro Met Ala Ala Lys Ala Trp Asp Lys Glu Ser Glu
 1 5 10

40 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 81

Lys Phe Asp Trp Thr Phe Glu Gln Thr Val Glu Thr Ala Ile Thr
 1 5 10 15

50 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 647 490 T3

<213> Homo sapiens

<400> 82

5 Gln Thr Glu Ala Arg Asp Leu Val Glu Arg Cys Met Arg Val Leu
1 5 10 15

<210> 83

<211> 21

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 83

Asp Pro His Gln Arg Leu Thr Ala Lys Gln Val Leu Gln His Pro Trp
1 5 10 15

Val Thr Gln Lys Asp
20

15

<210> 84

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 84

Gln Leu Lys Pro Ile Glu Ser Ser Ile Leu Gln Arg Arg Val Arg Lys
1 5 10 15

Leu Pro Ser Thr Thr Leu
20

25

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 85

Ser Cys Ala Met Asn Ile Asn Gly Gly Asn Thr Leu Ala Cys Thr Arg
1 5 10 15

35

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

40

Thr Asn Leu Asn Lys Val Ser Lys Ile Tyr Pro Leu Pro His
1 5 10

45

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

ES 2 647 490 T3

Val Pro Asp Leu Ser Asn Phe Tyr Ala Gln
1 5 10

<210> 88
<211> 26
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Pro Val Gln Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro
1 5 10 15

Val Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu
10 20 25

<210> 89
<211> 17
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe
1 5 10 15

Asn
20
<210> 90
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25
<400> 90

Ile Gly Leu Asp Thr Thr Ile Met Met Arg Ser Ile Pro Leu
1 5 10

30 <210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35 <400> 91

Gly Phe Asp Gln Gln Met Ser Ser Met Val
1 5 10

40 <210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

45
Asp Ser Thr Thr Lys Glu Asp Thr Gly Thr
1 5 10

<210> 93

ES 2 647 490 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 93

Lys Gln Thr Ile Gly Asn Ser Cys Gly Thr
 1 5 10

<210> 94
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 94

15

Asp Gly His Leu Tyr Glu Leu Asp Gly Arg Met Pro Phe Pro Val Asn
 1 5 10 15

<210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 95

Thr Gln Ser Lys Glu Ala Phe Ala Ile Gly Leu
 1 5 10

25

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 96

Val Ala Arg Met Ile Ile Glu Ala Leu Asp
 1 5 10

35

<210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 97

Ser Met Asp Ser Phe Tyr Lys Val Leu Thr Glu Gln
 1 5 10

45

<210> 98
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 98

Ser Ala Lys Arg His Leu Ala Glu Gln Phe Ala Val Gly Glu Ile Ile
 1 5 10 15

Thr Asp

ES 2 647 490 T3

<210> 99
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 99

Lys Val Glu Ser Asp Asn Gly Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys
 1 5 10

10 <210> 100
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 100

Asn Gly Lys Ser Tyr Arg Phe Met Ile Met Asp Arg Phe Gly Ser Asp
 1 5 10 15

Leu Gln Lys

20 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 101

Ser Glu Thr Phe Glu Lys Ser Arg Leu Tyr Gln Leu Asp Lys Ser
 1 5 10 15

30 <210> 102
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102

Arg Leu Val Asn Pro Pro Pro Arg Ser Ser Gly Asn Ala Ala Thr Ser
 1 5 10 15

35 Gly Asn Ala Ala Thr Lys Ile Pro Thr Pro Ile Val Gly Val
 20 25 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un intermedio de micromatriz que comprende al menos 50.000 casillas de oligopéptidos por cm^2 , en el que las casillas representan entre un 90 % y un 100 % de un proteoma diana, seleccionándose la diana de un virus y un organismo y en el que un residuo de tirosina de extremo N es un residuo de tirosina protegido con 2-(2-nitro-4-benzoil-fenil)-propoxicarbonilo de extremo N.
- 10 2. La micromatriz de la reivindicación 1, en la que la micromatriz comprende al menos 100.000 casillas de oligopéptidos por cm^2 o al menos 200.000 casillas de oligopéptidos por cm^2 .
3. La micromatriz de la reivindicación 1, en la que el organismo es un ser humano.
- 15 4. La micromatriz de la reivindicación 1, en la que todos los oligopéptidos tienen la misma longitud.
5. La micromatriz de la reivindicación 1, en la que todos los oligopéptidos tienen una longitud seleccionada desde 9 a 18 residuos de aminoácido, 10 a 15 residuos de aminoácido y 12 residuos de aminoácido.
- 20 6. La micromatriz de la reivindicación 1, en la que cada casilla de oligopéptidos se solapa en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de al menos otra casilla en al menos 3 residuos de aminoácido contiguos.
- 25 7. La micromatriz de la reivindicación 6, en la que cada casilla de oligopéptidos se solapa en al menos 9 residuos de aminoácido.
- 30 8. Un procedimiento para sintetizar una micromatriz que comprende al menos 50.000 casillas de oligopéptidos por cm^2 , en el que cada oligopéptido representa una porción del proteoma de una diana seleccionada de un virus y un organismo, comprendiendo el procedimiento sintetizar las casillas de oligopéptidos en la micromatriz de tal manera que una casilla de oligopéptidos se solape en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de al menos otra casilla de oligopéptidos en al menos un residuo de aminoácido y en el que durante la síntesis un residuo de tirosina de extremo N sea un residuo de tirosina protegido con 2-(2-nitro-4-benzoil-fenil)-propoxicarbonilo de extremo N.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que cada casilla de oligopéptidos se solapa en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de al menos otra casilla de oligopéptidos en exactamente 9 residuos de aminoácido.

Fig. 2

A) 620 - RLVNPPPRSSGNAATSGNAATKIPTPIGV - 649
 RLVNPPPRSSGN
 LVNPPPRSSGNA
 ┌ VNPPPRSSGNA
tramo de 1 aa └ PPRSSGNAAT

B) RLVNPPPRSSGNAATSGNAATKIPTPIGV
 RLVNPPPRSSGN
 NPPPRSSGNAAT
 ┌ PRSSGNAATSGN
tramo de 3 aa └ SGNAATSGNAAT

C) RLVNPPPRSSGNAATSGNAATKIPTPIGV
 RLVNPPPRSSGN
 PRSSGNAATSGN
 ┌ AATSGNAATKIP
tramo de 6 aa └ AATKIPTPIGV

Fig. 3a

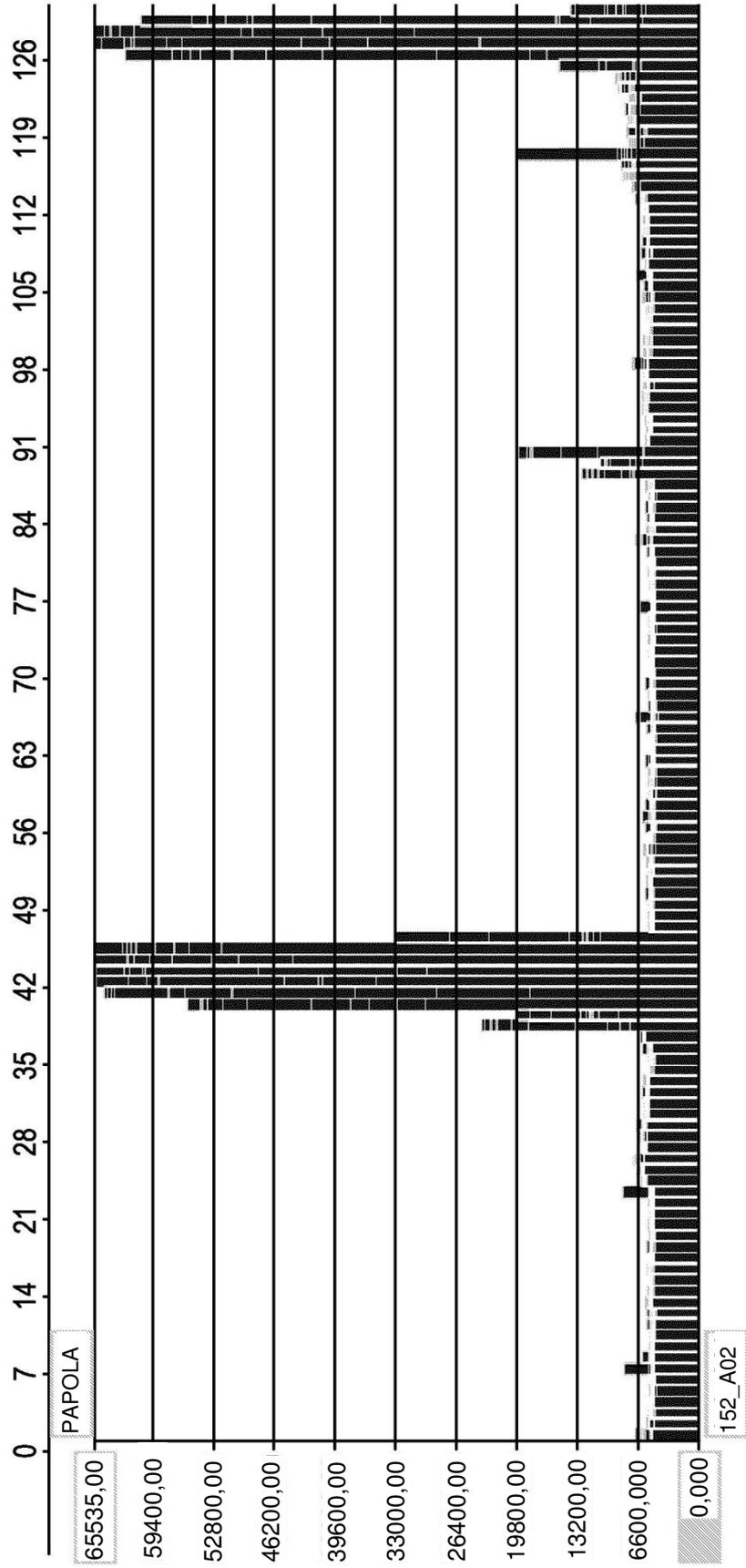


Fig. 3b

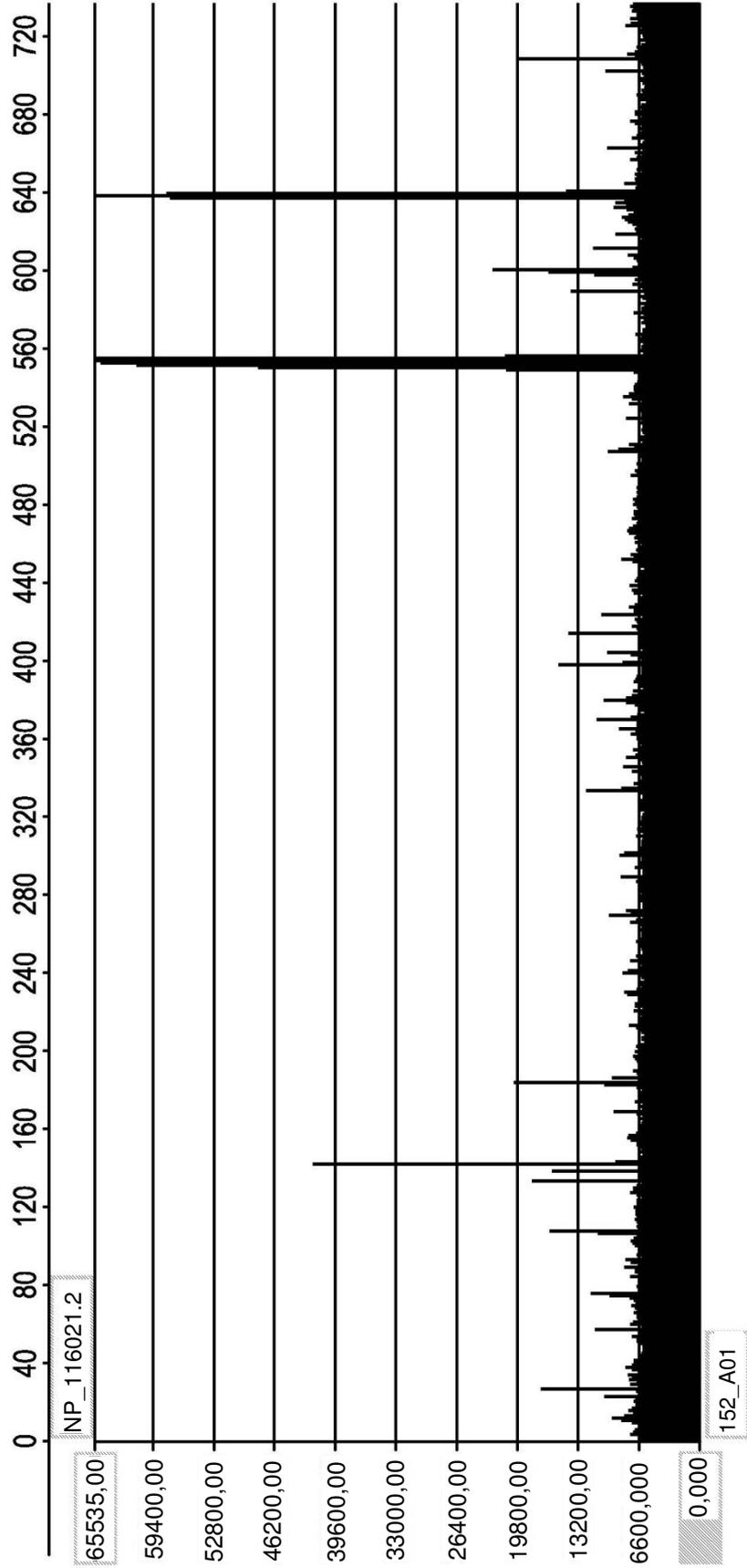


Fig. 3c

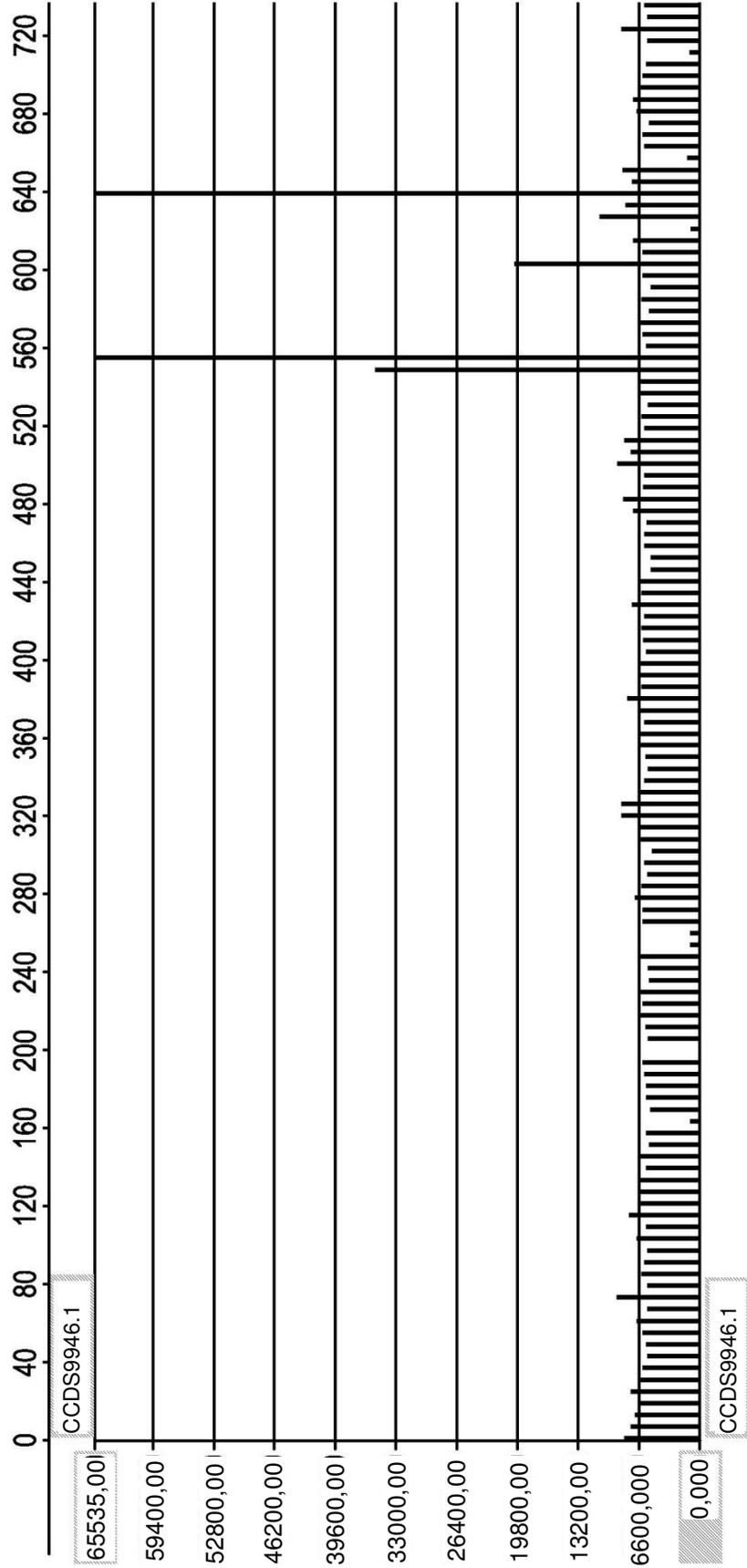


Fig. 4

Anticuerpo	Epítipo(s)		
HPA007244	QAVASIAGGIRNGYD	ITSENVAERFGIS	
HPA006198	GCTGVQTAIEGNSLG	QMPIIIAGNDQQ	
HPA005552	SRPTPSDMAIV		
HPA001399	SLLPGHVQAYQEAVK	HTLEDQALYN	
HPA000525	NDLIERIQVDAY		
HPA008333	SVLQNGGREMMLVTSGAV		
HPA005554	LDAAVTFGPS		
HPA010793	WGEDDDIAT		
HPA001328	FRGDGGSTTGLSATPPA		
HPA001198	KHMTRSQAELLK		
HPA005992	RRERRFRDMETIGFA		
HPA002384	FWEGDFHRDMEALNVLP		
HPA001223	ERDGTCLKPGDTI	ILQQCDGKLDMLV	
HPA001254	QGQAIDDLMPAQK		
HPA008835	GKNKQSLDAVE		
HPA001566	SVGMIAGGTGIT	AIMKDPDDHTV	MIQYACLPLNDH
HPA000793	WTSFLSGVNI		
HPA006461	GLKMVVPGLDGAQI		
HPA007641	MQTQQMLLNKEEAV		
HPA006148	EDGGIIRRIQTRGE		
HPA000237	HISPAKALLQDK	DPLGKQGYQLRQGD	IGGPRSYTIAVA
HPA004701	HPCRQPDPT		
HPA001249	ATQCISDGKLNIGHT		
HPA003494	WWKAQSLTTGQEG	RQLLAPGNT	
HPA006723	CNPDDMARDLEQ		

Fig. 4 cont.

HPA001334	SFVPWQPRFMIHMCPS	KEVFSGIKNSNE	RYSWDCSPLSMFRRH
HPA001231	NTERTIYVRDPTS		
HPA008247	WPESASSPPV		
HPA001240	DGGLRHWLRQNL	EPRDGIPEGHI	
HPA000704	NSINTEEVIN		
HPA008467	LSTLGVFQG	PISSCDTGMANCERT	IKPDGVQRGLVGE
HPA001303	QKLQDIQRAMELLSACQ		
HPA007308	TTGGSGSMYS	LTYSIGHTPADARI	LFDLNFQAGFLMKK
HPA000571	LQERAVLGANDP	TAIRPHGIFGPRDPQLVP	
HPA001788	SGSSQGRNSPAPAVT	NAATKIPTPIVGVK	
HPA006314	ISDGPSVSALTINGFDTPEERYQ	YDEKRSQANGAGA	
HPA006277	SLDSLPAQVREFLE	QRDTVPIPKTGLSQLGRWMSEEDFEK	FPGCMKGRMTMYVIFFSM
HPA002645	GSNYWRNRVMMVAK		
HPA003230	PTLKIFRDGEEAGAYDGPRTADGIVSHLKKQAGPASPVLRTTEEEFKFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSFLKAASNLRDNYRFAHTN		
HPA003982	TLCCKAPLGTGLEV	DSRPPFLSRPA	LYSRSGSLSG
HPA006782	PETRTVAVKQLGVNPSTTG	LVNGLHPLTLRWEET	QPDTPPGTPLVQDE
HPA002947	LEPMAAKAWDKESE		
HPA003049	KFDWTFEQTVETAIT		
HPA006700	QTEARDLVERCMRVL		
HPA007981	DPHQRLTAKQVLQHPWVTQKD	QLKPIESSILQRRVRKLPSTTL	
HPA002867	SCAMNINGGNTLACTR	TNLNKVSKIYPLPH	VPDLSNFYAQ
HPA001401	PVQGIINFEQKESNGPVKVGSIKGL	EFGDNTAGCTSAGPHFN	
HPA003323	IGLDTTIMMRSIPL	GFDQMQSSMV	DSTTKEDTGT
HPA005993	KQTIGNSCGT	DGHLYELDGRMPFPVN	
HPA004769	TQSKEAFAIGL	VARMIEALD	SMDSFYKVLTEQ
HPA000660	SAKRHLAEQFAVGEIITD	KVESDNGPLFTELK	NGKSYRFMIMDRFGSDLQK
HPA006988	SETFEKSRLYQLDKS		

Fig. 5

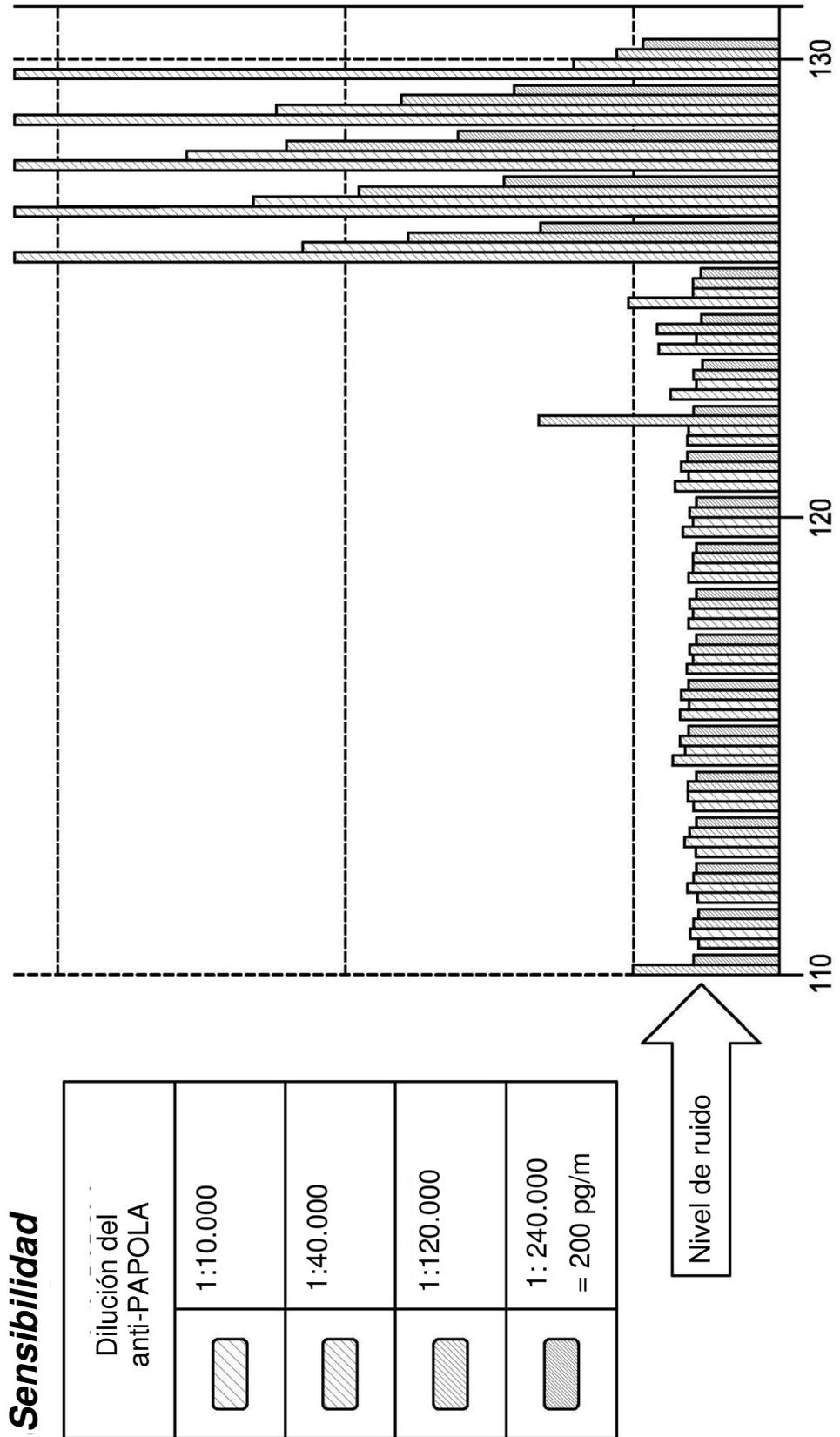


Fig. 6

P53 191-2

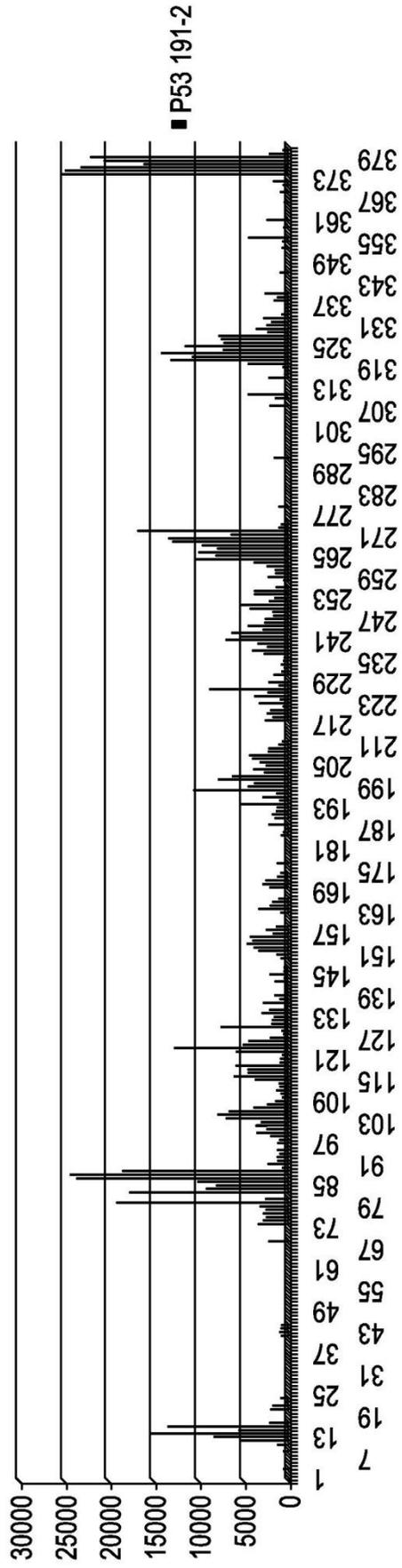


Fig. 7a

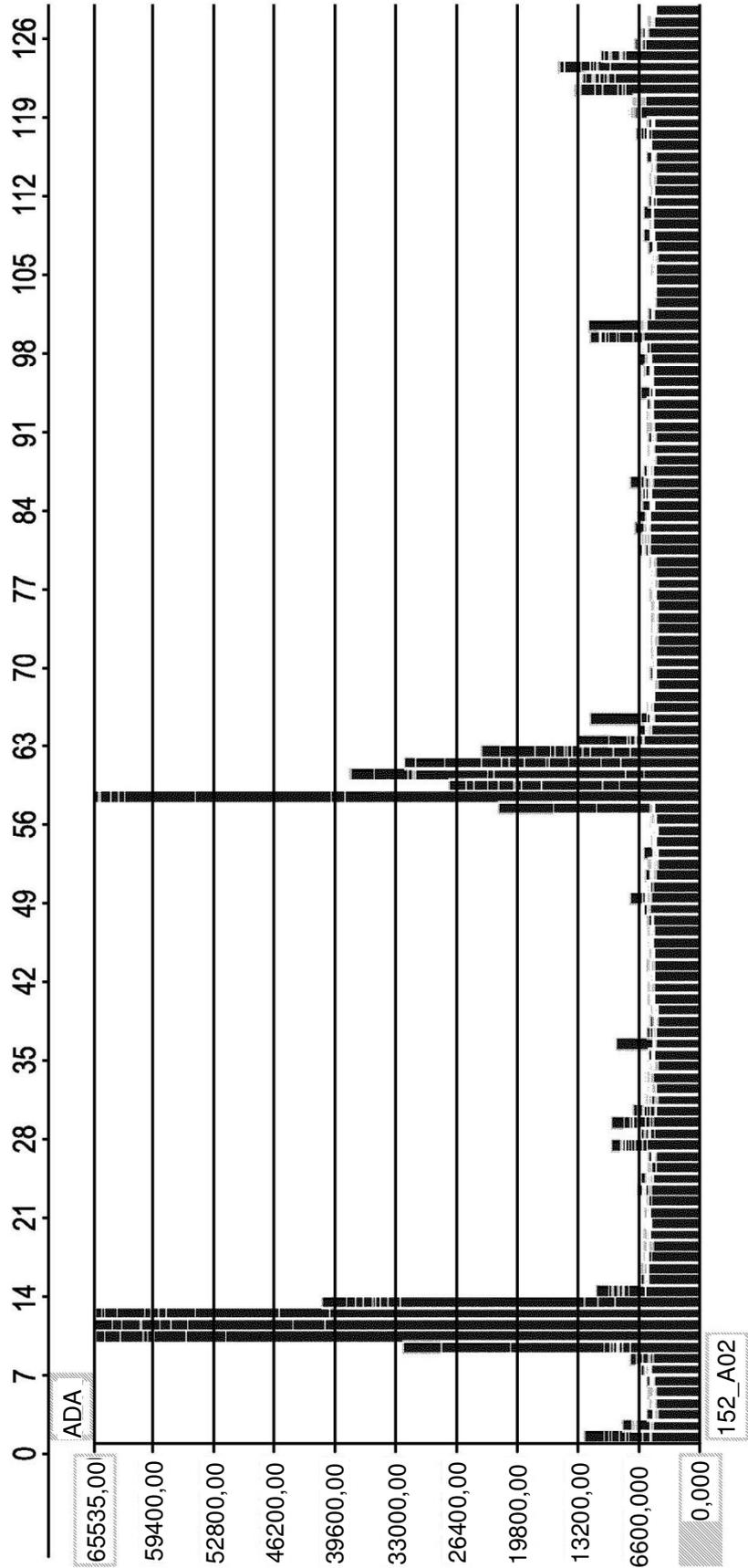


Fig. 7b

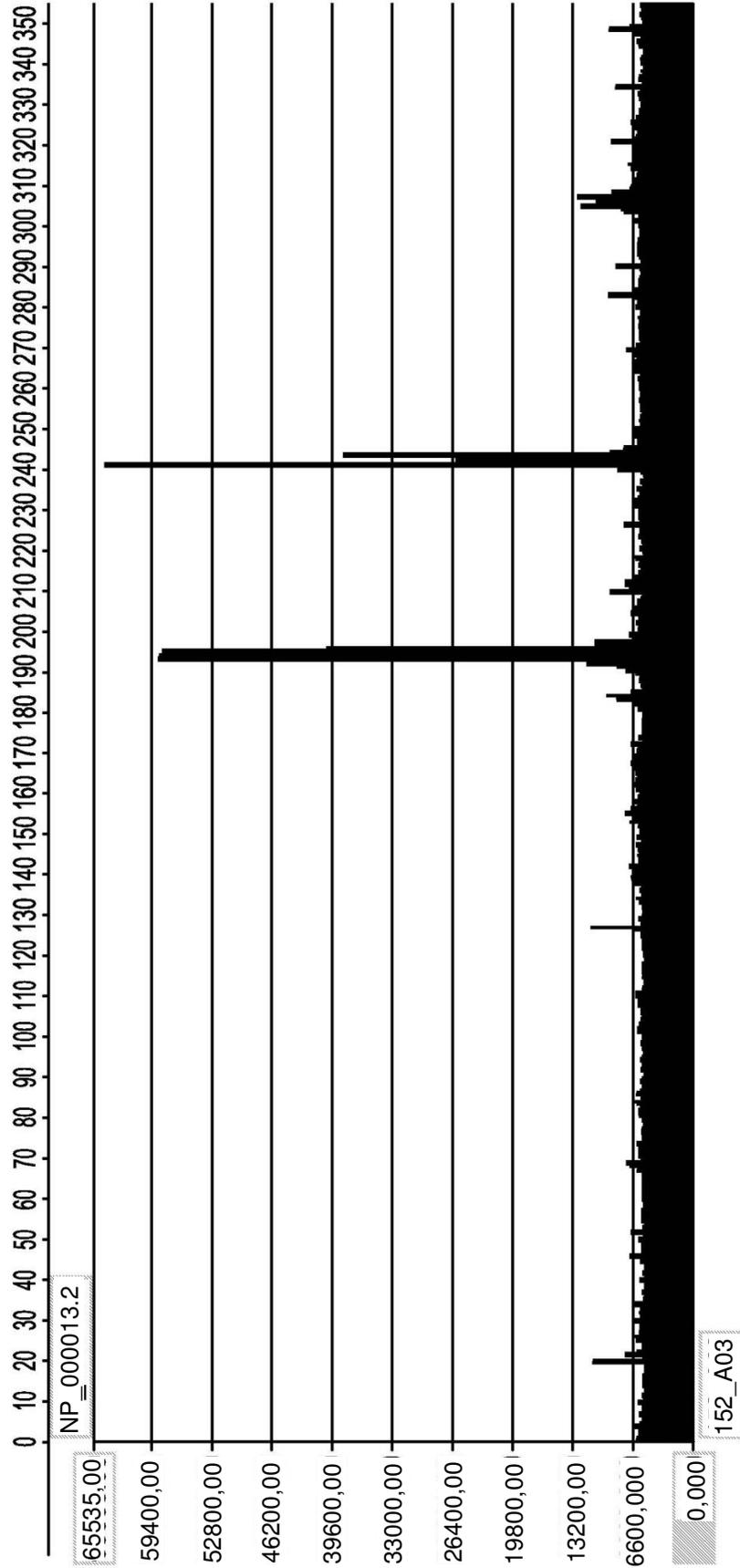


Fig. 7c

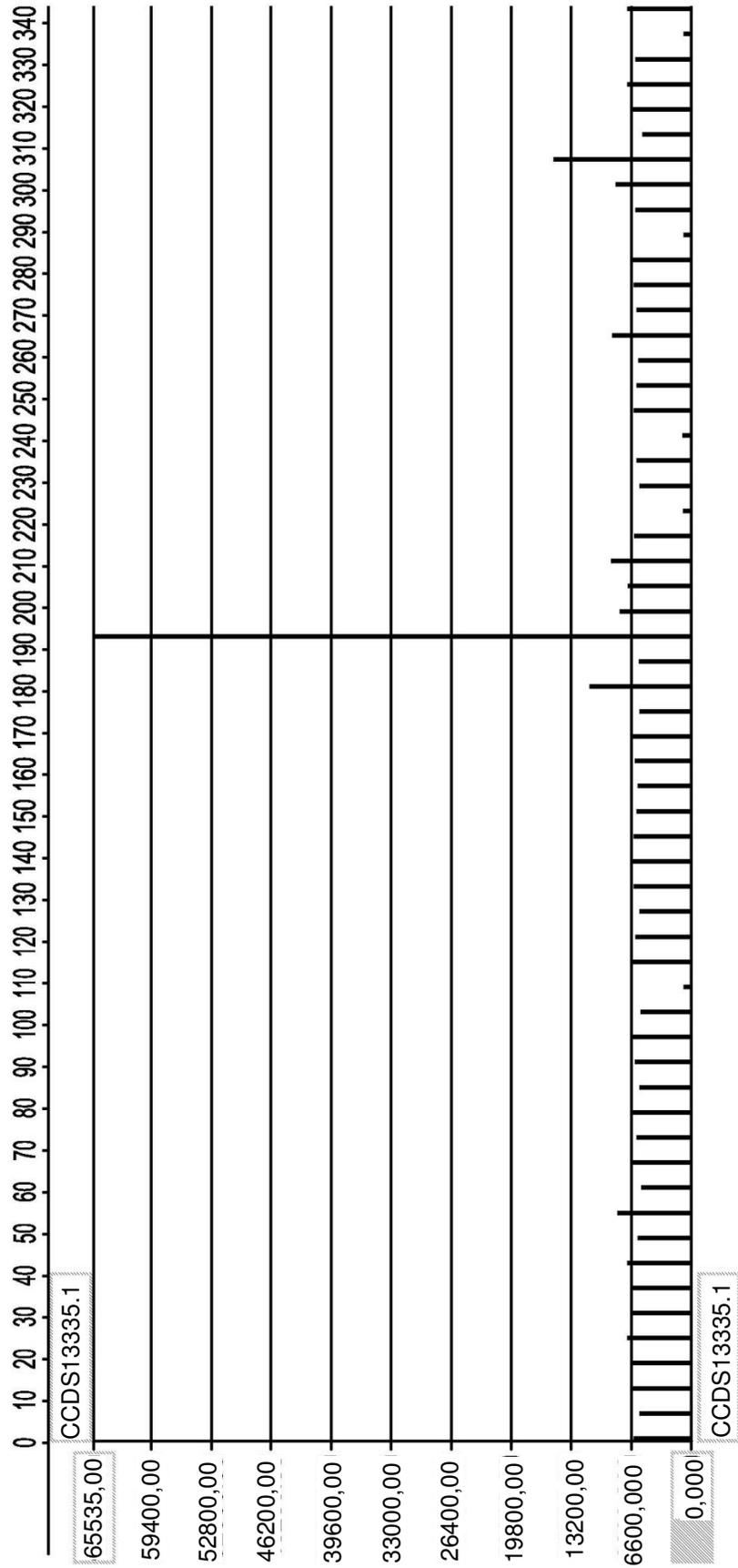


Fig. 8

